



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Eritrofagocitosis y trogocitosis durante la
interacción de amibas anfitriónicas con
tejido blanco**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ESTHEPANIA ARCIGA CARDENAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARITZA OMAÑA MOLINA



TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Sabemos lo que somos, pero no lo que podemos llegar a ser

-William Shakespeare

- Escuchamos que te fuiste

- Fui a buscar a alguien

- ¿A quién?

-A mí mismo

Bjorn, serie vikingos.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) Proyecto IN228720 y el proyecto COMECYT FICDTEM-2021-061.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por otorgarme un desarrollo profesional y principalmente personal desde mi educación media superior. Por darme la oportunidad de vivir la mejor etapa de mi vida.

A la **Dra. Maritza Omaña**, a quien admiro profundamente. Gracias por brindarme la oportunidad de estar en su equipo de laboratorio y compartir su pasión por el mundo de las amibas. Pero, especialmente gracias por impulsar mis capacidades, brindarme el apoyo constante en la elaboración de este proyecto y por confiar en mí, escuchar mis ideas, ayudar a mejorarlas y por recordarme que la superación personal y profesional es un trabajo día con día.

A la **Mtra. Dolores Hernández**, por todo el apoyo otorgado durante el desarrollo de este proyecto, por resolver mis dudas, compartir sus ideas y conocimientos. Gracias por la total disponibilidad y el tiempo brindado en la elaboración y redacción del trabajo.

Al **Mtro. David Segura Cobos**, por su apoyo en la preparación de los cultivos, por poner a mi disposición el material necesario para la elaboración de este trabajo. Gracias por la atención, los constantes consejos y aportaciones.

A la **Biol. Rocío Ibarra**, por brindarme el conocimiento sobre el cultivo y mantenimiento de las cepas en estudio.

Asimismo, agradezco al **Biol. Tomás Ernesto Villamar** y a la **Dra. Elizabeth Alejandrina Guzmán**, por la valiosa atención, los acertados comentarios y contribuciones brindadas para mejorar este proyecto.

Agradezco en general a todo el equipo que conforma el laboratorio de amibas anfitriónas, por apoyarme durante el desarrollo de este proyecto y hacer mi estancia amena y agradable.

Dedicatorias

A mi familia, gracias por apoyarme en mis decisiones, por recordarme cada día que los logros se consiguen con esfuerzo, perseverancia y dedicación, enseñarme a pensar en grande y perseguir mis sueños, por las constantes palabras de apoyo durante toda mi vida. Y, sobre todo gracias por confiar en mí. Los amo mucho;

A mi mamá, Por todo tu cariño y comprensión, por compartirme tu vida y tu tiempo, hacer los momentos especiales, tus detalles, sabios consejos, por siempre escucharme, apoyarme y motivarme. Y especialmente gracias por siempre sostener mi mano en cada momento de mi vida.

A mi papá, por tu cariño, enseñanzas y el tiempo compartido, por siempre tener las palabras correctas para cada situación y por las múltiples charlas que me han ayudado a ser la persona que soy hoy en día.

A mi hermano, con quien he compartido grandes momentos y quien ha sido mi compañero de vida. Por las incontables platicas que me alegran los días y por regalarme grandes anécdotas y recuerdos que he coleccionado a lo largo del tiempo, te quiero muchísimo.

A mis amigas de CCH: **Fanny, Itzel y Paulina**. Las quiero y admiro mucho, y aunque tomamos caminos diferentes, agradezco su apoyo a pesar de la distancia, valoro mucho que sigamos teniendo una bonita amistad, gracias por compartir grandes sueños y aventuras que atesoraré siempre. Ha sido bonito vernos crecer.

A mis amigos y al equipo que me acompañó durante toda la carrera, gracias por compartir esta bonita aventura, llena de caminos estrechos y amplios, por los momentos de dedicación, las madrugadas de arduo trabajo y por la bonita amistad que formamos en todo este tiempo:

Carlos, admiro tu perseverancia y dedicación. La amistad que hemos creado es invaluable, gracias por brindarme un apoyo único e incondicional, por el tiempo compartido, los momentos bonitos y no tan bonitos, la motivación día a día, y por siempre estar.

Fernanda, por la amistad que creamos desde el primer día de clases, por las risas, las innumerables anécdotas y experiencias acumuladas, las charlas con ideas compartidas y los valiosos momentos que hemos pasado.

Carin, Wendy y Mariana, por las ocurrencias durante toda la carrera, por los momentos que pasamos desde el principio. Aprecio mucho la cálida amistad que me brindaron, por la tranquilidad y balance en los días caóticos, gracias por los momentos agradables que hemos compartido.

Diego, por las charlas durante los trayectos largos rumbo a la facultad y de regreso a casa, por los gustos y puntos de vista compartidos, las bromas, las risas y por la bonita amistad que formamos.

Gracias.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Antecedentes históricos	2
3. <i>Acanthamoeba</i>	3
3.1 Clasificación y Taxonomía	4
3.2 Ciclo de vida	5
3.2.1 Trofozoíto	5
3.2.2 Quiste	6
4. Distribución	7
5. Importancia médica.....	7
5.1 Encefalitis Amibiana Granulomatosa	7
5.2 Queratitis Amibiana.....	8
5.3 Infecciones cutáneas	8
5.4 Endosimbiosis	9
5.5 Epidemiología.....	10
5.6 Diagnóstico	11
5.7 Tratamiento	11
5.8 Prevención	12
6. <i>Naegleria fowleri</i>	12
6.1 Clasificación y Taxonomía	13
6.2 Ciclo de vida	13
6.2.1 Trofozoíto	13
6.2.2 Etapa flagelar	14
6.2.3 Quiste	14
6.3 Distribución	15
6.4 Importancia médica.....	15
6.5 Epidemiología.....	18
6.6 Diagnóstico	18
6.7 Tratamiento	19

6.8 Prevención	19
7. <i>Naegleria lovaniensis</i>.....	19
7.1 Distribución	20
8. Mecanismos de patogenicidad de amibas anfitriónicas.....	20
8.1 Mecanismos dependientes de contacto	20
8.2 Fagocitosis	21
8.2.1 Reconocimiento de partículas	21
8.2.2 Ingestión de partículas.....	22
8.2.3 Formación del fagosoma	22
8.2.3 Formación del fagolisosoma	22
8.3 Trogocitosis	22
9. Mecanismos independientes de contacto.....	23
10. Justificación	23
11. Hipótesis	24
12. Objetivos	24
12.1 Objetivo general	24
12.2 Objetivos particulares	24
13. Metodología	24
13.1 Cultivo amibiano.....	24
13.2 Obtención de tejido blanco	25
13.2.1 Tejido cerebral	25
13.2.2 Fibronectina	25
13.3 Elaboración de micropatrones	25
13.4 Estrategia experimental	25
13.4.1 Interacción de trofozoítos con tejido blanco	26
13.4.2 Interacción con eritrocitos de sangre humana	26
13.4.3 Análisis de la interacción.....	26
13.4.3.1 Análisis cuantitativo.....	26
14. Resultados	27
14.1 Análisis cuantitativo de los procesos fagocíticos.....	27

14.2 Análisis cualitativo de los procesos fagocíticos.....	28
14.2.1 <i>A. castellanii</i>.....	30
14.2.2 <i>N. lovaniensis</i>	31
14.3 Análisis cualitativo del proceso trogocitosis.....	32
14.4 Análisis cuantitativo del proceso de trogocitosis	33
14.5 Estructuras fagocíticas.....	34
14.5.1 Análisis cuantitativo de estructuras fagocíticas	34
14.5.2 Análisis cualitativo de estructuras fagocíticas.....	35
14.5.2.1 <i>A. castellanii</i>.....	35
14.5.2.2 <i>A. culbertsoni</i>.....	36
14.5.2.3 <i>N. fowleri</i>	37
14.5.2.4 <i>N. lovaniensis</i>.....	38
15. Discusión	39
16. Conclusiones	45
17. Perspectivas	45
18. Referencias	46
19. Anexo 1	55

Abreviaturas

MEAP- Meningoencefalitis Amibiana Primaria

QA- Queratitis Amibiana

EAG- Encefalitis Amibiana Granulomatosa

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa

LBP- Proteína de unión a laminina

SNC- Sistema Nervioso Central

TC- Tomografía computarizada

RM- Resonancia magnética

LCR- Líquido Cefalorraquídeo

1. Resumen

Las amibas anfitriónicas son protozoos de vida libre capaces de vivir como patógenos oportunistas. *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* spp., destacan por su importancia clínica ya que son agentes causales de infecciones en sistema nervioso central con alta mortalidad para las que no existe un tratamiento efectivo. Hasta el momento, a través de ensayos *ex vivo*, *in vivo* e *in vitro* se han descrito los mecanismos de patogenicidad durante su invasión al tejido blanco; adhesión, migración a las uniones celulares, penetración por efecto mecánico y/o enzimático fagocitosis y trogocitosis. No obstante, se desconoce si estos factores de virulencia son características biológicas o se estimulan o exacerbaban una vez que se encuentran en contacto con tejido blanco, por lo anterior en este trabajo se determinó si el tejido blanco incrementó el proceso de eritrofagocitosis en *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.

Se trabajó con dos tipos de tejido blanco; fibronectina obtenida a partir de sangre humana y cerebro de ratón; se obtuvieron extractos de los mismos y se distribuyeron en forma de micropatrones para facilitar la interacción, se colocaron 1.5×10^5 trofozoítos/ 1ml de medio de cultivo y se incubaron por 30 min a la temperatura óptima de cada cepa, posteriormente se adicionaron eritrocitos en una proporción 1:4 y se hicieron registros a través de videograbaciones en los que se evaluó el número de eventos de fagocitosis, trogocitosis, número de eritrocitos fagocitados así como la emisión de estructuras fagocíticas.

Los resultados mostraron que la interacción previa con tejido cerebral y una post interacción con eritrocitos no indujo un aumento en procesos fagocíticos y trogocíticos. Mientras que, los trofozoítos interaccionados previamente con fibronectina si indujeron el aumento de estos procesos en algunas de las especies en estudio. Sin embargo, no es necesario una previa interacción con tejido blanco para fagocitar y/o trogocitar. Sugiriendo que los procesos fagocíticos que llevan a cabo las amibas anfitriónicas en su fase exozoica o de vida libre es una característica biológica que les ha permitido una exitosa distribución en la naturaleza, jugando un papel importante en el control biológico de poblaciones bacterianas y a su vez en su fase endozoica les ha permitido causar daño a diferentes tejidos como: tejido cerebral, matriz extracelular y eritrocitos, por mencionar algunos.

2. Introducción

Las amibas de vida libre son protozoos que pueden completar sus respectivos ciclos de vida en el medio ambiente, en el cual están ampliamente distribuidos, incluyendo hábitats de agua dulce, salada, aguas superficiales, ríos, suelos, incluidos sistemas de agua corriente, plantas de tratamiento de aguas residuales, piscinas, entre otros. Asimismo, juegan un papel importante en la composición de la flora microbiana en los sistemas de agua (Scheid, 2019; Stockman *et al.*, 2011; Visvesvara, 2013). Su alimentación se basa en la ingesta de bacterias, algas, hongos y pequeñas partículas orgánicas, por lo que las amibas juegan un papel importante en la regulación de la densidad bacteriana y otros organismos (Rosenberg *et al.*, 2009).

Entre los géneros de amibas de vida libre que existen en la naturaleza, los miembros de solo cuatro géneros tienen una asociación con enfermedades en humanos y animales; *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* y *Sappinia*. Son patógenos oportunistas que causan infecciones en el Sistema Nervioso Central, ojos, pulmones y piel. Dado que estas amibas tienen la capacidad de existir como organismos de vida libre y ocasionalmente invaden a un huésped, se les ha denominado amibas anfitriónicas (Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara y Maguire, 2006).

2.1 Antecedentes históricos

A mediados del siglo XX se descubrió que las amibas podían invadir a seres humanos y a ciertos animales, causándoles la muerte o daño cerebral irreversible. En 1912, Alexeieff propuso el nombre genérico de *Naegleria* a las amibas que tienen la habilidad de transformarse a una fase flagelada temporal, además de la fase trófica o de trofozoítos y la fase quística. En 1930 Castellani en Oxford, reportó la presencia de amibas de vida libre en placas de agar previamente inoculadas con levaduras y bacterias. Douglas la clasificó como *Hartmanella castellanii* y en 1931, Volkonsky la diferenció de otras amibas y la nombró *Acanthamoeba castellanii*. En 1958, Culbertson descubrió por primera vez el potencial patógeno de *Acanthamoeba*.

Aisló una amiba en los cultivos de células de riñón de mono durante el desarrollo de una vacuna para la poliomeilitis (Culbertson *et al.*, 1958). En 1965, Fowler y Carter reportaron cuatro casos de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) en Australia, las cuales fueron identificadas *post mortem*, en un principio se creía que el agente etiológico era *Acanthamoeba*, pero un año más tarde se identificó como *Naegleria* (Fowler y Carter, 1965). Más tarde, en 1971, Culbertson confirmó que cuando las amibas del género *Acanthamoeba* se inoculaban en monos y ratones, estas tenían la capacidad de provocar la muerte en animales de experimentación. Posteriormente, un año después se describió la primera infección en humanos por *Acanthamoeba*. En 1973 se presentó el primer caso de queratitis amibiana (QA). Sin embargo, fue hasta la década de 1980 cuando se reportó un aumento en la incidencia de QA, asociado principalmente con el uso de lentes de contacto (Illingworth y Cook, 1998). Asimismo, en 1980 Martínez caracterizó las infecciones por *Acanthamoeba* como infecciones oportunistas, reconociendo su ocurrencia en pacientes debilitados o con enfermedades crónicas, designándola como encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), diferenciándola de la patología causada por *Naegleria*; meningoencefalitis amibiana primaria (Martínez, 1980). Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) descubrieron por primera vez a *Balamuthia mandrillaris* en 1986, la amiba se encontró en el cerebro de un mandril muerto. Después de una extensa investigación, en 1993 se determinó que el agente causal de esta infección correspondía a una nueva especie de amiba anfitriónica y se denominó *B. mandrillaris* (CDC, 2019). Asimismo, Gelman y colaboradores (2001) describieron a *Sappinia diploidea* actualmente *Sappinia pedata* como agente causal de Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG).

3. *Acanthamoeba*

El género *Acanthamoeba* comprende varias especies de amibas de vida libre. El término '*Acanto*' deriva del griego, significa "puntas" para indicar la presencia de estructuras similares a espinas (también conocidas como acantópodos) en la superficie de la amiba (Duggal, 2017; Siddiqui y Khan, 2012).

3.1 Clasificación y taxonomía

Pussard y Pons (1977) propusieron una clasificación basada en características morfológicas y tamaño del quiste, dividiendo al género en tres grupos distintos (I, II y III). Acorde a estas características, el género *Acanthamoeba* estaba formado por 18 especies diferentes, clasificándose:

Grupo I: Los quistes de este grupo presentan una separación entre el endoquiste y el ectoquiste, su tamaño es menos de 18 μm (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, *A. tubiashi*).

Grupo II: Este grupo incluye a las amibas con una mayor distribución y las que han sido comúnmente aisladas. Quistes con una pared externa rugosa, ovoide o poligonal siendo el diámetro de los quistes menor de 18 μm (*A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. paradivionensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. triangularis*).

Grupo III: Quistes con paredes separadas entre sí, la externa es lisa o ligeramente rugosa, mientras que la interna es redondeada y su tamaño es menor a 18 μm (*A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, *A. royreba*).

Sin embargo, este criterio de clasificación se consideró poco confiable en función a las variaciones notificadas en la morfología del quiste pertenecientes a la misma cepa debido a las condiciones de cultivo (De Jonckheere, 1983).

Actualmente, se ha optado por el análisis molecular, empleando una clasificación basada en gran medida en el análisis de secuencias de ADNr 18S, que al presente delimitan 23 genotipos, T1 a T23 que en la filogenia molecular se agrupan en cuatro linajes principales (Corsaro, 2022; Putaporntip *et al.*, 2021).

Las especies del grupo morfológico 1 forman el linaje basal, con correlación entre especies morfológicas y genotipos (T7-T9, T17, T18). El linaje más grande incluye el genotipo T4 (*A. castellanii*) dividido en siete grupos principales, T4A a T4G, a los que pertenecen la mayoría de las cepas ambientales y clínicas; los genotipos T3 y T11 (*A. griffinii*, *A. hatchetti*) y el clado T2/T6 (*A. palestinensis*). Los otros genotipos son del grupo *A. jacobsi*, *A. micheli* (genotipos T15/T22+T19/T13/T16), y el de *A.*

culbertsoni, *A. healvi*, *A. bangkokensis* (genotipos T10/T12/T14/T23 + T1/T20); mientras que *A. lenticulata* (T5) y *A. pyrimorfis* (T21) forman linajes únicos (Corsaro, 2022).

Tabla 1. Taxonomía de *Acanthamoeba* acorde con la clasificación de Adl et al., 2019

Eukarya	
Supergrupo	Excavata
Superphylum	Amoebozoa
Phylum	Discosea
Subphylum	Centramoebida
Familia	Acanthamoebidae
Género	<i>Acanthamoeba</i>

3.2 Ciclo de vida

Acanthamoeba incluye dos estadios en su ciclo de vida: uno de alimentación y reproducción en fase trófica y un estado de quiste resistente.

3.2.1 Trofozoíto

Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria, miden de 15 a 30 μm . La fase trófica se caracteriza por la presencia de proyecciones superficiales similares a espinas llamadas acantópodos, que permiten que la amiba se adhiera a las superficies y capture a sus presas mediante movimientos celulares. Los trofozoítos se alimentan de bacterias, algas, levaduras o pequeñas partículas orgánicas. Son uninucleados, el citoplasma contiene numerosas mitocondrias, ribosomas, vacuolas alimenticias y una vacuola contráctil asociada al equilibrio hídrico, su función es acumular y expulsar el exceso de agua (Visvesvara et al., 2007; Duggal et al., 2017).

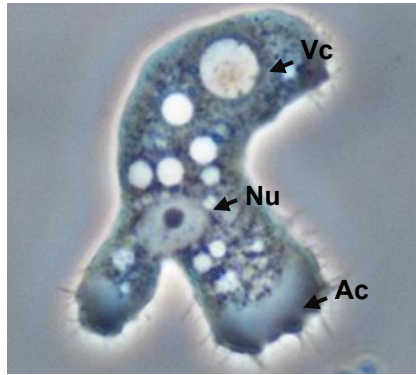


Figura 1. Trofozoíto de *Acanthamoeba*. Vc (Vacuola contráctil) Nu (Núcleo) Ac (acantópodos) (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

3.2.2 Quiste

Cuando las condiciones del medio no son las adecuadas; el alimento escasea, o cuando se enfrenta a la desecación y otras tensiones ambientales, las amibas se redondean y se enquistan. Los factores que afectan al enquistamiento son los estímulos ambientales adversos, como las diferencias de pH, la presión osmótica, las condiciones de temperatura y los requisitos nutricionales. Pueden resistir y sobrevivir en diversos ambientes hostiles como piscinas cloradas, y temperaturas bajo cero. Tienen doble pared y varían en tamaño de 13 a 20 μm , la pared externa del quiste, el ectoquiste, tiene pliegues y ondulaciones y contienen proteínas y lípidos. La pared interna del quiste, el endoquiste contiene celulosa y varía en forma: puede ser estrellado, poligonal, ovalado, o esférico. Los poros u ostiolos están presentes en la unión del ectoquiste y el endoquiste (Duggal *et al.*, 2017; Visvesvara *et al.*, 2007).

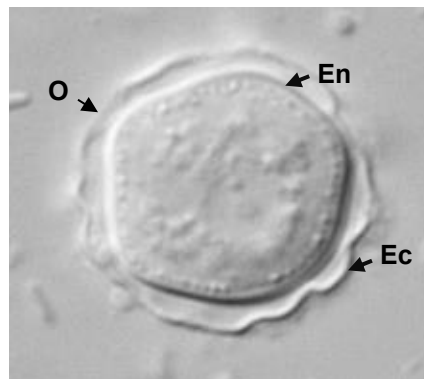


Figura 2. Quiste de *Acanthamoeba*, En (Endoquiste) Ec (Ectoquiste) O (Ostiolos) (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

4. Distribución

Acanthamoeba tiene una distribución cosmopolita y se ha aislado de una amplia variedad de hábitats, que incluyen: agua dulce, salobre y de mar, aguas residuales, suelos húmedos y polvo. También, se puede aislar fácilmente en el entorno doméstico como en grifos, del entorno hospitalario en ventiladores, baños de hidroterapia, unidades de calefacción y aire acondicionado. *Acanthamoeba* está ampliamente distribuida en el medio ambiente, lo que representa una amenaza potencial para causar infecciones críticas entre la población humana susceptible. El principal factor en su distribución en el agua y el suelo es la presencia de un suministro bacteriano disponible. Las aguas cálidas pueden incrementar el crecimiento y la propagación de *Acanthamoeba*. Se encuentran en una amplia gama de condiciones de temperatura, salinidad y pH. Las cepas patógenas en humanos pueden sobrevivir a 37 °C y temperaturas corporales más altas, estas cepas son termotolerantes. No obstante, otras especies pueden ser termotolerantes pero no patógenas (Schuster y Visvesvara, 2004).

5. Importancia médica

Algunas cepas de *Acanthamoeba* son capaces de causar patologías en los seres humanos, siendo el agente etiológico principal de EAG y QA. Asimismo, es capaz de causar infecciones cutáneas, infecciones diseminadas que en la mayoría de los casos aparece junto con la Encefalitis Amibiana Granulomatosa (Król-Turmińska y Olender, 2017). La puerta de entrada puede variar debido a la ubicuidad de *Acanthamoeba* en el medio ambiente, puede ingresar a través del tracto respiratorio, a través de los ojos y heridas en la piel que en particular favorece su diseminación hematológica al cerebro (Figura 3) (Duggal *et al.*, 2017).

5.1 Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG)

La EAG es una enfermedad oportunista, se presenta en individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes, alcohólicos crónicos, individuos que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), lupus, diabetes o crónicamente enfermos. Con frecuencia hay evidencia de infección en la piel, los pulmones o los senos paranasales también pueden verse afectados; cualquiera de

estos sitios puede ser el foco primario de infección que lleva a la diseminación hematológica. Las características habituales de EAG consisten en dolor de cabeza, rigidez en el cuello y anomalías del estado mental, así como náuseas, vómitos, letargo, ataxia, alteraciones visuales, convulsiones y coma. Las amibas atacan el tejido cerebral, produciendo lesiones necrosantes hemorrágicas, que se encuentran comúnmente en el cerebro, cerebelo y el tronco encefálico (Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara y Maguire, 2006; Bonilla y Ramírez, 2014; Martínez, 1985).

5.2 Queratitis Amibiana (QA)

Hoy en día, *Acanthamoeba* se considera uno de los agentes causales más importantes de queratitis (QA) en los usuarios de lentes de contacto. Debido a la falta de diagnóstico y tratamiento, la QA a menudo muestra una progresión severa, la cual puede tratarse con éxito si es diagnosticada tempranamente. Los síntomas clínicos comunes incluyen enrojecimiento, dolor ocular masivo, lagrimeo, fotofobia y defecto epitelial (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Los principales factores de riesgo para la QA son el uso de lentes de contacto durante un período prolongado, limpieza inadecuada de los lentes de contacto y su estuche, empleo de agua de la llave para el lavado de los lentes, la formación de biopelículas sobre los lentes y los estuches que los contienen, así como nadar en agua contaminada mientras se usan lentes de contacto, además se han asociado con traumatismos corneales. Por lo general es una infección unilateral, es decir solo afecta un ojo, aunque también se ha informado queratitis bilateral (Trabelsi *et al.*, 2014; Bonilla y Ramírez, 2014).

5.3 Infecciones cutáneas

Las infecciones cutáneas por *Acanthamoeba* son consideradas poco frecuentes. Se caracterizan por deteriorar la epidermis, dermis e hipodermis. Las infecciones cutáneas son más comunes en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pero también se pueden reportar en pacientes inmunodeprimidos, se desconoce si las lesiones cutáneas son el foco primario de infección o si son el resultado de la diseminación vía hematológica desde otro sitio de infección. Omaña-Molina y colaboradores (2017) a través de un modelo murino de infección en piel,

sugieren que la piel en es una vía de infección que conduce a una diseminación hematológica al sistema nervioso central. La forma cutánea de la enfermedad se caracteriza por la presencia de nódulos eritematosos o úlceras cutáneas que a menudo se encuentran en las extremidades inferiores. En la biopsia de la piel hay una intensa inflamación en la dermis con presencia de trofozoítos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Torno *et al.*, 2000; Cope, 2020).

5.4 Endosimbiosis

Debido a que las amibas del género *Acanthamoeba* son ubicuas en la naturaleza, interactúa con una gran variedad de microorganismos. Se ha demostrado que actúa como “Caballo de Troya”, albergando una gran cantidad de especies virales, bacterianas y fúngicas. Se estima que el 22% de todos los aislamientos de *Acanthamoeba* contiene una especie patógena adicional. Al transferir bacterias intracelulares, las amibas contribuyen a la propagación de enfermedades peligrosas para los humanos. En muchos casos, las bacterias dentro de las amibas sobreviven más tiempo y se multiplican, mostrando una mayor virulencia (Enriquez *et al.*, 2021; Guimaraes *et al.*, 2016; Borecka *et al.*, 2020). Las bacterias más relevantes son: *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli* O157, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, entre otras. Virus como Mimivirus, coxsackievirus, adenovirus, poliovirus, echovirus, enterovirus (Siddiqui y Khan, 2012).

Varios tipos de hongos pueden también sobrevivir y replicarse intracelularmente, destacando *Cryptococcus* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides* y *Sporothrix schenckii* (Goncalves *et al.*, 2019).

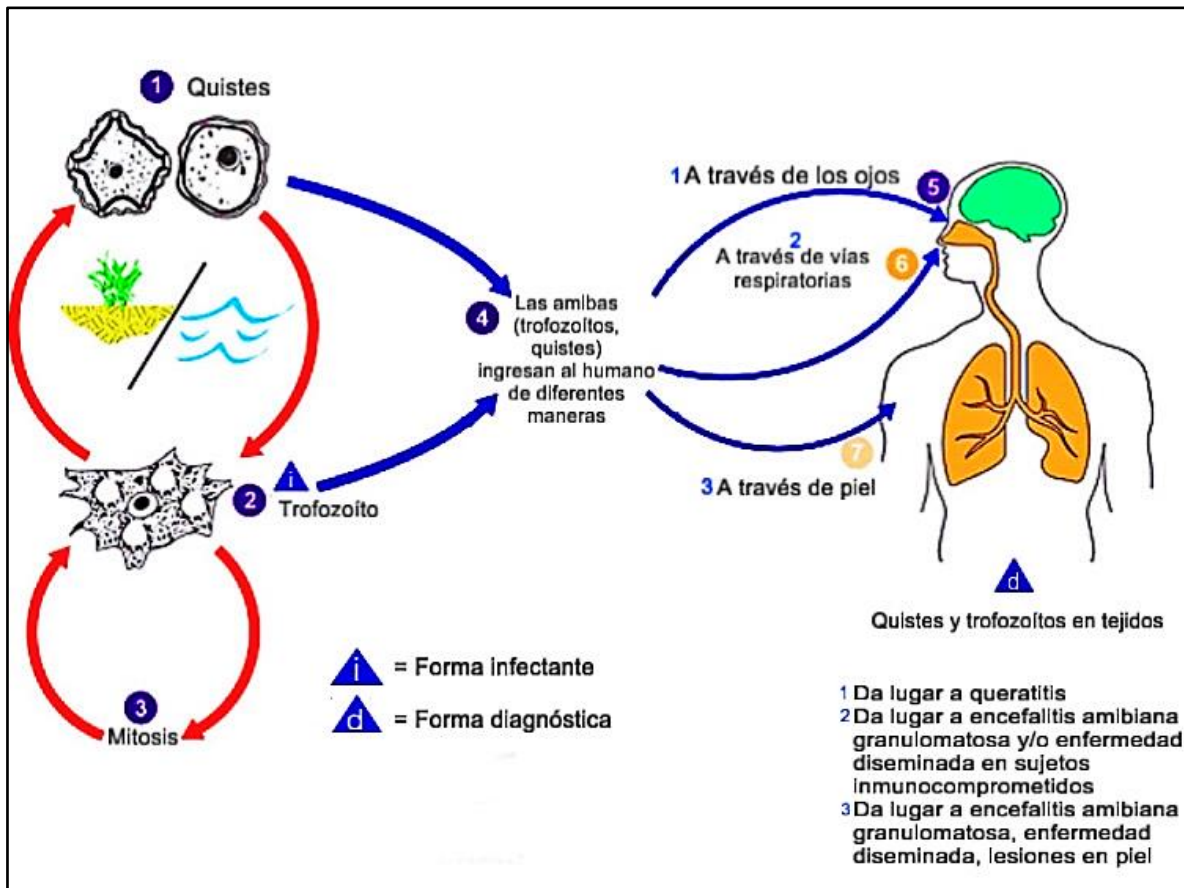


Figura 3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. y patologías que produce (CDC, traducido al español).

5.5 Epidemiología

La verdadera incidencia de las infecciones por *Acanthamoeba* es difícil de determinar debido a la experiencia diagnóstica limitada, la falta de recursos adecuados para el diagnóstico, la falta de seguimiento, falta de sistemas sanitarios adecuados y las bajas tasas de autopsias. Es posible que los casos no se notifiquen en países sin atención médica universal debido a problemas de accesibilidad (Singh *et al.*, 2006; Bouten y Eischeikha, 2022). El número de casos reportados de individuos de EAG entre 1960 hasta el año 2000 fue de 200 de EAG y más de 3000 para QA (Schuster y Visvesvara, 2004).

5.6 Diagnóstico

El cuadro clínico de *Acanthamoeba* es similar al de otros agentes infecciosos y pueden predisponer a los pacientes a un diagnóstico y tratamiento tardío (Lee *et al.*, 2020). El diagnóstico de las enfermedades por *Acanthamoeba* suelen ser un desafío ya que se puede confundir con otras enfermedades; EAG comúnmente se diagnostica como neurotuberculosis, neurocisticercosis o encefalitis viral. QA se ha diagnosticado erróneamente como una queratitis viral o fúngica o queratitis dendrítica causada por el virus del herpes simple, mientras que las infecciones en piel han sido mal diagnosticadas como angiomas bacilar (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; Visvesvara *et al.*, 2007; Khalife *et al.*, 1994). Para el diagnóstico de EAG se han utilizado tomografías computarizadas y resonancias magnéticas que demuestran la presencia de lesiones únicas o múltiples (Martínez y Visvesvara, 1997).

Las técnicas de diagnóstico para la QA incluyen microscopía confocal, cultivo en placa, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y frotis usando raspado/biopsia corneal (Maycock y Jayaswal, 2016). También, pueden diferenciarse por técnicas de inmunofluorescencia de secciones de tejido utilizando suero de conejo anti-*Acanthamoeba*. Mientras que para el diagnóstico de infecciones en piel se realizan exámenes histológicos. (Visvesvara y Maguire, 2006).

5.7 Tratamiento

No hay tratamiento de elección contra *Acanthamoeba*, se han informado varios regímenes combinados diferentes. El tratamiento de EAG es un problema, debido a la falta de síntomas definidos, la falta de una buena prueba de diagnóstico confiable y el hecho de que el diagnóstico a menudo se realiza *post mortem*. Los fármacos que se han utilizado en diversas combinaciones para EAG incluyen pentaminida, sulfadiazina, trimetropim-sulfametoxazol, flucitosina, fluconazol y miltefosina. (Nelsón y Singh, 2018). Mientras que entre los medicamentos utilizados para la QA están las biguanidas y las diamidinas. Las biguanidas alteran la membrana citoplasmática y dañan los componentes celulares.

La biguanida más utilizada es polihexametileno biguanida. También se han utilizado fármacos como isetionato de propamidina, polimixina B, clotrimazol, ketoconazol, miconazol, itraconazol y voriconazol (Wang y Jacobs, 2022; Schuster y Visvesvara, 2004; Cabello-Vilchez *et al.*, 2014). Las infecciones cutáneas también se han tratado con formulaciones tópicas de clorhexidina, ketoconazol y miltefosina (Hasbun, 2021).

5.8 Prevención

Debido a que EAG ocurre en huéspedes con funciones inmunitarias debilitadas, no existen métodos definidos para la prevención de la infección con estas amibas. Sin embargo, en el caso de la QA, debido a que los lentes de contacto y las soluciones para el cuidado de estos son factores de riesgo conocidos, es importante educar a los usuarios de lentes de contacto sobre el cuidado adecuado de estos (Visvesvara, 2007).

Para evitar la QA lentes de contacto y el recipiente que los contiene deben mantenerse limpios. Los usuarios de lentes de contacto deben seguir las instrucciones y recomendaciones de los fabricantes y profesionales del cuidado de los ojos. Se debe evitar el uso de lentes de contacto durante la natación u otros deportes acuáticos (Cope, 2020). ya que *Acanthamoeba* puede crecer y colonizar tanques de agua caliente, jacuzzis, filtros de agua portátiles y estaciones de lavado de ojos, se recomienda la inspección y limpieza periódicas de estos sistemas (Visvesvara, 2007).

6. *Naegleria fowleri*

El género *Naegleria* consiste en un grupo de ameboflagelados que se encuentran en diversos hábitats en todo el mundo, *Naegleria australiensis* y *Naeglegleria italica*, pueden causar infección en animales de experimentación, pero no se han asociado con enfermedades en humanos (De Jonckheere, 2004). Se han aislado más de 47 especies, pero solo *Naegleria fowleri* se ha asociado con enfermedades humanas (Marciano-Cabral y Cabral, 2007; De Jonckheere, 2014).

6.1 Clasificación y taxonomía

Se han propuesto diferentes sistemas de genotipado basados en diferentes dianas genéticas para clasificar a *N. fowleri*, entre los que se destaca el ARN ribosómico 5.8S (ARNr 5.8s) y los espaciadores transcritos internos (ITS1) que clasifican a *N. fowleri* en ocho genotipos (T1-T8) (De Jonckheere, 2011).

El genotipo T3 es la cepa más abundante. Sin embargo, hasta el momento no hay suficiente evidencia para concluir que existe alguna asociación entre el genotipo y la virulencia de *N. fowleri* (De Jonckheere, 2011; Soontrapa *et al.*, 2022).

Tabla 2. Taxonomía de *Naegleria* acorde con la clasificación de Adl *et al.*, 2019

Eukarya	
Supergrupo	Excavata
Superphylum	Discoba
Phylum	Heterolobosea
Subphylum	Tetramitida
Familia	Vahlkampfiidae
Género	<i>Naegleria</i>

6.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Naegleria* incluye las etapas: ameboide, flagelar y quística. Aunque el quiste es resistente al estrés ambiental, es más frágil en comparación con los quistes de *Acanthamoeba* (Visvesvara *et al.*, 2007).

6.2.1 Trofozoíto

El trofozoíto mide de 10 a 25 μm , presenta proyecciones citoplasmáticas denominados lobópodos relacionados con la locomoción. Tiene un núcleo vesicular con un núcleo prominente ubicado en el centro, el citoplasma contiene numerosas mitocondrias, ribosomas, vacuolas alimenticias y vacuola contráctil (Marciano-Cabral, 1988; Visvesvara *et al.*, 2007).

6.2.2 Etapa flagelar

El trofozoíto se transforma en una etapa flagelada, generalmente con dos flagelos, cuando cambia la concentración iónica del medio, tiene una longitud de 10 a 16 μm . La etapa flagelada temporal en forma de pera no se divide ni se alimenta, por lo general, vuelve a la forma ameboide en una hora o menos. Se cree que el flagelado desempeña un papel en la dispersión de la amiba en su hábitat de suelo y agua (Visvesvara *et al.*, 2007; De Jonckheere, 2002).

6.2.3 Quiste

El trofozoíto se transforma en quiste resistente cuando el suministro de alimentos disminuye y/o las condiciones de crecimiento se vuelven adversas, tiene un tamaño de 15-30 μm . Suele ser esférico y de doble pared con un endoquiste grueso y un ectoquiste delgado próximo. La pared del quiste tiene poros (Visvesvara *et al.*, 2007; Schuster y Visvesvara, 2004; Trabelsi, 2012).

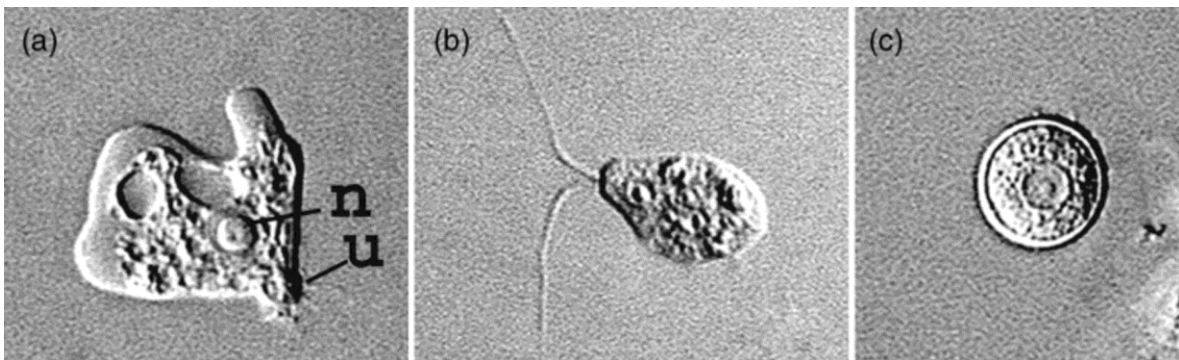


Figura 4. Estadios del ciclo de vida de *Naegleria fowleri*: (a) trofozoíto, n (núcleo) u (uroide) (b) flagelado y (c) quiste. (Visvesvara *et al.*, 2007).

6.3 Distribución

Las amibas del género *Naegleria* habitan en el suelo y el agua, aunque no tienen una distribución tan amplia como *Acanthamoeba*. En general, son más sensibles a las condiciones ambientales y no pueden sobrevivir en agua de mar ya que no toleran altas condiciones de salinidad (De Jonckheere, 2002; Stahl y Olson, 2021). *N. fowleri* se encuentra en todos los continentes excepto en la Antártida, proliferan con éxito en cuerpos de agua naturales durante los meses cálidos del año, está asociada con temperaturas elevadas, de hasta 45 °C (De Jonckheere, 2011). Asimismo, *N. fowleri* se ha asociado con sistemas de agua construidos por el hombre incluidos pozos y sistemas de distribución de agua potable como grifos (Blair *et al.*, 2008; Cope *et al.*, 2015). En países templados, *N. fowleri* se encuentra típicamente en aguas artificiales (torres de enfriamiento de centrales eléctricas) o naturalmente (áreas geotérmicas). Es probable que la disponibilidad de alimento adecuado sea un determinante importante en la distribución de *N. fowleri* (Maciver *et al.*, 2020).

6.4 Importancia médica

Naegleria fowleri es agente causal de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), una enfermedad fulminante que afecta principalmente niños y adultos. Aunque la enfermedad es rara, tiene una tasa de mortalidad del 98% (Milanes *et al.*, 2019).

La infección se desarrolla cuando el agua contaminada con *N. fowleri* ingresa a las fosas nasales durante la natación u otras actividades acuáticas recreativas (Figura 6). La infección no puede iniciarse bebiendo agua contaminada. Es un riesgo para la salud durante las estaciones de clima cálido, ya que esta amiba es termófila y su temperatura óptima de proliferación puede alcanzar los 40°C o incluso los 45°C. Por lo tanto, la tasa de infección es mayor durante la temporada de verano (Visvesvara, 2013; De Jonckheere, 2011; Bright y Gerba, 2017; Shakeel *et al.*, 2016).

Esta infección ocurre primero por la unión de la amiba a la mucosa nasal, luego se desplaza a lo largo del nervio olfatorio, migrando a los bulbos olfatorios a través de la lámina cribosa hasta llegar al Sistema nervioso central (SNC).

Una vez que llega al cerebro, pueden proliferar e inducir una reacción inflamatoria aguda provocando la muerte del paciente en una semana aproximadamente (Jahangeer *et al.*, 2020; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008).

El periodo de incubación de la infección por *N. fowleri* suele ser de 4 a 7 días. El paciente presenta síntomas como dolor de cabeza, náuseas, vómitos, fiebre, desorientación (Díaz *et al.*, 2011). De 24 a 48 h después se presentan cambios en el estado mental, actividad convulsiva y pérdida de la conciencia como delirio y confusión. Se han informado síntomas tempranos de sensación anormal del olfato, los síntomas dependen del tamaño del inóculo, de la inmunocompetencia del hospedero y de la virulencia del microorganismo (Roos, 2007; Visvesvara, 2013).

Microscópicamente, las regiones afectadas suelen mostrar un escaso infiltrado inflamatorio que contiene predominantemente leucocitos polimorfonucleares, algunos linfocitos y un gran número de trofozoítos. Las autopsias de pacientes con MEAP han revelado inflamación cerebral con daño tisular severo en el área de invasión, ulceración de la mucosa olfativa, necrosis hemorrágica en la corteza y se observan numerosos trofozoítos dentro del tejido nervioso necrótico (Guarner *et al.*, 2007; Visvesvara, 2013).

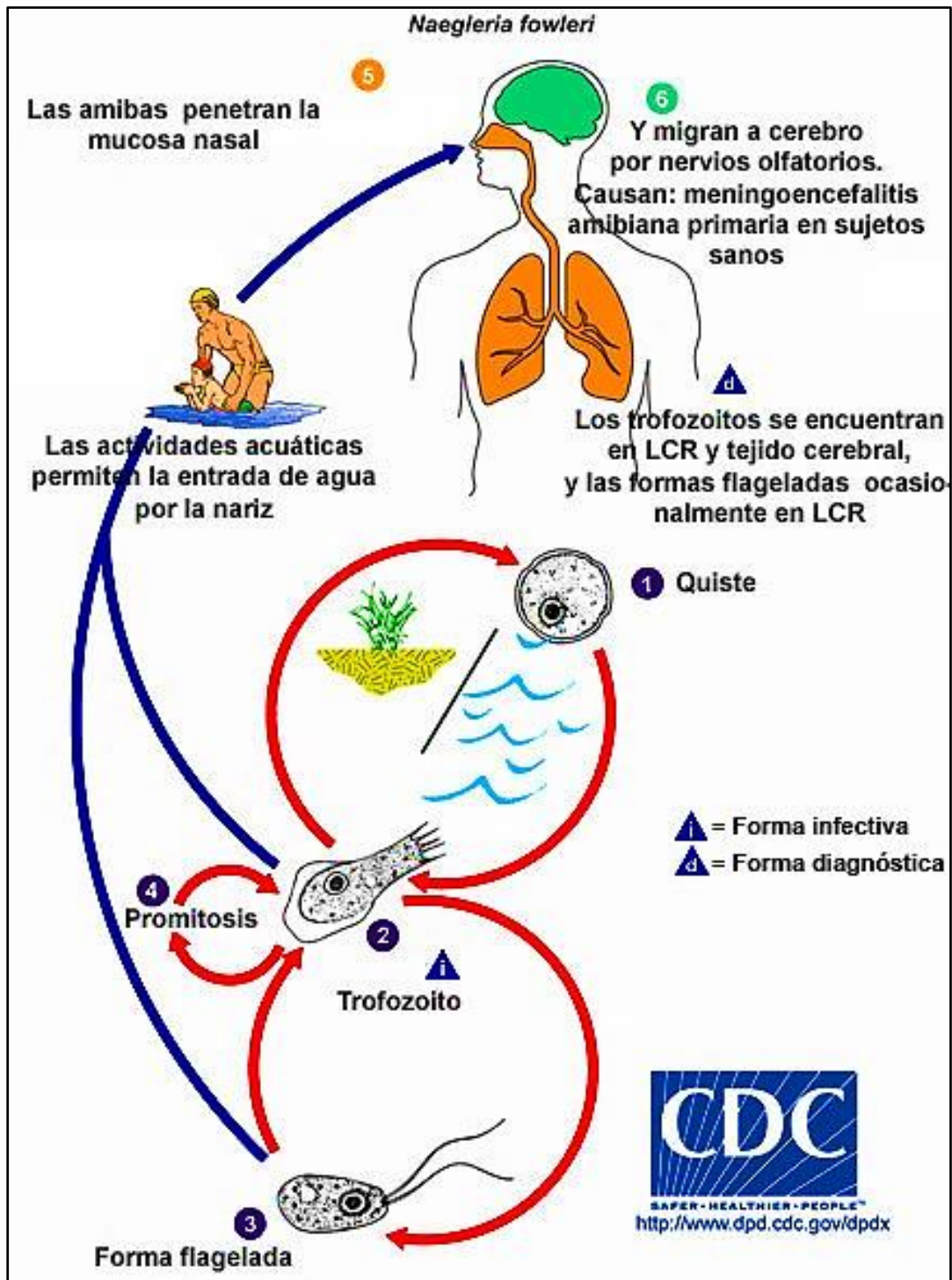


Figura 5. Ciclo de vida *Naegleria fowleri* (CDC, traducido al español).

6.5 Epidemiología

Las infecciones por MEAP pueden ocurrir con más frecuencia en las zonas tropicales. Aunque, la mayoría de los casos conocidos se notifican en zonas subtropicales o incluso templadas, probablemente se deba a mejores servicios de salud pública en las zonas templadas, mientras que en las zonas tropicales las infecciones por MEAP pueden pasar desapercibidas entre los millones de otras infecciones (De Jonckheere, 2011).

Se han identificado 381 casos de MEAP causados por *N. fowleri* hasta 2018, el mayor número de casos de exposición se informó en Estados Unidos (156), Pakistan (41) y México con un registro aproximado de 33 casos, 23 de ellos en Mexicali, los restantes distribuidos en Sonora, Monterrey, Michoacán y Tamaulipas (Ghapure *et al.*, 2021; Bonilla y Ramírez, 2014).

Existe una fuerte sospecha de que MEAP sea una enfermedad más común de lo que se indica en la actualidad, especialmente donde las condiciones para *N. fowleri* tienden a ser favorables y donde MEAP pueda estar enmascarada por otras enfermedades (Maciver *et al.*, 2020).

6.6 Diagnóstico

Durante las etapas iniciales de la infección, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) suelen revelar edema cerebral, borramiento de los surcos corticales y daño alrededor del mesencéfalo y el espacio subaracnoideo. Una vez que la infección progresa, estas condiciones suelen empeorar, revelando áreas necróticas, estenosis y aneurismas (Bellini *et al.*, 2018).

Una preparación en fresco del Líquido cefalorraquídeo (LCR) debe examinarse inmediatamente bajo el microscopio para detectar la presencia de trofozoítos en movimiento activo. Los frotis de LCR deben teñirse con tinción de Giemsa o de Wright para identificar el trofozoíto (Visvesvara y Maguire, 2006). El teñido con Giemsa o Wright revela la presencia de la amiba y permite un análisis morfológico del parásito. *N. fowleri* se puede cultivar transfiriendo pocas gotas de LCR a una placa de agar (Güémez y García, 2021).

6.7 Tratamiento

La anfotericina B ha sido el fármaco más utilizado para el tratamiento de la MEAP. Todos los casos recientes que informan sobre el éxito del tratamiento han administrado este compuesto por vía intravenosa e intracraneal, o en combinación con otros medicamentos como fluconazol, azitromicina y rifampicina han demostrado cierta eficacia para eliminar los trofozoítos, cuando se administra durante las primeras etapas de la enfermedad (Capewell *et al.*, 2015).

6.8 Prevención

Debido a que *N. fowleri* es susceptible al cloro, se recomienda la cloración de piscinas y parques acuáticos para prevenir la MEAP (Güémez y García, 2021).

Los lagos y los ríos no se pueden clorar, se debe evitar realizar actividades recreativas como natación o buceo, especialmente durante los meses de verano. De lo contrario se recomiendan los tapones nasales para evitar que la amiba ingrese a la cavidad nasal. También, se debe evitar excavar o remover el sedimento que se encuentra en la parte poco profunda de estos cuerpos de agua. Además, las autoridades locales deben monitorear constantemente la presencia de *N. fowleri* en áreas de alto riesgo. Si se detectara la amiba, deberían colocar advertencias para evitar que las personas ingresen al agua (Visvesvara *et al.*, 2007).

7. *Naegleria lovaniensis*

Naegleria lovaniensis se ha mencionado y estudiado a través del tiempo porque es la única especie termófila no patógena que muestra una estrecha relación evolutiva con *N. fowleri* (Di Filippo *et al.*, 2017). Es identificada principalmente como una variante no patógena de *N. fowleri* debido a que cepas aisladas del medio ambiente reaccionan positivamente a anticuerpos contra *N. fowleri*, pero no es patógena para animales de experimentación. *N. lovaniensis* comparte con *N. fowleri* varias características biológicas: la termofilia, debido a que crecen a una temperatura máxima de 45°C y son morfológicamente similares. Asimismo, ambas especies tienen una distribución mundial (Pernin *et al.*, 1992; De Jonckheere, 2002).

7.1 Distribución

Como *N. fowleri* está estrechamente relacionada, esta especie se reporta en todos los continentes en aguas cálidas. Considerando las condiciones ecológicas similares para su proliferación. *N. lovaniensis* podría considerarse como un indicador de la presencia de *N. fowleri*, por lo que su hallazgo puede sugerir un riesgo para la salud pública en la zona (Di Filippo *et al.*, 2017).

8. Mecanismos de patogenicidad de amibas anfitriónicas

Gran parte del daño causado por los trofozoítos de *Acanthamoeba* en el curso de las infecciones corneales o cerebrales es el resultado de diferentes mecanismos de patogenicidad; dependientes e independientes de contacto (Visvesvara *et al.*, 2007).

8.1 Mecanismos de patogenicidad dependientes de contacto

La adhesión de trofozoítos es un paso primario en la patogenia de *Acanthamoeba* y está mediado por la proteína de manosa de 130 kDa expresada en la superficie de la amiba, solo los trofozoítos expresan esta proteína, mientras que los quistes carecen de ella, por lo que no pueden unirse a las células del hospedero. Otra adhesina importante de *Acanthamoeba* es la proteína de unión a laminina (LBP por sus siglas en inglés) que permite una mayor progresión en hospedados infectados (Garate *et al.*, 2004; Duggal *et al.*, 2017; Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). Posteriormente, se lleva a cabo la migración hacia las uniones celulares en donde por efecto mecánico o enzimático penetran a las capas más profundas y fagocitan células (Omaña-Molina *et al.*, 2013). Por otro lado, en la superficie de los trofozoítos de *N. fowleri* se encuentran presentes residuos de D-manosa, L-fucosa y D-glucosa, los cuales participan en la adherencia de la amiba al neuro epitelio nasal. También se ha detectado que los trofozoítos emplean una integrina (60kDa) para adherirse a elementos de la matriz extracelular como la fibronectina (Carrasco-Yépez *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2004).

8.2 Fagocitosis

La fagocitosis es el mecanismo de internalización en el cual las células capturan e ingieren partículas mayores a 0.5 μm (Freeman y Grinstein, 2014). Juega un papel importante en los mecanismos de patogenicidad de las especies de *Acanthamoeba*, ya que es el mecanismo de adquisición de alimento durante la fase parasitaria (Omaña-Molina *et al.*, 2013).

Asimismo, a través del proceso de fagocitosis las amibas provocan una destrucción severa de los tejidos a través de la formación de estructuras fagocíticas denominadas amebostomas o bocas fagocíticas, descritas como estructuras tipo ventosas, mediante las cuales también trogocitan células en cultivo de tejidos (John *et al.*, 1984; Visvesvara *et al.*, 2007). La formación de estas estructuras está relacionada con la remodelación del citoesqueleto de actina, se ha descrito la presencia de la proteína Nf-actina codificada por el gen *Nf-actina* de manera abundante en el citoplasma, pseudópodos y especialmente en las bocas fagocíticas. La proteína Nfa1 abunda en los pseudópodos de *N. fowleri* que entran en contacto con las células diana, las bocas fagocíticas durante la ingestión de células diana o material lisado y alrededor de las vacuolas digestivas, por lo que se asocia esta proteína para el movimiento amibiano y la ingestión de alimento (Khang *et al.*, 2005; Shon *et al.*, 2010).

Aún no se han dilucidado los mecanismos moleculares de este proceso en las amibas anfitriónicas. Sin embargo, el proceso general se describe a continuación:

8.2.1 Reconocimiento de partículas:

El fagocito debe reconocer la partícula que va a ingerir mediante el uso de receptores específicos. Estos receptores cooperan para un reconocimiento eficiente de la partícula objetivo (Freeman y Grinstein, 2014).

8.2.2 Ingestión de partículas:

Los receptores fagocíticos inician una cascada de señales, y organizan el citoesqueleto de actina alrededor de la partícula que se va a ingerir. Los pseudópodos impulsados por F- actina internalizan la partícula (Freeman y Grinstein, 2014; Garret y Mellman, 2001).

8.2.3 Formación del fagosoma:

Un fagosoma es la vacuola formada para llevar la partícula al interior de la célula. La polimerización de actina es la fuerza que impulsa la extensión de la membrana y la formación de fagosomas (Ostrowski *et al.*, 2016; Freeman y Grinstein, 2018).

8.2.4 Formación del fagolisosoma:

Este proceso es la fusión de un fagosoma con el lisosoma llevando a la digestión la partícula internalizada (Freeman y Grinstein, 2014).

8.3 Trogocitosis

La palabra “*trogo*” proviene del griego y significa “mordisco”, es un proceso en el que una célula adquiere la fracción de otra célula y es mecánicamente diferente a la fagocitosis que implica la internalización de una célula completa (Figura 7). Los roles biológicos de la trogocitosis en eucariotas incluyen: alimentación/adquisición de nutrientes, defensa/autoprotección y patogenicidad (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2021). El proceso de trogocitosis se describió por primera vez en amibas, donde se descubrió como un mecanismo por el cual las amibas matan a otras células. Sin embargo, se ha estudiado en pocos microorganismos y los detalles moleculares son limitados (Bettadapur *et al.*, 2020).

9. Mecanismos independientes de contacto

Dentro de los mecanismos independientes de contacto en *Acanthamoeba* se encuentra la liberación de serina proteasas que inducen la degradación de las proteínas de unión estrecha ZO-1 y ocludina, colágeno tipo I, III, IV, elastina y fibronectina siendo componentes principales de la matriz extracelular (Garate *et al.*, 2004). Anteriormente se reportó que las amibas del género *Acanthamoeba* poseían enzimas hidrolíticas como cisteína proteasas, elastasas, fosfolipasas, entre otras que favorecían la invasión hacia capas más profundas del tejido (Alsam *et al.*, 2005; Siddiqui y Khan, 2012). Sin embargo, las proteasas facilitan el paso de las amibas a través de las uniones celulares, pero no su destrucción (Omaña-Molina *et al.*, 2013). Por otro lado, dentro de los mecanismos independientes de contacto en *Naegleria fowleri* se encuentra la identificación de proteínas como las fosfolipasas que pueden estar involucradas en la lisis de células nerviosas (Barbour y Marciano-Cabral, 2001), las endopeptidasas especializadas en la degradación de gelatina y colágeno tipo IV (Lam *et al.*, 2017). Asimismo, se han reportado proteínas formadoras de poros; Naegleriaporos A y B, asociadas al daño de la membrana citoplasmática (Herbst *et al.*, 2002). Las proteasas, neuraminidasas y fosfolipasas contribuyen a la desmielinización y a la lisis adicional de eritrocitos y las células nerviosas circundantes (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010).

10. Justificación

A través de modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* se han descrito los mecanismos de patogenicidad dependientes de contacto que llevan a cabo *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri*. Hasta el momento se sabe que la fagocitosis y trogocitosis son parte importante de estos mecanismos. No obstante, se desconoce si los procesos fagocíticos y trogocíticos son características biológicas o incrementan una vez que se encuentran en contacto con el tejido blanco. Por lo anterior, es importante determinar si un contacto previo con tejido blanco y una posterior interacción con células blanco (eritrocitos) aumenta o exacerba procesos de fagocitosis y trogocitosis en *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.

11. Hipótesis

La interacción de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp y *Naegleria* spp. con diferentes tejidos blanco incrementa los procesos de fagocitosis y trogocitosis.

12. Objetivos

12.1 General

- Determinar si la interacción de *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp. con diferentes tejidos blanco incrementa procesos fagocíticos y trogocíticos.

12.2 Particulares

- Registrar el número de eventos fagocíticos y trogocíticos que llevan a cabo los trofozoítos en los diferentes tratamientos.
- Determinar el índice eritrofagocítico de *Acanthamoeba* spp y *Naegleria* spp.
- Comparar los procesos fagocíticos y trogocíticos que llevan a cabo las especies en estudio ante los diferentes estímulos.
- Describir las estructuras fagocíticas que emiten los trofozoítos durante los procesos fagocíticos.

13. Metodología

13.1 Cultivo amibiano

Todos los ensayos se llevaron a cabo con amibas cosechadas en fase exponencial de crecimiento y se desprendieron de la pared de las botellas de cultivo con agua-hielo durante 10 minutos.

Se trabajó con tres especies de amibas anfitriónicas; *Acanthamoeba castellanii* aislada de lente de contacto de un caso clínico de queratitis amibiana, *Acanthamoeba culbertsoni* (ATCC 30171), *Naegleria fowleri* (ATCC 30808) y la especie no patógena *Naegleria lovaniensis* (ATCC 30569). Las cuales se cultivaron en medio axénico PYG para el género *Acanthamoeba* a temperatura 30°C y medio Bacto Casitona suplementado con suero fetal bovino al 10% para *Naegleria* a temperatura 37 °C.

13.2 Obtención de tejido blanco

Para facilitar la observación de la interacción de amibas, el tejido blanco se organizó en líneas discontinuas (micropatrones).

13.2.1 Tejido cerebral

El tejido cerebral se obtuvo por disección del cerebro de un ratón BALB/c, el cual se maceró por 10 min en mortero. 1 g de este tejido se resuspendió en PBS y se centrifugó a 400 x g para recuperar el sobrenadante.

13.2.2 Fibronectina

Este tejido fue donado por el laboratorio número 9 de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV IPN.

13.3 Elaboración de micropatrones

Los micropatrones se realizaron mediante una modificación en la técnica propuesta por Sierra-López y colaboradores (2018) en placas de 24 pozos. Se depositó 1 µl de tejido blanco en la superficie correspondiente para distribuirlo con un raspador de células cubierto con nitrilo. Anexo 1.

13.4. estrategia experimental

Los trofozoítos se estimularon con los diferentes tejidos blanco estableciendo los siguientes grupos de estudio:

Grupos control

- Trofozoítos en medio axénico (Control -)
- Trofozoítos en contacto con eritrocitos, sin estímulo previo con tejido blanco (Control +)

Grupos experimentales

- Trofozoítos interaccionados con tejido cerebral como estímulo inicial + eritrocitos como segundo estímulo
- Trofozoítos interaccionados con fibronectina como estímulo inicial + eritrocitos como segundo estímulo

13.4.1 interacción de trofozoítos con el tejido blanco

La interacción se llevó a cabo con el tejido blanco obtenido de cerebro o fibronectina, organizado en forma de micropatrones previamente elaborados en placas de 24 pozos. Se colocaron 1.5×10^5 trofozoítos con 1ml de medio de cultivo por pozo. La interacción se llevó a cabo por 30 min a temperatura óptima de crecimiento de cada una de las cepas en estudio.

13.4.2 interacción con eritrocitos de sangre humana

Posterior a la interacción de los trofozoítos con tejido blanco, se adicionaron eritrocitos en una relación 1:4 y se incubaron por o durante una hora.

13.4.3 Análisis de la interacción

Se hicieron videograbaciones mediante microscopía de luz en un invertoscopio (Boeco Germany) con duración de 5 min en 5 campos seleccionados al azar y Se llevó a cabo un análisis cualitativo en el que se describieron los procesos fagocíticos y trogocíticos así como la descripción morfológica de las estructuras que se emitieron estos procesos.

13.4.3.1 Análisis cuantitativo

En las videograbaciones descritas previamente se realizó también el conteo de 100 trofozoítos con 5 repeticiones por grupo experimental y controles, de los cuales, a su vez se contabilizaron los trofozoítos fagocitando y/o trogocitando, así como el número de estructuras fagocíticas emitidas por cada trofozoíto.:

El índice fagocítico se determinó acorde con la siguiente formula:

$$\text{índice fagocítico} = \frac{\text{Número de eritrocitos internalizados}}{\text{Número de trofozoítos que eritrofagocitaron}}$$

14. Resultados

El análisis de los resultados de las videograbaciones de la interacción de los trofozoítos con el tejido blanco permitió describir la emisión de estructuras durante los procesos fagocíticos, trogocíticos, así como determinar diferencias interespecíficas e intergénero. Los resultados se resumen en el cuadro 3, mismos que se detallarán en párrafos posteriores.

Cuadro 3. Estructuras que emiten, y procesos fagocíticos y/o trogocíticos de las especies o amibas en estudio ante eritrocitos humanos post estimulación con tejido blanco. con tejido blanco.

Especies	Fagocitosis	Trogocitosis	Estructuras fagocíticas		
			Amebostomas (Bocas de gran tamaño)	Delgadas	
				Cortas	Alargadas
<i>A. castellanii</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>A. culbertsoni</i>	X	✓	✓	✓	✓
<i>N. fowleri</i>	X	✓	✓	X	✓
<i>N. lovaniensis</i>	✓	✓	✓	✓	✓

14.1 Análisis cuantitativo de los procesos fagocíticos

El proceso de fagocitosis solo se presentó en *A. castellanii* y *N. lovaniensis*. Para determinar el porcentaje de trofozoítos que llevaron a cabo procesos de fagocitosis se cuantificó el número de trofozoítos con eritrocitos internalizados. Se observa que un mayor número de trofozoítos que interaccionaron con fibronectina eritrofagocitaron, con respecto a aquellos que interaccionaron con el cerebro o el grupo control cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 6).

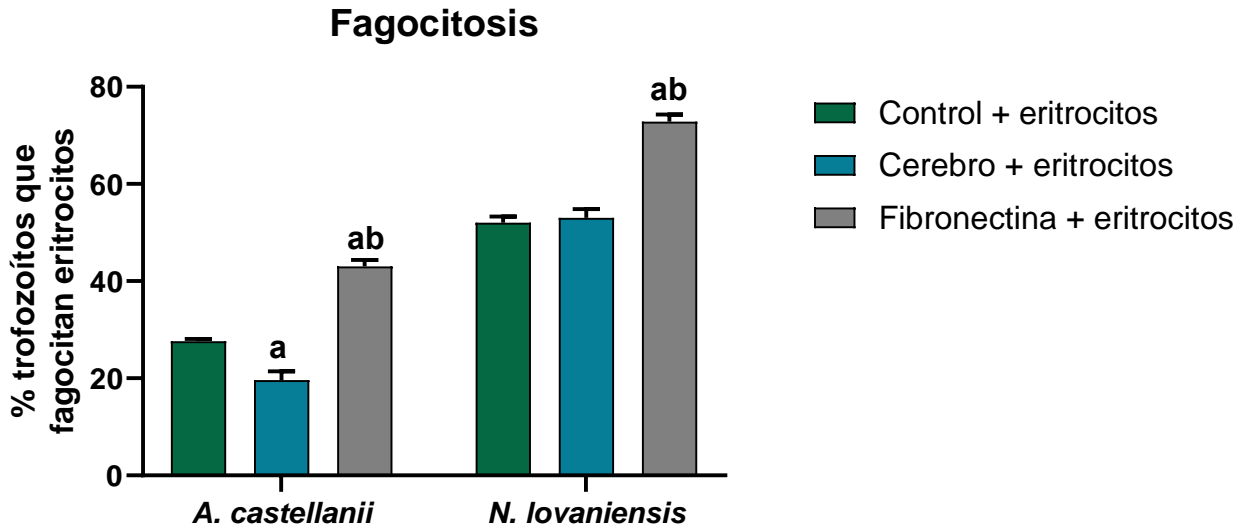


Figura 6. Porcentaje de trofozoítos que eritrofagocitaron post interacción con tejido blanco; cerebro y fibronectina durante 30 min. La interacción con eritrocitos se realizó durante 1h. Control + trofozoítos sin previo contacto con tejido blanco $p < 0.05$ diferencias significativas. a: diferencia significativa contra el control y b: diferencia significativa contra el grupo expuesto a tejido cerebral.

14.2 Análisis cualitativo de los procesos fagocíticos

Para calcular el índice fagocítico se contabilizó el número de eritrocitos internalizados por trofozoíto tanto en el grupo control como en los grupos experimentales. Los resultados se muestran en la figura 7, se observa que los trofozoítos de *A. castellanii* que interaccionaron previamente con tejido cerebral, eritrofagocitaron significativamente menos que aquellos que solo se interaccionaron con los eritrocitos como estímulo inicial (control +), observando una diferencia significativa al evaluar la interacción de trofozoítos con fibronectina como estímulo inicial. Mientras que, en *N. lovaniensis* se observa una diferencia significativa del grupo de trofozoítos en contacto previo con fibronectina respecto al grupo control y al grupo interaccionado con tejido cerebral.

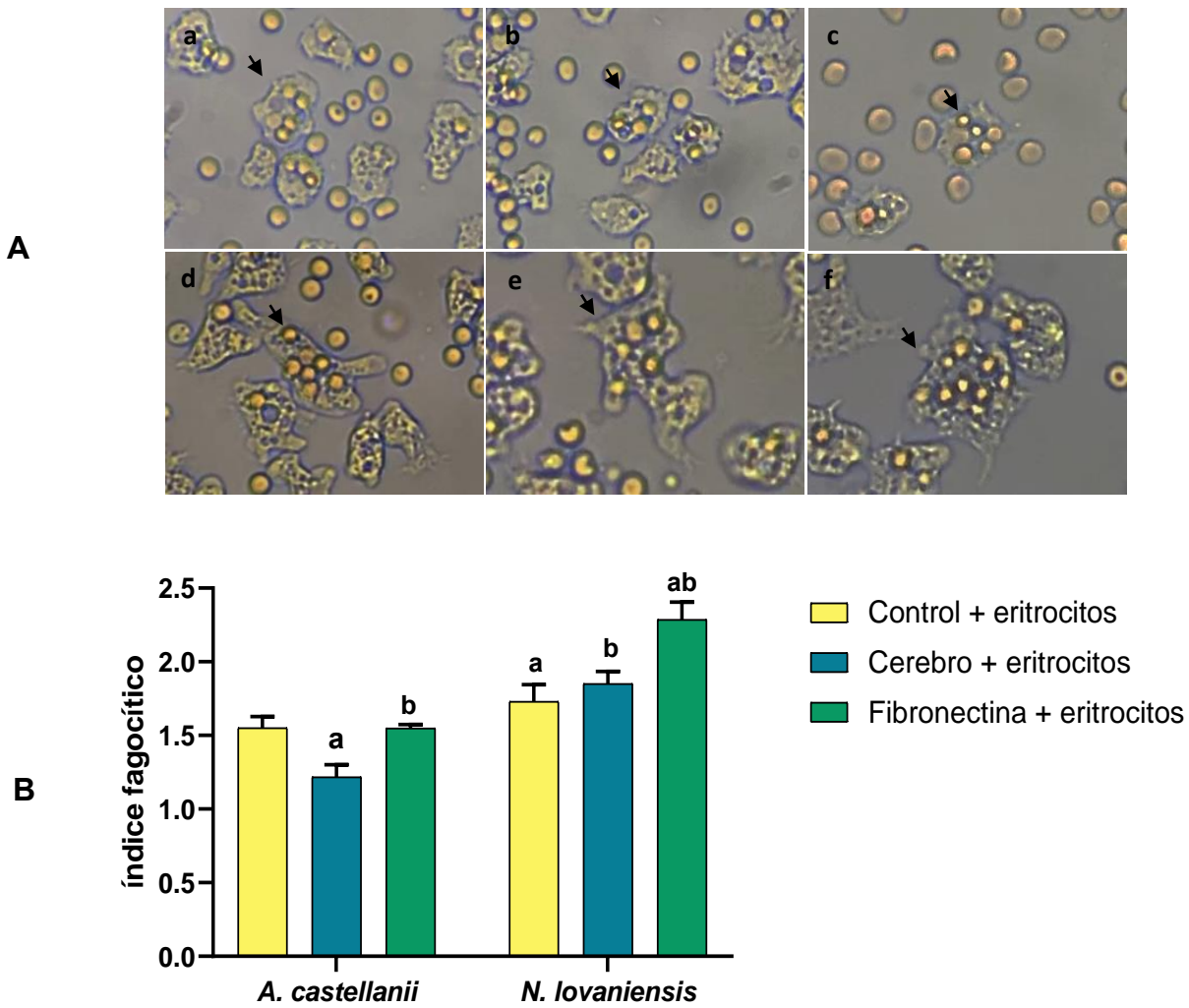


Figura 7. A. Micrografías de trofozoitos representativos que más eritrocitos fagocitaron *A. castellanii* (a-c) y *N. lovaniensis* (d-f). Se observa una mayor cantidad de eritrocitos internalizados en los trofozoitos con previa interacción con fibronectina, *A. castellanii* fagocitó hasta seis eritrocitos (c) y *N. lovaniensis* hasta diez (f). B. Índice fagocítico en interacción con tejido blanco; cerebro y fibronectina durante 30 min, con una post interacción con eritrocitos durante 1h. Como control + se utilizó un cultivo con trofozoitos interaccionados con eritrocitos $p < 0.05$ diferencias significativas. a: diferencia significativa contra el control y b: diferencia significativa contra el grupo expuesto a tejido cerebral

Los trofozoítos de *A. castellanii* y *N. lovaniensis* se mostraron más activos cuando se utilizó fibronectina como tejido blanco y se mantuvo después de adicionar los eritrocitos, de tal manera que se observó completo el proceso de eritrofagocitosis. Sin embargo, este proceso no se observó de manera completa en los grupos experimentales y grupo control.

14.2.1 *A. castellanii*

Los trofozoítos de *A. castellanii* entraron en contacto con los eritrocitos a partir del segundo 30, (Figura 8a, b y c), después se observa la formación de una boca fagocítica alargada (Figura 8 d y e) seguido de la internalización completa del eritrocito (Figura 8 f, g y h), posteriormente al tiempo 270 seg. el mismo trofozoíto lleva a cabo el proceso de trogocitosis emitiendo una boca fagocítica pequeña (Figura 8i).

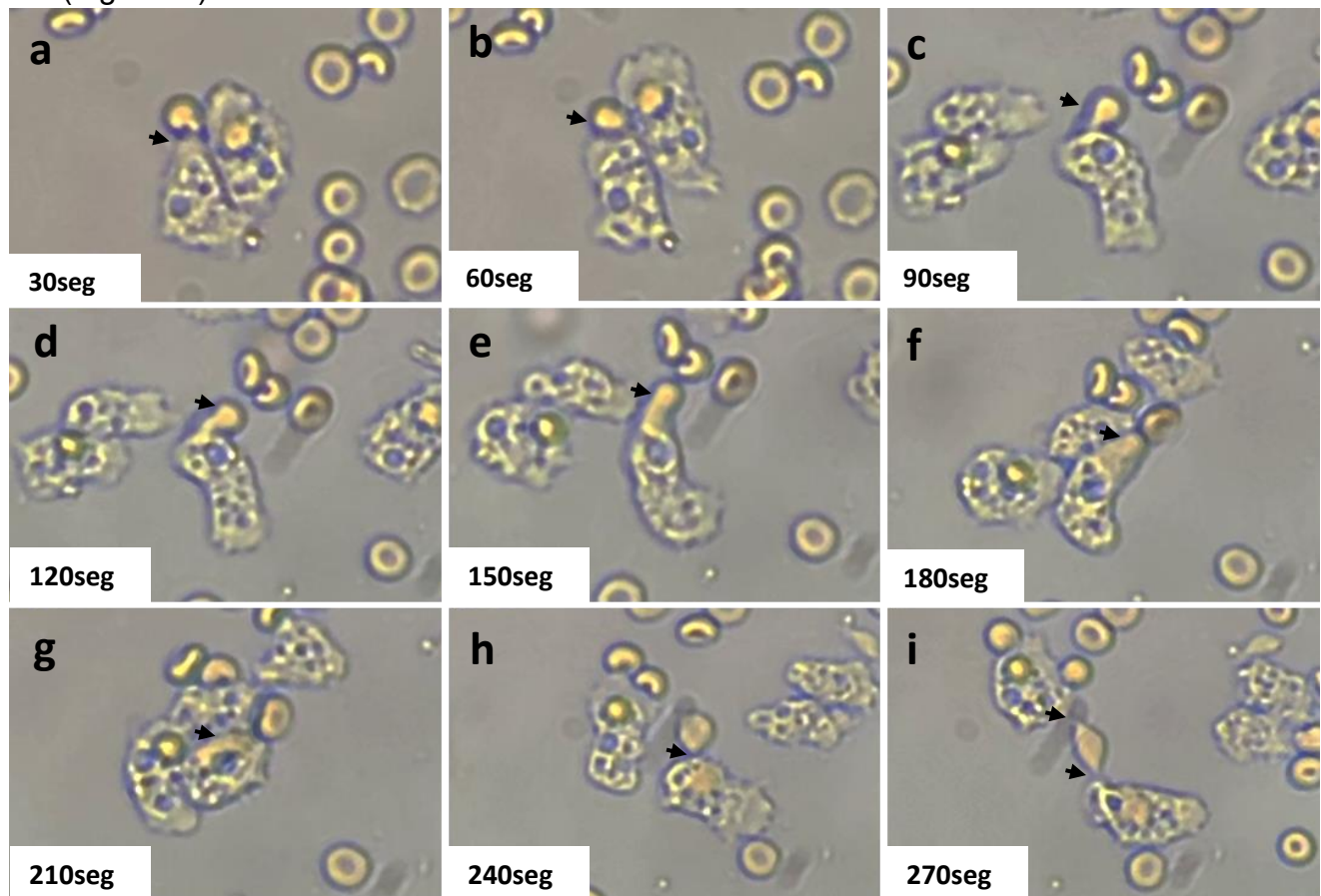


Figura 8. Secuencia de eventos de la eritrofagocitosis de *A. castellanii* documentada a través de una videograbación de 5 min con registros de cada 30s. Se muestra el contacto con eritrocitos (a, b y c) formación de una boca fagocítica alargada (d, e y f) y después la internalización completa del eritrocito (f, g y h), posteriormente la amiba lleva a cabo el proceso de trogocitosis emitiendo una boca fagocítica pequeña (i). 40x.

14.2.2 *N. lovaniensis*

Durante la interacción de los trofozoítos de *N. lovaniensis* con fibronectina y eritrocitos se observó un proceso atípico de eritrofagocitosis. Un trofozoíto entró en contacto con el eritrocito a través de una proyección ancha cuyo diámetro era semejante al del eritrocito y cuya longitud era aproximadamente la mitad del trofozoíto (Figura 9a), no obstante, no la fagocitó, sino que dirigió la proyección hacia una boca fagocítica (Figura 9b) internalizando el eritrocito a los 160 s (Figura 9d), finalmente se observó el eritrocito internalizado (Figura 9 e y f).

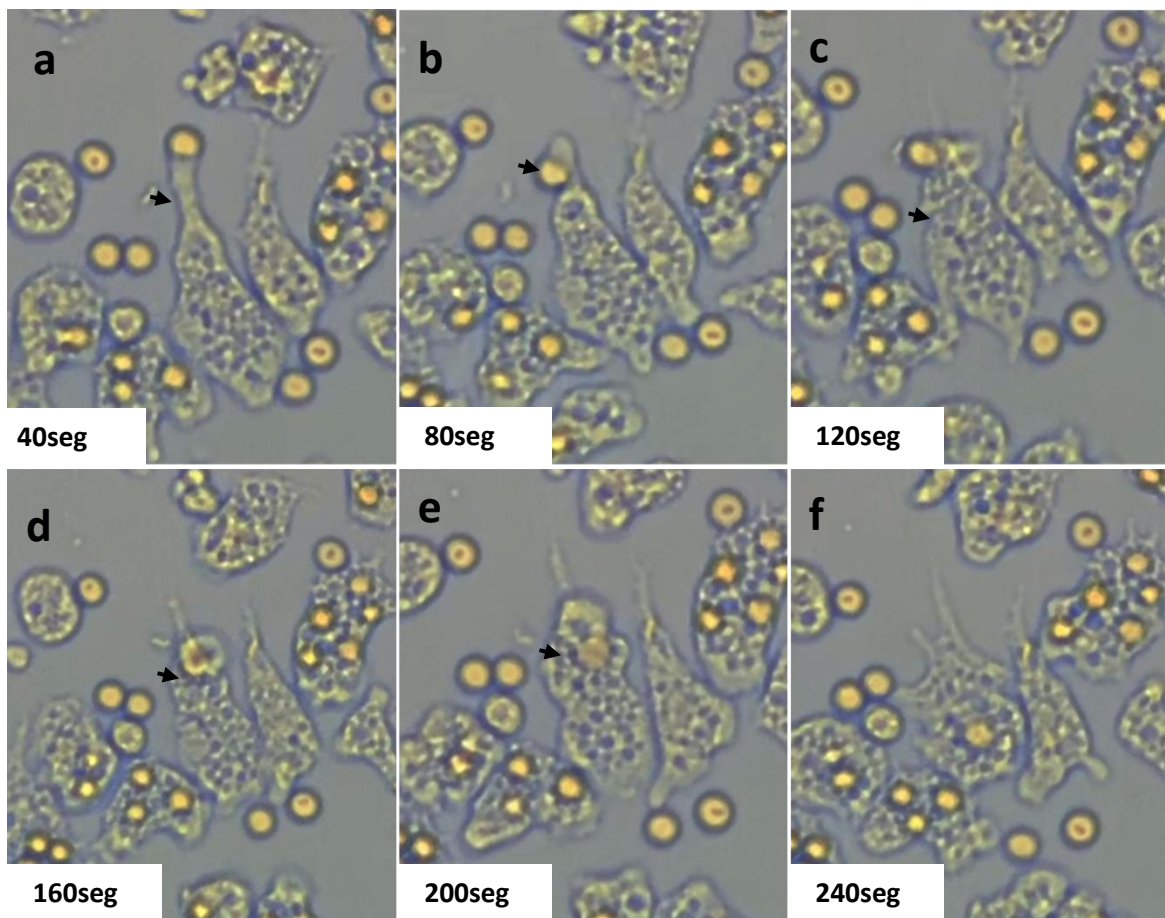


Figura 9. Micrografía del proceso completo de eritrofagocitosis de *Naegleria lovaniensis* documentado en videograbación de 5 min y registrado en secuencia cada 40s, con un estímulo previo con fibronectina durante 30 min y un contacto con eritrocitos de 1h. Se observó la formación de una proyección alargada que entró en contacto con el eritrocito la cual dirigió hacia una boca fagocítica y después la internalización completa del eritrocito. 40x.

14. 3 Análisis cualitativo del proceso de trogocitosis

La trogocitosis fue un proceso común entre las amibas en estudio, la cual se llevó a cabo incluso en aquellos trofozoítos que eritrofagocitaron previamente y en aquellos que no lo hicieron (Figura 10 a y b), llama la atención que los trofozoítos pueden trogocitar en diferentes áreas del cuerpo ameboideo de manera simultánea (Figura 10 b). Asimismo, los trofozoítos emitieron bocas fagocíticas y trogocitaron al mismo tiempo (Figura 10 c). Así como trofozoítos compitiendo por el mismo eritrocito (Figura 10 d y e) y emitiendo proyecciones anchas y alargadas (Figura 10 e). En la figura 10 f se observa un eritrocito deformado que sugiere que un grupo de tres trofozoítos lleva a cabo el proceso de trogocitosis de manera simultánea.

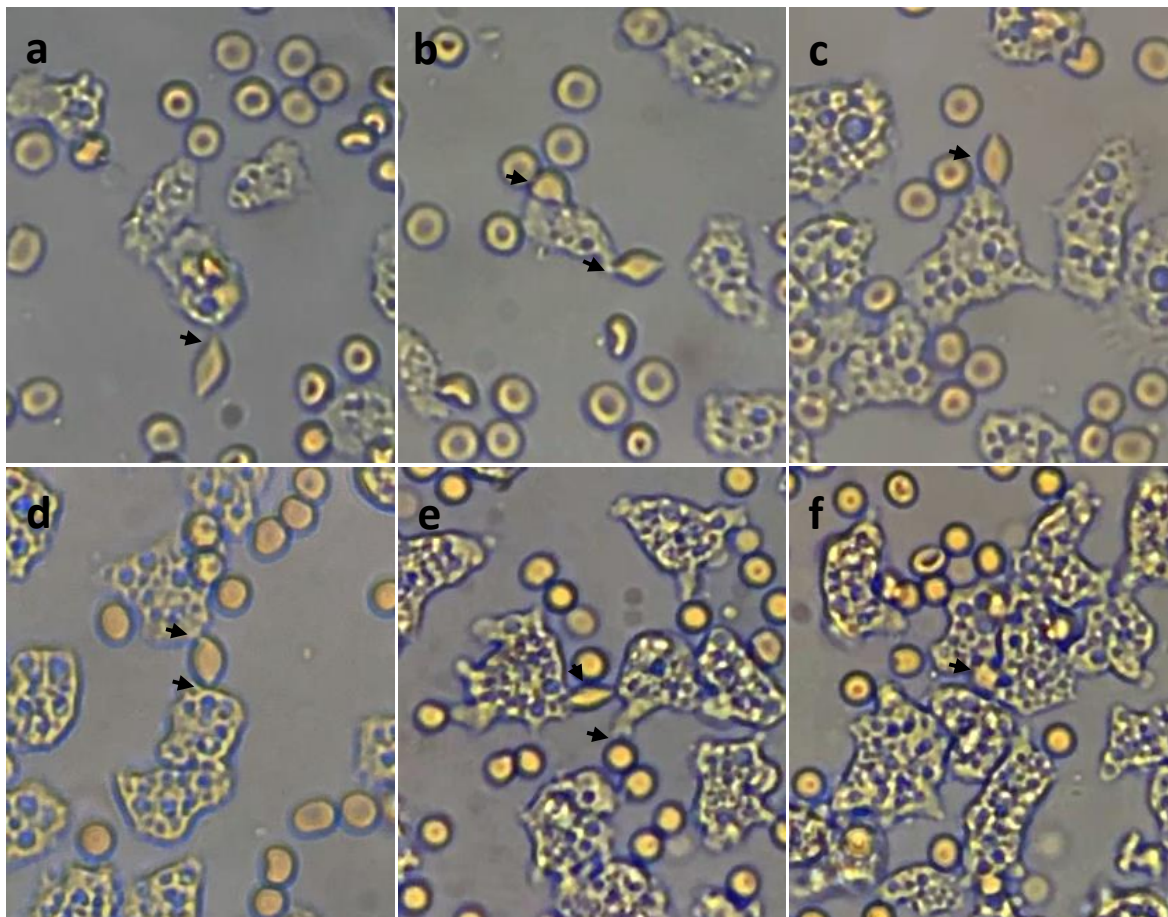


Figura 10. Micrografías de trofozoítos llevando a cabo el proceso de trogocitosis en diferentes circunstancias: Trofozoítos que fagocitaron eritrocitos previamente (a) Trofozoítos sin eritrocitos en su interior y llevando a cabo el proceso de trogocitosis por diferentes sitios de la amiba (b) Trofozoítos trogocitando y emitiendo una boca fagocítica a la vez (c) trogocitosis entre dos trofozoítos (d y e) y trofozoítos trogocitando en grupo (f). 40x.

14. 4 Análisis cuantitativo del proceso de trogocitosis

El porcentaje de los trofozoítos que trogocitaron eritrocitos en los controles y en los grupos experimentales se muestran en la figura 11, se observa que los trofozoítos de *A. culbertsoni* en el grupo control (+), fueron los que más trogocitaron, es decir, aquellos que solo interaccionaron con eritrocitos; seguido del grupo de trofozoítos que interaccionaron con fibronectina. Un proceso similar se observó con *N. fowleri*. *A.castellanii* y *N. lovaniensis*, mostraron una menor cantidad de trofozoítos en procesos de trogocitosis

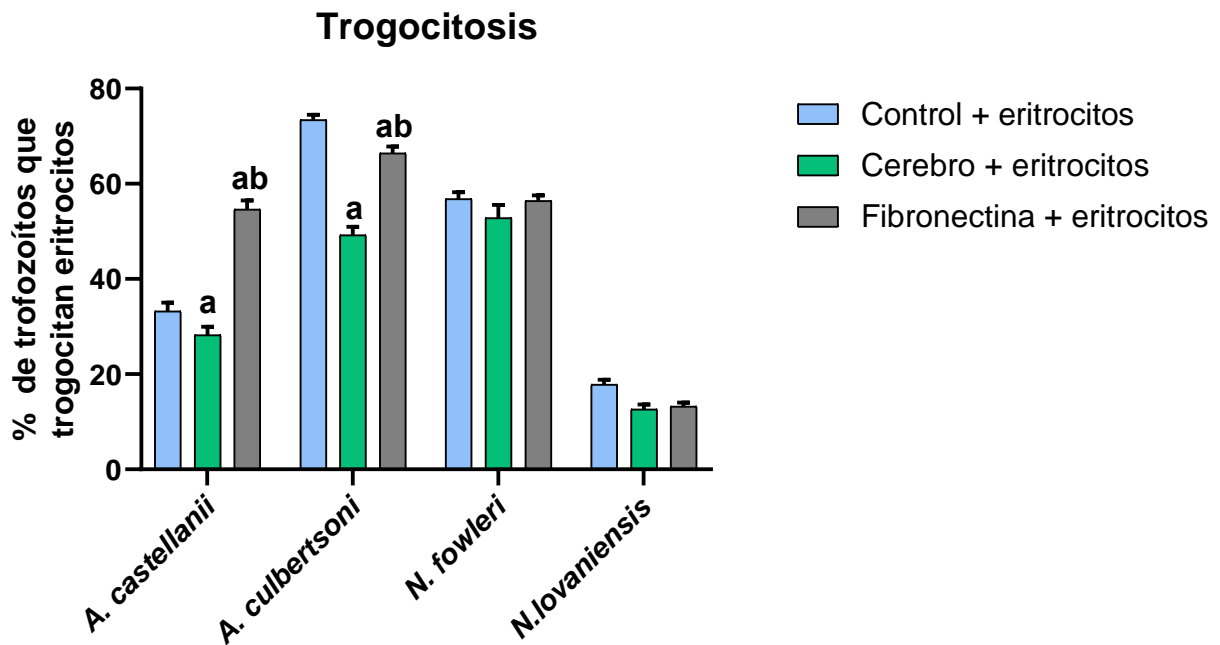


Figura 11. Porcentaje de trofozoítos que trogocitaron eritrocitos post interacción con tejido blanco; cerebro y fibronectina durante 30 min. La interacción con eritrocitos se realizó durante 1h. Se observa que *A. culbertsoni* y *N. fowleri* fueron las especies que más trogocitaron respecto a *A. castellanii* y *N. lovaniensis*. $p < 0.05$ diferencias significativas. a: diferencia significativa contra el control y b: diferencia significativa contra el grupo expuesto a tejido cerebral

14. 5 Estructuras fagocíticas

El análisis de los resultados no solo demostró la emisión de estructuras fagocíticas, sino que fue posible observar una diversidad de estructuras que emiten las amibas en estudio durante los procesos de fagocitosis y trogocitosis.

14.5.1 Análisis cuantitativo de estructuras fagocíticas emitidas por los trofozoítos

Se cuantificó el número de estructuras fagocíticas emitidas por los trofozoítos en los controles y en los grupos experimentales por especie, los porcentajes de la emisión se muestran en la figura 12, en la que se observa que los trofozoítos de todas las cepas en estudio, interaccionados inicialmente con fibronectina, emitieron más estructuras fagocíticas, seguida del control + en el que solo interaccionaron con eritrocitos. Se registraron diferencias significativas entre el grupo de trofozoítos en medio axénico (Control -) de todas las especies en estudio con respecto aquellos grupos en contacto con fibronectina y cerebro.

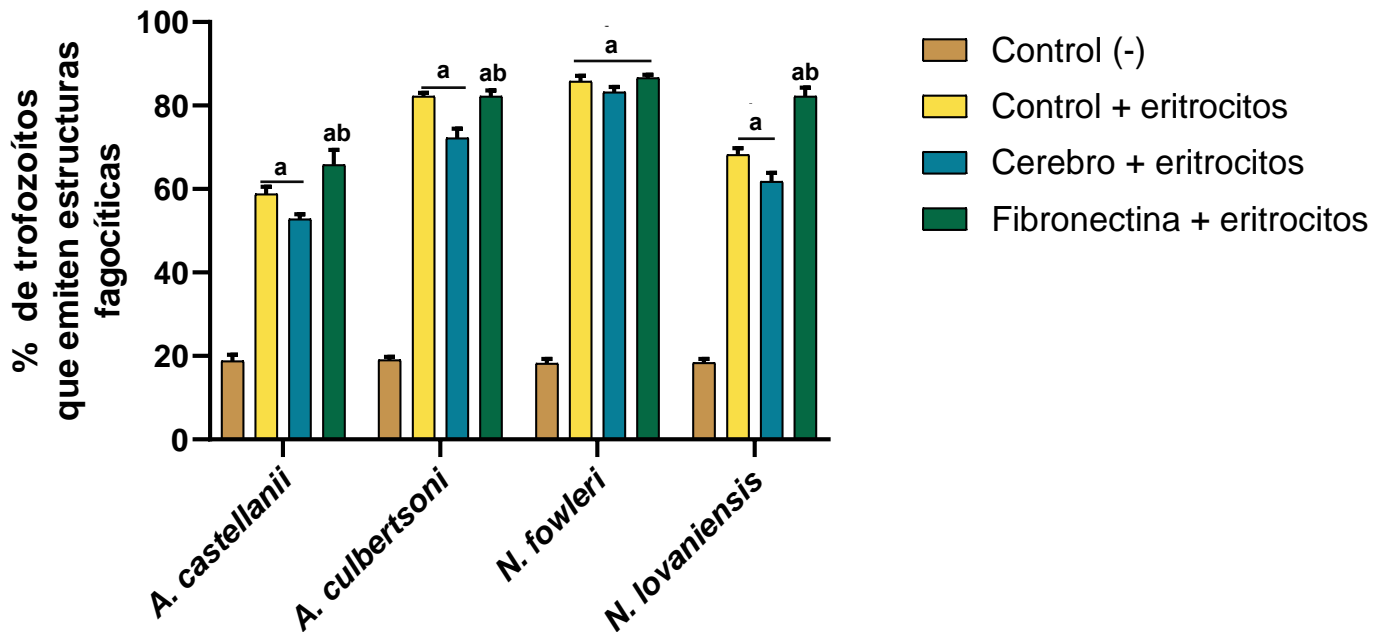


Figura 12. Porcentaje de trofozoítos que emitieron estructuras fagocíticas en interacción con tejido blanco; cerebro y fibronectina durante 30 min, con una post interacción con eritrocitos durante 1h. Como control (-) se utilizó medio axénico, el control + consistió en un cultivo con trofozoítos interaccionados con eritrocitos * $p < 0.05$ diferencias significativas. a: diferencia significativa contra el control (-) y b: diferencia significativa contra el grupo expuesto a tejido cerebral.

14.5.2 Análisis cualitativo de estructuras fagocíticas

La emisión de estructuras fagocíticas tanto de los trofozoítos estimulados con los diferentes tejidos blanco como de los trofozoítos en medio axénico (control -) fueron indistintas. Es decir, no se observaron diferencias. Las estructuras más representativas se describen en cada una de las especies en estudio:

14.5.2.1 *Acanthamoeba castellanii*

Se observaron trofozoítos emitiendo proyecciones delgadas tanto en medio axénico como en contacto con tejido blanco (Figura 13 a, b y c). También mostraron estructuras de gran tamaño (Figura 13 d y e) y la emisión simultánea de ambas estructuras en un mismo trofozoíto (Figura 13 c y f).

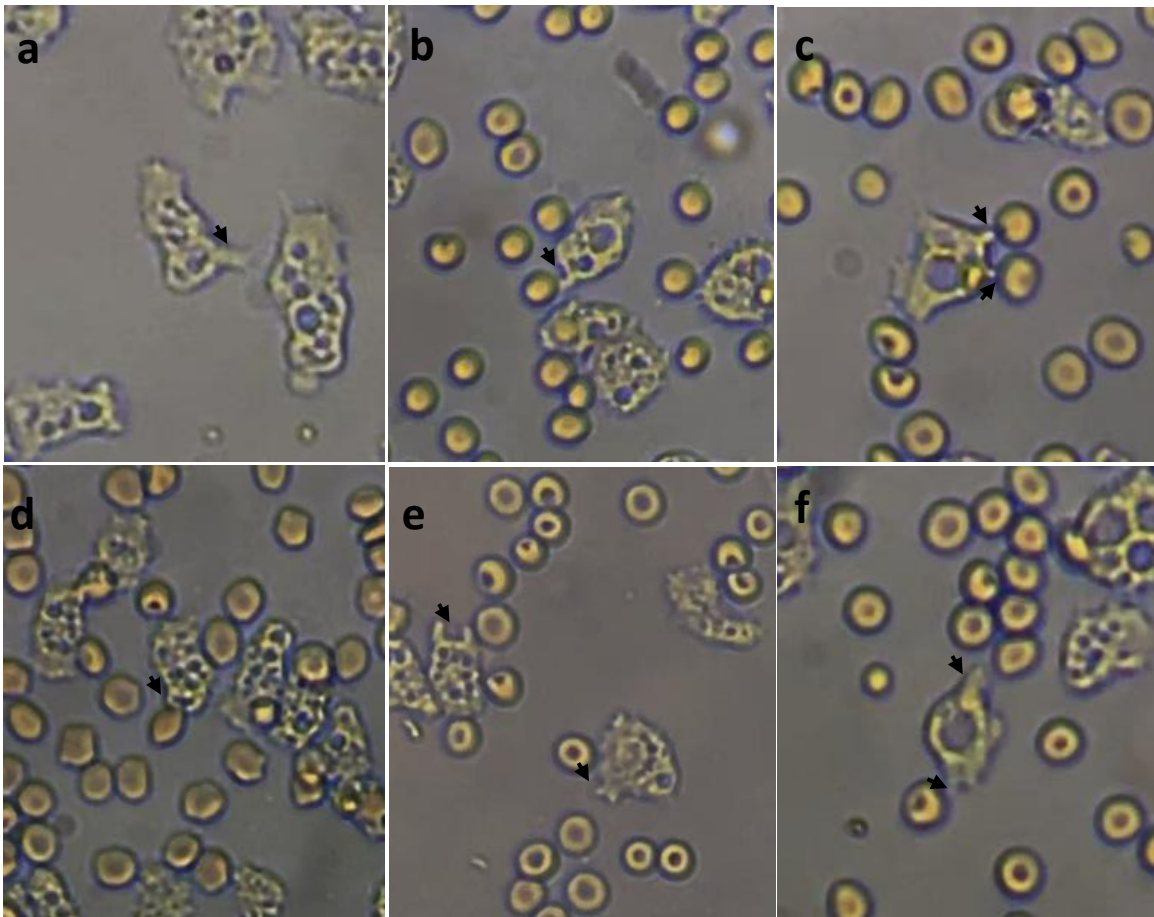


Figura 13. Estructuras fagocíticas emitidas por *Acanthamoeba castellanii*. 40x. Se observa la formación de estructuras largas en medio PYG (a) en contacto con tejido blanco (b y c). Así como la emisión de estructuras de gran tamaño (d y e) y la formación de estructuras simultáneas (c y f).

14.5.2.2 *Acanthamoeba culbertsoni*

Se presentaron estructuras fagocíticas similares a amebostomas tanto en trofozoítos en medio Bacto Casitona como en trofozoítos interaccionados previamente con tejido cerebral (Figura 14 a, b y c). Asimismo, se presentaron proyecciones largas y delgadas las cuales estaban cerca a eritrocitos (Figura 14 d y e) y sin alguna proximidad a eritrocitos (Figura 14 f).

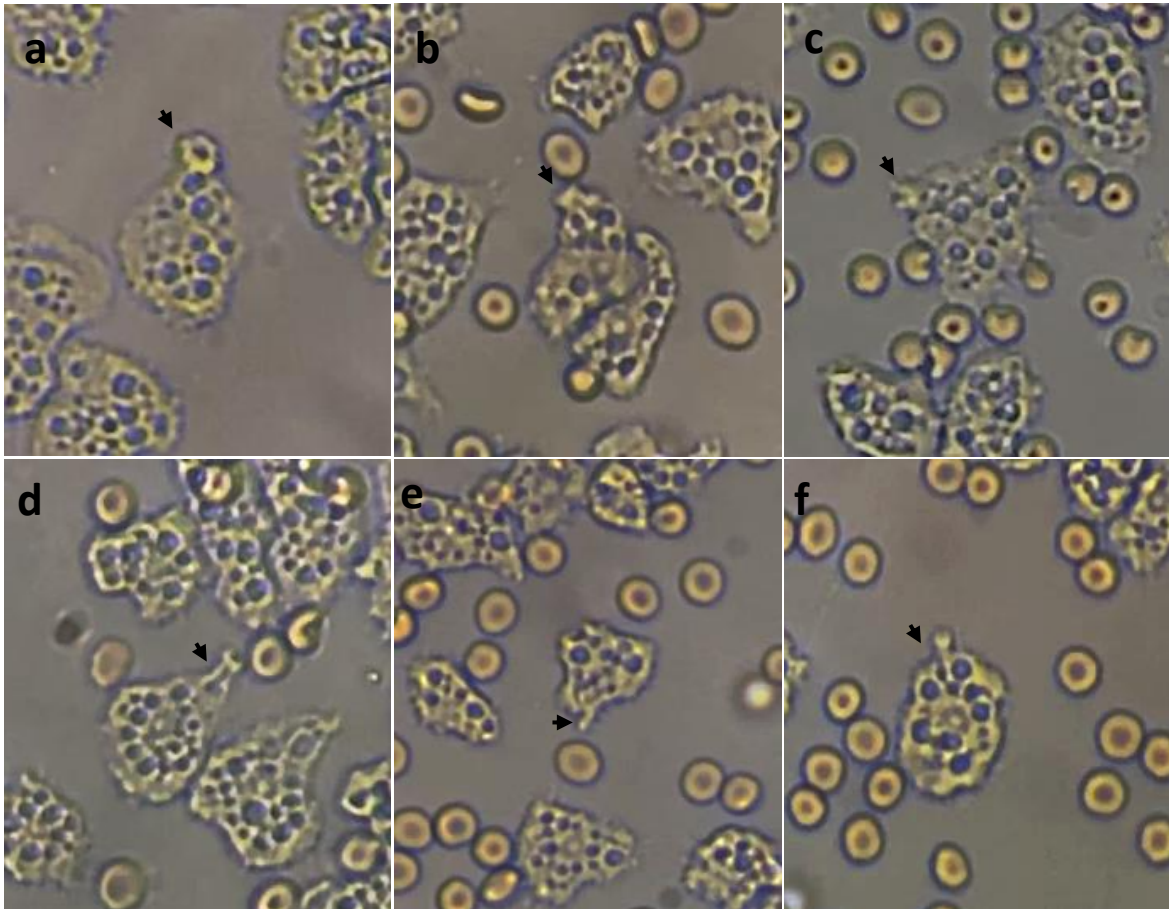


Figura 14. Emisión de estructuras fagocíticas por *Acanthamoeba culbertsoni*. 40x. Se observa la formación de estructuras de gran tamaño tanto de trofozoítos en medio axénico (control -) (a) como en los trofozoítos interaccionados con tejido blanco (b y c). Además, se muestra la emisión de estructuras largas y delgadas cerca de eritrocitos (d y e) y sin contacto con algún eritrocito (f).

14.5.2.3 *N. fowleri*

Se presentó la emisión de bocas alargadas de diferentes tamaños tanto en trofozoítos en medio axénico (control -) como en trofozoítos interaccionados con tejido blanco (Figura 15 a, b y c) así como estructuras semejantes a copas fagocíticas (Figura 15 d). Es importante resaltar que también se registraron estructuras cortas y delgadas que no habían sido reportadas anteriormente (Figura 15 e). También, se presentaron estructuras similares a amebostomas (Figura 15 f).

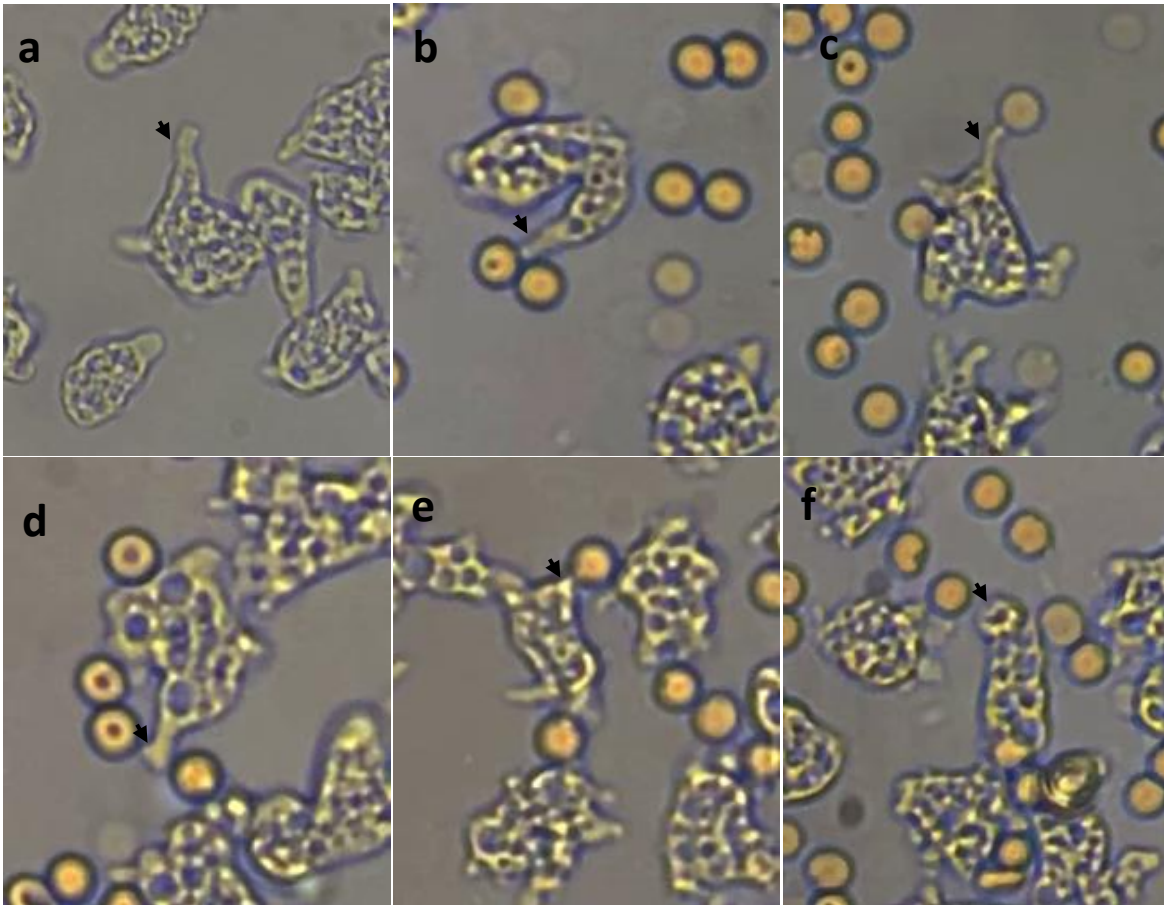


Figura 15. Emisión de estructuras fagocíticas por *Naegleria fowleri*. 40x. Se presenta la formación de estructuras largas en medio Bacto Casitona (a) en contacto con tejido blanco (b y c) similares a copas fagocíticas (d). Así como la emisión de estructuras cortas (e) y estructuras de gran tamaño (f).

14.5.2.4 *N. lovaniensis*

Se emitieron estructuras fagocíticas cuando los trofozoítos no se interaccionaron con los diferentes tejidos blanco; en medio Bacto Casitona (Figura 16a) y en contacto con tejido blanco (Figura 16b) así como la emisión de estructuras simultáneas en contacto con eritrocitos (Figura 16c). También, se presentaron proyecciones de gran tamaño cerca de eritrocitos (Figura 16 d).

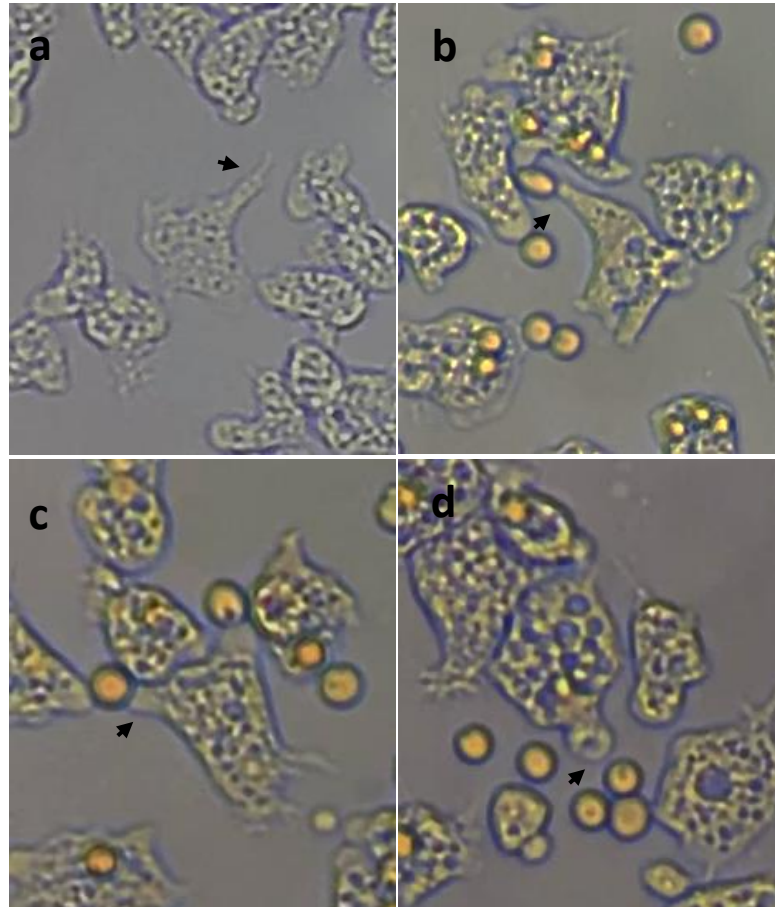


Figura 16. Emisión de estructuras fagocíticas por *Naegleria lovaniensis*. 40x. Se presenta la formación de estructuras largas y delgadas (a y b), proyecciones emitidas de manera simultánea (c) y estructuras de gran tamaño (d).

15. Discusión

Las amibas anfizóicas del género *Acanthamoeba* y la especie *Naegleria fowleri*, son relevantes clínicamente, debido a que son agentes causales de enfermedades en el sistema nervioso central, ojos y piel, para las que hasta el momento no existe un tratamiento de elección (Visvesvara *et al.*, 2007).

En estudios previos, a través de modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* se han descrito los mecanismos de patogenicidad dependientes de contacto que tienen lugar durante la invasión de estas amibas al tejido blanco, los cuales dan inicio con la adhesión, seguido con la migración hacía las uniones celulares, penetración a capas más profundas de los epitelios por un efecto mecánico y/o enzimático (Omaña-Molina *et al.*, 2004, 2013)., jugando un papel relevante la fagocitosis y trogocitosis del tejido blanco incluyendo a los eritrocitos, ya que durante su invasión, se ha comprobado que las amibas anfizóicas migran hacia zonas ricas de oxígeno, y se ha registrado la invasión vía hematógena, siendo los eritrocitos una fuente de alimento o un blanco para llevar a cabo una invasión exitosa (Mattana *et al.*, 2009).

En este trabajo se implementó la estrategia experimental para organizar el tejido blanco en forma de micropatrones, formando líneas discontinuas para favorecer la interacción de las amibas estimuladas con tejido blanco por medio de microscopía de luz. Se ha reportado que es una técnica útil que utiliza una pequeña cantidad de material que propicia *in vitro* la distribución espacial de las células sobre la superficie y su interacción (Blin, 2021)., con respecto a utilizar secciones grandes de tejido. Asimismo, se llevaron a cabo las interacciones de trofozoítos con micropatrones de tejido blanco con el objetivo de determinar si los procesos de fagocitosis y trogocitosis se incrementaban, evaluando estos procesos a través de videograbaciones y destacando su uso como una herramienta eficaz para observar y registrar los procesos fagocíticos y trogocíticos, una ventaja a diferencia del uso de fotografías.

Los resultados de esta investigación mostraron que, de las cuatro especies en estudio solo *A. castellanii* y *N. lovaniensis* llevaron a cabo procesos de fagocitosis. En ambas especies se observó un aumento en la cantidad de trofozoítos que fagocitaron eritrocitos con un estímulo previo con fibronectina y una posterior interacción con eritrocitos, sugiriendo que estas amibas tienen una afinidad a proteínas de matriz extracelular, entre ellas la fibronectina, mostrando una posible relación con el incremento de los procesos fagocíticos. Las principales proteínas de matriz extracelular: colágeno, elastina, fibronectina y laminina están implicadas en la regulación de la adhesión celular y la migración (Rozario y DeSimone, 2010). Se ha demostrado que *Acanthamoeba polyphaga* se une a las proteínas de matriz extracelular como el colágeno tipo IV, fibronectina y laminina (Gordón *et al.*, 1993). Asimismo, se ha observado que *A. castellanii* se adhiere eficientemente al colágeno tipo I, Hernández-Jasso y colaboradores (2020) sugirieron que además de degradar proteínas de la matriz extracelular podrían fagocitarla y utilizarla como fuente de alimento durante la invasión.

La menor cantidad de amibas que eritrofagocitaron en *A. castellanii* se observó en los trofozoítos que fueron estimulados previamente con tejido cerebral, sugiriendo como hipótesis que el tejido cerebral podría ser un estímulo inicial muy fuerte para no llevar a cabo procesos fagocíticos de la misma manera que con otros tejidos blanco como la fibronectina en la post interacción con eritrocitos. Incluso los trofozoítos que no tuvieron contacto previo con tejido blanco fagocitaron en una cantidad superior en comparación a los trofozoítos interaccionados previamente con tejido cerebral, lo que coincide con lo observado por Alvarado-Ocampo y colaboradores (2020) en donde se demostró eritrofagocitosis en *Acanthamoeba* spp. a los 30 min de interacción sin algún contacto con tejido blanco, demostrando que no es necesario un contacto previo con tejido blanco para realizar el proceso de fagocitosis.

Por otro lado, llama la atención que *N. lovaniensis* presentó la mayor cantidad de trofozoítos que eritrofagocitaron, a pesar de ser una especie no patógena, sugiriendo que el proceso de fagocitosis no está relacionado con la patogenicidad y que este proceso es una característica biológica, ya que al ser organismos de vida libre fagocitan bacterias y otros organismos en el ambiente. Juegan un rol en el control de las poblaciones bacterianas en ambientes como el suelo, agua y sedimentos (Pertuz-Bellozo *et al.*, 2021). En cuanto a las diferencias encontradas entre las especies que llevan a cabo el proceso de fagocitosis se encuentra la cantidad de eritrocitos que ingieren; *N. lovaniensis* ingiere una mayor cantidad de eritrocitos con respecto a *A. castellanii*. El máximo número de eritrocitos engullidos se observó con el contacto previo con fibronectina, enfatizando su importancia en la internalización de eritrocitos. La cantidad de eritrocitos puede estar relacionada al tamaño de estas amibas, *N. lovaniensis* posee un mayor tamaño y por lo tanto mayor capacidad de ingerir eritrocitos. Es posible que los procesos fagocíticos se vean impulsados por la necesidad de obtener hierro. Diversos microorganismos parásitos necesitan obtener suficiente hierro para sustentar su crecimiento, virulencia y otros procesos biológicos dentro del hospedero. Por ejemplo, el crecimiento y toxicidad de *Entamoeba histolytica* son inhibidos por un acceso insuficiente de hierro (Cruz-Castañeda *et al.*, 2011). Asimismo, *Trichomonas vaginalis* requiere altos niveles de hierro ya que es considerado un micronutriente esencial para su supervivencia, metabolismo, multiplicación y regulación de factores de virulencia, la ausencia de hierro en los medios de cultivo reduce el crecimiento celular e induce cambios morfológicos (Rivera-Rivas *et al.*, 2020). En el caso de los organismos de vida libre al realizar la transición a organismos anfitriónicos permanecen dependientes de los nutrientes disponibles del hospedero, donde una posible obtención de hierro sea a través de los eritrocitos, ya que al ser células responsables del transporte de oxígeno contienen hemoglobina (Mach y Sutak, 2020). En el ser humano adulto, la hemoglobina de los eritrocitos contiene la mayor parte de hierro del cuerpo (Ganz, 2018), indicando la afinidad de estas amibas hacia estas células sanguíneas como fuente principal de hierro.

Se desconoce el uso del hierro en las funciones vitales de amibas anfitriónicas. Sin embargo, en *N. fowleri* se han planteado la hipótesis sobre la necesidad de la obtención de hierro para su supervivencia y su proliferación durante la MEAP, así como el uso de cisteína proteasas para degradar proteínas de unión al hierro como la hemoglobina (Martínez-Castillo *et al.*, 2015). De la misma manera, también se han encontrado cisteína proteasas que degradan proteínas de unión al hierro en *A. castellanii*, representando un factor de virulencia en las diferentes enfermedades causadas por estas especies (Ramírez-Rico *et al.*, 2015)

Por otra parte, otro de los procesos fagocíticos que implementan las amibas para la obtención de partículas es el proceso de trogocitosis. Este proceso se lleva a cabo cuando una célula ingiere fragmentos del material celular de otra célula (Bettadapur *et al.*, 2020). Los resultados mostraron que el proceso de trogocitosis se presentó en todas las especies. No obstante, las especies *A. culbertsoni* y *N. fowleri* mostraron la mayor cantidad de trofozoítos que trogocitaron eritrocitos, lo que sugiere que estas especies no llevan a cabo el proceso de fagocitosis al estar en contacto con tejido blanco, en su lugar utilizan el proceso de trogocitosis para la ingestión de eritrocitos, mostrando que existen particularidades entre las especies de un mismo género. Sin embargo, se ha registrado que *A. culbertsoni* fagocita bacterias (*Enterobacter aerogenes*) *in vitro* (Pertuz-Belloso y Ramírez-Flores, 2014), demostrando que en el ambiente llevan a cabo procesos fagocíticos ya que las amibas de vida libre son los principales depredadores que controlan las poblaciones bacterianas en los suelos (Rodríguez-Zaragoza, 1996).

La información sobre los mecanismos moleculares de los procesos fagocíticos es limitada. Sin embargo, se ha identificado que Nf-actina (50,1 kDa) también está involucrada en la trogocitosis de *N. fowleri* (Shon *et al.*, 2019). Se desconoce por qué algunas especies utilizan el proceso de trogocitosis sobre el proceso de fagocitosis. No obstante, las posibles razones incluyen el ahorro energético, ya que podría utilizarse una menor cantidad de membrana y de energía para el proceso de trogocitosis en comparación con el proceso de fagocitosis, es posible que este último requiera de mayor energía y no sea energéticamente económico llevar a cabo

el proceso. Otra posible ventaja de la trogocitosis es la adquisición selectiva de componentes como membranas y la exclusión de sustancias tóxicas (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2021). Asimismo, se han planteado hipótesis que proponen que la trogocitosis puede transferir moléculas entre células que están en estrecho contacto físico y probablemente proporcione una ventaja de supervivencia para el parásito ya que las moléculas trogocitadas podrían estar relacionadas con la patogenia de las infecciones causadas por organismos patógenos (Mukherjee *et al.*, 2015).

Como parte de los mecanismos o estrategias de patogenicidad de las amibas anfitriónicas del género *Acanthamoeba* y *Naegleria fowleri* se encuentra la formación de estructuras fagocíticas, estas estructuras les permiten en su fase de vida libre ingerir bacterias y levaduras presentes en el medio ambiente, y en su fase parasitaria les permite alimentarse de células de los tejidos del hospedero y materiales biológicos como fuente de alimento, procesos que en su conjunto conducen a la desestabilización de los tejidos (Marciano-Cabral, 1988). Para tal fin, *Acanthamoeba* emite estructuras denominadas amebostomas, también conocidas como estructuras similares a ventosas, así como canales microfagocíticos (Díaz *et al.*, 1991; Castelan-Ramírez *et al.*, 2020). Estas estructuras son utilizadas para la ingestión de células diana, lo que sugiere un papel importante en la patogenia (Omaña-Molina *et al.*, 2004). En el caso particular del género *Acanthamoeba*, se han reportado diferentes estructuras fagocíticas cuya morfología se adapta según el tamaño y la forma del tejido o célula blanco. Cuando células blanco como los eritrocitos están cerca, las amibas forman un gran amebostoma, en cambio cuando están en contacto con células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) emiten ventosas cilíndricas delgadas (González-Robles *et al.*, 2009), estas estructuras coinciden con las observadas en esta investigación, tanto en contacto previo con tejido blanco como en la post interacción con eritrocitos. Asimismo, *Acanthamoeba* emitió diferentes estructuras simultáneas ante la interacción con una misma célula blanco, resaltando que de manera simultánea fagocitaron y trogocitaron; se observaron amebostomas, ventosas cilíndricas delgadas similares a las reportadas por Castelan-Ramírez y colaboradores (2020), así como estructuras cortas y delgadas.

N. fowleri también exhibe estructuras superficiales denominadas “copas fagocíticas” y estructuras similares a ventosas (Marciano-Cabral y Cabral, 2007; John *et al.*, 1984). Lo que concuerda con las estructuras reportadas en esta investigación. No obstante, también se observaron estructuras cilíndricas delgadas, similares a las reportadas en *Acanthamoeba*.

Se desconocen los mecanismos a través de los cuales estas amibas emiten estructuras fagocíticas. No obstante, se ha reportado que el gen *Nfa1*, localizado en *N. fowleri* codifica para la proteína *Nfa1* (13,1 kDa) y se ha relacionado con la formación de estructuras fagocíticas como los amebostomas (Shon *et al.*, 2019). En todas las especies se observó la emisión simultánea de estructuras fagocíticas, destacando el papel del citoesqueleto. El citoesqueleto es un grupo dinámico de estructuras proteicas que cambian continuamente a medida que las células se mueven y dividen, contiene gran parte de fibras y redes de actina y se encuentran principalmente en estructuras de locomoción y en diversas estructuras endocíticas que permiten cambios morfológicos rápidos en respuesta a señales de estímulos externos (González-Robles *et al.*, 2008)., lo que explicaría la emisión simultánea de más de dos estructuras fagocíticas en diferentes áreas de los trofozoítos observados en esta investigación.

Los procesos fagocíticos son importantes durante la patogenia de las amibas en estudio, siendo los eritrocitos una célula blanco y por lo tanto un posible blanco para realizar una invasión exitosa.

16. Conclusiones

Los resultados mostraron que la interacción previa con tejido cerebral y una post interacción con eritrocitos no indujo un aumento en procesos fagocíticos y trogocíticos. En cambio, los trofozoitos interaccionados previamente con fibronectina si mostraron un ligero aumento en los procesos fagocíticos y trogocíticos de algunas de las especies en estudio. Sugiriendo que estos procesos son una característica biológica ya que tienen la capacidad de realizarlos sin algún estímulo previo.

El análisis de los procesos fagocíticos y trogocíticos mostró diferencias interespecíficas e intergénero las cuales nos permiten concluir que *A. culbertsoni* y *N. fowleri* (cepas altamente virulentas) llevan a cabo mayoritariamente procesos trogocíticos ante el estímulo del tejido blanco, mientras que *A. castellanii* (especie menos virulenta) lleva a cabo ambos procesos y *N. lovaniensis* (cepa no patógena) realiza procesos trogocíticos y fagocíticos, este último en mayor medida.

Durante los procesos fagocíticos y trogocíticos las amibas emitieron diversas estructuras como: amebostomas, estructuras similares a ventosas, estructuras cilíndricas alargadas y cortas, las cuales pueden ser emitidas de manera simultánea en un mismo cuerpo ameboideo. Además, la formación de estas estructuras fue indistinta, no se observaron diferencias en el tipo de estructuras que emitieron los grupos control y los grupos experimentales de cada especie.

17. Perspectivas

- Sería conveniente conocer los mecanismos moleculares de los procesos fagocíticos de estas amibas, los procesos que desencadenan en el tejido blanco y determinar si estos procesos están relacionados con procesos inflamatorios.
- Determinar que estímulos desencadenan la emisión de diversas estructuras fagocíticas.
- Evaluar procesos fagocíticos y trogocíticos en más cepas.

Referencias

Adl, S., Bass, D., Lane, E., Lukes, J., Schoch, L., Simimov, A., Sabine, A., Berry, C., Brown, W., Burki, F., Cárgenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., James, Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D., Mann, D., Massana, R., Mitchell, E., Morrow, C., Park, J., Pawlowski, J., Powell, M., Richter, D., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., y Zhang, Q. . (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1).

Alsam, S., Sissons, J., Javasekera, S., y Khan, N. A. (2005). Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increases permeability in a in vitro modelo f the human blood-Brain barrier. *Journal of Infection*. 51(2).

Alvarado-Ocampo, J., Retana-Moreira, L., y Abrahams-Sandí, E. (2020). In vitro effects of environmental isolates of *Acanthamoeba* T4 and T5 over human erythrocytes and platelets. *Experimental parasitology*, 210.

Barbour, S. E., y Marciano-Cabral, F. (2001). *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1530(2-3).

Bellini, N. K., Santos, T. M., da Silva, M. T. A., y Thiemann, O. H. (2018). The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. *Experimental parasitology*, 187, 1-11.

Bettadapur, A., Moller, H. W., y Ralston, K. S. (2020). Biting off what can be chewed: trogocytosis in health infection and disease. *Infection and Immunity*, 88(7).

Blair, B., Sarkar, P., Bright, K. R., Marciano-Cabral, F., y Gerba, C. P. (2008). *Naegleria fowleri* in well water. *Emerging infectious diseases*, 14(9).

Blin, G. (2021). Quantitive developmental biology in vitro using micropatterning. *Development*, 148(15).

Bonilla, L. P. y Ramírez, F. E. 2014. Amibas de vida libre patógenas y oportunistas. En: Becerril, F. M. (ed.). *Parasitología Médica*. Mc Graw Hill Education, Distrito Federal, México. 37-50.

Borecka A, Bielawska-Drózd A, Skotarczak B, Adamska M, Cieslik P, Antos-Bielska M, Skopinska-Rózewska E, Donskow-Łysoniewska K. (2020). *Acanthamoeba* pathogen and vector of highly pathogenic bacteria strains to healthy and immunocompromised individuals. *Cent Eur J Immunol*.45(2).

Bouten, M., y Elsheikha, H. M. (2022). Diagnosis and Management of *Acanthamoeba* Keratitis: A Continental Approach. *Parasitologia*, 2(3).

Bright KR, Gerba CP. (2017). Occurrence of the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri* in groundwater. *Hydrogeol J*, 25:953-958.

Cabello-Vílchez, A. M., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., Sifaoui, I., Valladares, B., Piñero, J., y Lorenzo-Morales, J. (2014). Voriconazole as a first-line treatment against potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from Peru. *Parasitology research*, 113(2).

Capewell, L. G., Harris, A. M., Yoder, J. S., Cope, J. R., Eddy, B. A., Roy, S. L., Visvesvara, G. S., Fox, L.A., y Beach, M. J. (2015). Diagnosis, clinical course and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States 1937-2013. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 4 (4).

Carrasco-Yépez, M., Campos-Rodríguez, R., Gódinez-Victoria, M., Rodríguez-Monroy, M. A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., Contis-Montes de Oca, A., y Rojas-Hernández. (2013). *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of α -D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitology research*, 112(10).

Castelan-Ramírez, I., Salazar-Villatoro, L., Chávez-Munguía, B., Salinas-Lara, C., Sánchez-Garibay, C., Flores-Maldonado, C., Hernández, M. D., Anaya, M., Ávila-Costa, M. R., Méndez-Cruz, A. R., y Omaña-Molina, M. (2020). Schwann cell autophagy and necrosis as mechanisms of cell death by *Acanthamoeba*. *Pathogens*, 9(6).

Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Balamuthia mandrillaris. Recuperado el 08 de diciembre del 2022 de:

<https://www.cdc.gov/parasites/balamuthia/general.html>

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., García-Latorre, E., Tsutsumi, V., y Shibayama, M. (2008). Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitology international*, 57(3).

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., y Shibayama, M. (2010). Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates, *Parasitology research*, 106(3), 695-701.

Cope, J. R., Raoult, C. R., Hill, V. R., Sokol, T., Causey, J. J., Yoder, JS., Mirani, G., Mull, B., Mukerjee, J. N., Doucet, M., Ovarnstrom, I., Poole, C., Akingbola, J., Ritter, M., Xiong, Z., Da Silva, A., Roellig, D., Russell, B. V., Stern, H.D., Xigo, L., y Beach, MJ (2015). The first association of a primary amebic meningoencephalitis death with culturable *Naegleria fowleri* in tap water from a US treated public drinking water system. *Clinical Infectious Diseases*, 60(8).

- Cope, J. R., Ali, I. K., y Visvesvara, G. S. (2020). Pathogenic and opportunistic free-living ameba infections. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* pp. 814-820. Elsevier.
- Corsaro, D. (2022). Exploring LSU and ITS rDNA Sequences for *Acanthamoeba* Identification and Phylogeny. *Microorganisms*, 10(9), 1776.
- Cruz-Castañeda, A., López-Casamichana, M., y Olivares-Trejo, J. J. (2011). *Entamoeba histolytica* secretes two haem-binding proteins to scavenge haem. *Biochemical Journal*, 434(1).
- Culbertson, C. G. (1971). The pathogenicity of soil amebas. *Annual reviews in microbiology*, 25 (1), 231-254.
- Culbertson, C. G., Smith, J. W., & Minner, J. R. (1958). *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science*, 127(3313), 1506-1506.
- De Jonckheere, J. F. (1983). Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *The Journal of protozoology*, 30(4), 701-706.
- De Jonckheere, J. F. (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool*, 41, 309-342
- De Jonckheere, J. F. (2004). Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist*, 155(1), 89-103.
- De Jonckheere, J. F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoebflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7).
- De Jonckheere, J. F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental parasitology*, 145.
- Di Filippo, M. M., Novelletto, A., Di Cave, D., y Berrilli, F. (2017). Identification and phylogenetic position of *Naegleria* spp. from geothermal springs in Italy. *Experimental parasitology*, 183, 143-149.
- Diaz, J. H. (2011). Behavioral and recreational risk factors for free-living amebic infections. *Journal of travel medicine*, 18 (2).
- Diaz, J., Osuna, A., Rosales, M. J., Cifuentes, J., y Mascaro, C. (1991). Sucker-like structures in two strains of *Acanthamoeba*: scanning electron microscopy study. *International journal for parasitology*, 21(3).
- Duggal, S., Rongpharpi., Dugal, A., Kumar, A., Biswal, I. (2017). Role of *Acanthamoeba* in granulomatous encephalitis: a review. *J Infect. Dis. Immune Ther.*, 11. P2.

- Enriquez, F. L., Mooney, R., Bandel, T., Giammarini, E., Zeroual, M., Fiori, P. L., Margarita, V., Rappelli, y Dessì, D. (2021). Paradigms of protist/bacteria symbioses affecting human health: *Acanthamoeba* species and *Trichomonas vaginalis*. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Fowler, M., y Carter, R. F. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *British Medical Journal*, 2(5464).
- Freeman, S. A., y Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological reviews*, 262(1), 193-215.
- Ganz, T. (2018). Erythrocytes and erythroblasts give up iron. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 132(19), 2004-2005.
- Garate M., Cao Z., Bateman E., y Panjwani, N. (2004). Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* 279(28).
- Garrett, W. S., y Mellman, I. (2001). Studies of endocytosis. *Dendritic Cells*; Elsevier. London, UK. 213-230.
- Gelman, B.B., Rauf, S.J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H. W., y Visvesvara, G.S. (2001). *Amoebic encephalitis due to Sappinia diploidea*. *J Am Med Assoc.*, 285: 2450-1
- Gharpure, R., Bliton, J., Goodman, A., Ali, I. K. M., Yoder, J., y Cope, J. R. (2021). Epidemiology and clinical characteristics of primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: a global review. *Clinical Infectious Diseases*, 73(1).
- Gonçalves, D. D. S., Ferreira, M. D. S., Gomes, K. X., Rodríguez-de La Noval, C., Liedke, S. C., da Costa, G. C. V., Albuquerque, P., Reyes. C. J., Saramago, P.E. R., Peralta. M. J., Casadevall, A., y Guimarães, A. J. (2019). Unravelling the interactions of the environmental host *Acanthamoeba castellanii* with fungi through the recognition by mannose-binding proteins. *Cellular microbiology*, 21(10).
- González-Robles, A., Castañón, G., Hernández-Ramírez, V. I., Salazar-Villatoro, L., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M., Talamás-Rohana., y Martínez-Palomo, A. (2008). *Acanthamoeba castellanii*: identification and distribution of actin cytoskeleton. *Experimental parasitology*, 119(3), 411-417
- González-Robles, A., González-lázaro, M., Omana-Molina, M., y Martínez-Palomo, A. (2009). *Acanthamoeba castellanii*: endocytic structures involved in the ingestion of diverse target elements. *Acta Protozoologica*, 48(4).
- Gordon, V. R., Asem, E. K., Vodkin, M. H., y McLaughlin, G. L. (1993). *Acanthamoeba* binds to extracellular matrix proteins in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science*, 34(3).

Guarner, J., Barlett, J., Shieh, W. J., Paddock, C. D. Visvesvara, G. S., y Zaki, S. R. (2007). Histopathologic spectrum and immunohistochemical diagnosis of amebic meningoencephalitis. *Modern Pathology*, 20(12).

Güemez, A., y García, E. (2021). Primary amoebic meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and treatments. *Biomolecules*, 11(9).

Guimaraes, A. J., Gomes, K. X., Cortines, J. R., Peralta, J. M., y Peralta, R. H. S. (2016). *Acanthamoeba spp.* as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiological research*, 193, 30-38.

Han, K. L., Lee, H. J., Shin, M. H., Shin, H. J., Im, K. I y Park, S. J. (2004). The involvement of an integrin-like protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitology research*, 94(1), 53-60.

Hasbun, R., Bloch, M. K. C., y Bhimras, A. (2021). Neurological Complications of Infections Diseases Current Clinical Neurology.

Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Mati, T., Marciano-Cabral, F., y Leippe, M. (2002). Pore-forming Polypeptides of the Pathogenic Protozoon *Naegleria fowleri*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277.

Illingworth, C. D., y Cook, S. D. (1998). *Acanthamoeba* keratitis. *Survey of ophthalmology*, 42(6), 493-508.

Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U. E. A., Tahir, I. M., Akram, M., Shah, A. M. S y Zainab, R. (2020). *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(2), 199-212.

John, D. T., Cole Jr, T. B., y Marciano-Cabral, F. (1984). Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (1), 12-14.

Khalife, G. E., Pambuccian, S. E., Visvesvara, G. S., y Horten, B. (1994). Disseminated *Acanthamoeba* Infection Masquerading as Bacillary Angiomatosis in a Patient With AIDS: Case Report and Literature Review. *International Journal of Surgical Pathology*, 2(1), 11-16.

Król-Turmińska, K., y Olender, A. (2017). Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(2), 254.

Lam, C., Jamerson, M., Cabral, G., Carlesso, A. M., y Marciano-Cabral, F. (2017). Expression of matrix metalloproteinases in *Naegleria fowleri* and their role in invasion of the central nervous system. *Microbiology*, 163(10), 1436-1444.

Lee, M. J., Srikumaran, D., Zafar, S., Salehi, M., Liu, T. S., y Woreta, F. A. (2020). Case series: Delayed diagnoses of *Acanthamoeba* keratitis. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, 19, 100778.

- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., y Walochnik, J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22.
- Mach, J., y Sutak, R. (2020). Iron in parasitic protists—from uptake to storage and where we can interfere. *Metallomics*, 12(9), 1335-1347.
- Maciver, S. K., Piñero, J. E., y Lorenzo-Morales, J. (2020). Is *Naegleria fowleri* an emerging parasite? *Trends in parasitology*, 36(1), 19-28.
- Marciano-Cabral, F. (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological reviews*, 52(1), 114-133
- Marciano-Cabral, F., y Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 273-307.
- Marciano-Cabral., y Cabral, G. A. (2007). The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunology y Medical Microbiology*, 51(2), 243-259.
- Martínez, A. J. (1980). Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection?. *Neurology*, 30(6), 567.
- Martínez, A. J., y Janitschke, K. (1985). *Acanthamoeba* an opportunistic microorganism: a review. *Infection*, 13(6), 251-256
- Martinez, A. J., y Visvesvara, G. S. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology*, 7(1), 583-598.
- Martínez-Castillo, M., Ramírez-Rico, G., Serrano-Luna, J., y Shibayama, M. (2015). Iron-binding protein degradation by cysteine proteases of *Naegleria fowleri*. *BioMed research international*.
- Mattana, A., Alberti, L., Delogu, G., Fiori, P. L., y Cappuccinelli, P. (2009). In vitro activity of *Acanthamoeba castellanii* on human platelets and erythrocytes. *Infection and immunity*, 77(2), 733-738.
- Maycock, N. J., y Jayaswal, R. (2016). Update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, treatment, and outcomes. *Cornea*, 35(5), 713-720.
- Milanes, J.E., Suryadi, J., Abendroth, J., Van Voorhis, W.C., Barrett, K.F., Dranow, D.M, Phan, I.Q., Patrick, S.L., Rozema, S. D., Khalifa, M. M., Golden, J.E., y Morris, J.C. (2019). Enzymatic and Structural Characterization of the *Naegleria fowleri* Glucokinase. *Antimicrob Agents Chemother*. 25;63(5).
- Mukherjee, S., Mukhopadhyay, A., Andriani, G., Machado, F. S., Ashton, A. W., Huang, H., Weiss, L.M., y Tanowitz, H. B. (2015). *Trypanosoma cruzi* invasion is associated with trophocytosis. *Microbes and Infection*, 17(1), 62-70.
- Nakada-Tsukui, K., y Nozaki, T. (2021). Trophocytosis in Unicellular Eukaryotes. *Cells*, 10(11),2975.

Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Salazar-Villatorio, I. L., Lorenzo-Morales, J., Cristóbal-Ramos, A. R., Hernández-Ramírez, V. I., Talamás-Rohana, P., Méndez-Cruz, A. R., Martínez-Palomo, A. (2013). Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasión: observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hámster corneal cell. *BioMed research international*.

Omaña-Molina, M., Navarro-García, F., González-Robles, A., Serrano-Luna, J. D. J., Campos-Rodríguez, R., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2004). Induction of morphological and electrophysiological changes in hámster cornea after *in vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity*, 72(6), 3245-3251

Ostrowski, P., Grinstein, S., y Freeman, S. (2016). Diffusion barriers, mechanical forces, and the biophysics of phagocytosis. *Developmental cell*, 38(2), 135-146.

Pernin P., Ataya A., Cariou M. L. (1992) Genetic structure of natural populations of the free-living amoeba, *Naegleria lovaniensis*. *Evidence for sexual reproduction. Heredity* 68: 173-181.

Pertuz-Belloso, S., Matuz-Mares., Campoy, E., Macek, M y Ramírez-Flores, E. 2021. Tasa de fagocitosis en las especies de *Acanthamoeba* provenientes de aguas termales parte I. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*. 55 (1).

Putaporntip, C., Kuamsab, N., Nuprasert, W., Rojrung, R., Pattanawong, U., Tia, T., Yanmanee, S y Jongwutiwes, S. (2021). Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. *Scientific reports*, 11(1), 1-13.

Ralston, K. S. (2015). Taking a bite: Amoebic trogocytosis in *Entamoeba histolytica* and beyond. *Current opinion in microbiology*, 28, 26-35.

Ramírez-Rico, G., Martínez-Castillo, M., De La Garza, M., Shibayama, M., y Serrano-Luna, J. (2015). *Acanthamoeba castellanii* proteases are capable of degrading iron-binding proteins as a possible mechanism of pathogenicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 614-622

Rivera-Rivas, L., Lorenzo-Benito, S., Sánchez-Rodríguez, D., Miranda-Ozuna, J., Euceda-Padilla, E., Ortega-López, J., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillen, A., Velazquez-Valassi, B., Jasso-Villaazul, L., y Arroyo, R. (2020). The effect of iron on *Trichomonas vaginalis* TvCP2: A cysteine proteinase found in vaginal secretions of trichomoniasis patients. *Parasitology*, 147(7), 760-774.

Rocha-Azevedo, B. D., Jamerson, M., Cabral, G. A., Silva-Filho, F. C y Marciano-Cabral, F. (2009). *Acanthamoeba* interaction with extracelular matrix glycoproteins; biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(3), 270-278.

- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Critical reviews in microbiology*, 20(3), 225-241.
- Roos, L. K. (2007). Nonviral Infections. Christopher, G. Goetz (Editor). *Textbook of Clinical Neurology* (3ed). 943-968.
- Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S., y Bonkowski, M. (2009). Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *The ISME Journal*, 3(6), 675-684.
- Rozario, T., y DeSimone, D. W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental biology*, 341(1), 126-140.
- Scheid, L. P. (2019). Free-Living Amoebae and Their Multiple Impacts on Environmental Health. *Encyclopedia of Environmental Health* (Segunda edición). Elsevier.
- Schuster, F. L., y Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International journal for parasitology*, 34(9), 1001-1027.
- Shakeel S, Iffat W, Khan M. (2016). Pharmacy students' knowledge assessment of *Naegleria fowleri* infection. *Scientifica*, 2:16-22.
- Siddiqui, R., y Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites y vectors*, 5(1), 1-13.
- Sierra-López, F., Baylón-Pacheco, L., Espíritu-Gordillo, P., Lagunes-Guillén, A., Chávez-Munguía, B., y Rosales-Encina, J. L. (2018). Influence of micropatterned grill lines on *Entamoeba histolytica* trophozoites morphology and migration. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 295.
- Singh, P., Kochhar, R., Vashishta, R. K. (2006). Amebic meningoencephalitis: Spectrum of imaging findings. *J Neuroradiol* 27. 1217-1221.
- Sohn, H. J., Kim, J. H., Shin, M. H., Song, K. J y Shin, H. J. (2010). The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitology research*, 106(4), 917-924.
- Sohn, H. J., Song, K. J., Kang, H., Ham, A. J., Lee, J. H., Chwae, Y. J., Kyongmin, K., Park, S., Jong-Hyun, K., y Shin, H. J. (2019). Cellular characterization of actin gene concerned with contact-dependent mechanisms in *Naegleria fowleri*. *Parasite Immunology*, 41(8).
- Soontrapa, P., Jitmuang, A., Ruenchit, P., Tiewcharoen, S., Sarasombath, P. T., & Rattanabannakit, C. (2022). The first molecular genotyping of *Naegleria fowleri* causing primary amebic meningoencephalitis in Thailand with epidemiology and clinical case reviews. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 931546.

Stahl, L. M., y Olson, J. B. (2021). Environmental abiotic and biotic affecting the distribution and abundance of *Naegleria fowleri*. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1).

Stockman, L.J., Wright, J.C., Visvesvara, G. S., Fields, B. S y Beach, M. J. (2011). Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoeba in household water, Ohio, USA 1990-1992. *Parasitology Research* 108(3), pp 621-627.

Torno, M. S., Babapour, R., Gurevitch, A., y Witt, M. D. (2000). *Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(2), 351-354.

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. *Pathologie Biologie*. *Pathologie Biologie*, 60 (6), 399-405.

Visvesvara, G. S. (2013). Infections with free-living amebae. García, H. H., Tanowitz, H. B., Del Brutto, H.O (Eds). *Handbook of clinical neurology*. 114, 153-168.

Visvesvara, G. S., Moura, H., y Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 1-26.

Visvesvara, G. S., y Maguire, J.H. (2006). Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Tropical Infectious Diseases*. 2. 1114–1125 pp. Churchill Livingstone.

Wang, X., y Jacobs, D. S. (2022). An Update on the Initial Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. *International Ophthalmology Clinics*, 62(2), 101-110.

Anexo 1

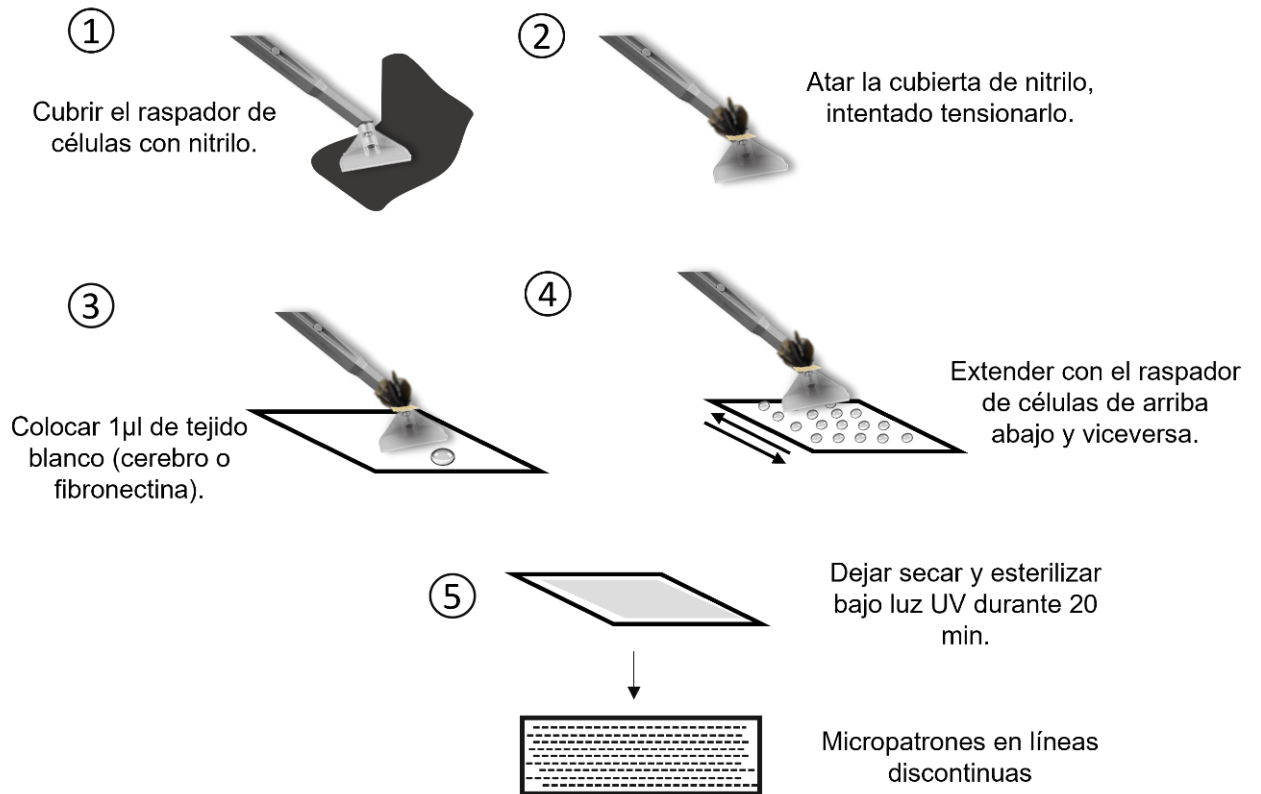


Figura 17. Elaboración de micropatrones