



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA**

**Biología y patogenia de  
*Acanthamoeba* spp.**

**TESINA**

Que para obtener el título de

**Biólogo**

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

Miguel Angel Bachiller Osorno

**DIRECTOR(A) DE TESINA**

Dra. Maritza Omaña Molina



**Los Reyes Iztacala, Edo 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.

## **ÍNDICE.**

### **1. Resumen**

### **2. Introducción**

#### **2.1 Antecedentes históricos**

#### **2.2 Justificación**

#### **2.3 Objetivos**

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

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

##### **3.1.1 Trofozoíto**

##### **3.1.2 Quiste**

#### **3.2 Taxonomía**

#### **3.4 Genotipos**

#### **3.5 Ecología**

#### **3.6 Endosimbiontes**

### **4. Importancia médica de género *Acanthamoeba***

#### **4.1 Aspectos clínicos**

##### **4.1.1 Queratitis amebiana**

##### **4.1.2 Encefalitis amebiana granulomatosa**

##### **4.1.3 Dermatitis amebiana**

##### **4.1.4 Infecciones diseminadas**

#### **4.2 Epidemiología de las infecciones que causa *Acanthamoeba* spp.**

- 4.3 Diagnóstico de las infecciones que causa *Acanthamoeba* spp.**
- 4.4 Tratamientos de las infecciones ocasionadas por *Acanthamoeba* spp.**
- 5. Respuesta inmune ante la invasión por *Acanthamoeba* spp.**
  - 5.1 Reconocimiento de *Acanthamoeba* spp.**
  - 5.2 Respuesta inmune innata contra *Acanthamoeba* spp.**
  - 5.3 Respuesta inmune adaptativa contra *Acanthamoeba* spp.**
- 6. Mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba* spp.**
  - 6.1 Vías de entrada**
  - 6.2 Mecanismos dependientes de contacto**
    - 6.2.1 Adhesión y secreción de proteasas dependientes de contacto**
    - 6.2.2 Fagocitosis y efecto citopático**
    - 6.2.3 Migración e interacción con las uniones celulares**
  - 6.3 Mecanismos independientes de contacto**
    - 6.3.1 Enzimas**
    - 6.3.2 Vesículas extracelulares y toxinas**
    - 6.3.3 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero**
  - 6.4 Factores indirectos de virulencia**
    - 6.4.1 Ubicuidad**
    - 6.4.2 Cambio de fenotipo**
    - 6.4.3 Tolerancia fisiológica**
    - 6.4.4 Factores indirectos del hospedero**

#### **6.4.5 Biofilms**

### **7. Discusión**

### **8. Conclusiones**

### **9. Perspectivas**

### **10. Referencias**

#### **ABREVIATURAS**

AVL amebas de vida libre

CDC centro de control y prevención de enfermedades

DAMP patrones moleculares asociadas a daño

EAG encefalitis amebiana granulomatosa

CPE efecto citopático

EVs vesículas extracelulares

IFN interferón

Ig inmunoglobulina

IL interleucina

LBP proteína de unión a laminina

MBP proteína de unión a manosa

MDCK células de riñón canino Madin-Darby

MEC matriz extracelular

MIP-133 metaloproteinasa-133

MMP metaloproteinasa de matriz

MyD88 gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide

PAMP patrones moleculares asociadas a patógenos

PCR reacción en cadena de la polimerasa

QA queratitis amebiana

RTE resistencia transepitelial

SNC sistema nervioso central

TLR receptor tipo toll

TNF factor de necrosis tumoral

## 1. Resumen

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos distribuidos ampliamente por todo el mundo, han sido aisladas de diversos ambientes tanto terrestres, como acuáticos, siendo el aire un medio de dispersión. Son consideradas un importante eslabón en la ecología microbiana ya que se alimentan de bacterias, algas, virus, levaduras, donde influye en estas comunidades, mejorando así el reciclaje de nutrientes y el flujo de energía. No obstante, se ha reportado que tienen la capacidad de comportarse como parásitos oportunistas *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata*, las cuales pueden ser potencialmente patógenas para el ser humano (Visvesvara *et al*, 2007).

*Acanthamoeba* spp., se ha reportado que puede ser capaz de provocar queratitis amebiana (QA) en personas sanas, así como encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), acanthamebiasis cutánea e infecciones diseminadas en personas inmunocomprometidas, sin embargo, la patogénesis de estas infecciones, involucran diferentes procesos complejos en el que participan diferentes factores tanto del hospedero, como características propias del parásito.

Aunque su incidencia es baja, los diagnósticos no son los apropiados y los tratamientos poco efectivos, la infección por *Acanthamoeba* spp., suele ser difícil de erradicar y puede llegar a ser de alta letalidad. Además, que *Acanthamoeba* spp., tiene la capacidad de transmitir microbios que puedan mostrar una mayor virulencia y resistencia a los medicamentos, por lo que se considera un factor de riesgo para la salud pública (Wang, 2023).

Se ha podido comprobar la relevancia de la patogenicidad de estas amebas a través de diversos estudios científicos tanto *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, en los que se han descrito los mecanismos de patogenicidad dependientes e independientes de contacto que se llevan a cabo en diversos tejidos como: córnea, piel y sistema nervioso central (SNC). El primer paso crucial para la invasión es la adherencia, la cual es mediada a través de la proteína de unión a manosa (MBP) de 130 kDa, que genera la secreción de algunas proteasas dependientes de contacto y varias serinas proteasas independientes de contacto que contribuyen al daño y muerte celular de las células hospederas. Posteriormente las amebas se desplazan a través de sus

acantopodios a una velocidad de 0.3-0.4  $\mu$ /seg dirigiéndose hacia los espacios intercelulares, abriéndose espacio entre las uniones estrechas, reorganizando su citoesqueleto para cambiar de forma y poder migrar y penetrar a capas más profundas por acción mecánica y/o enzimática, desprendiendo las células más superficiales, modificando la arquitectura del tejido, reduciendo la resistencia transepitelial (RTE) y aumentando su permeabilidad, favoreciendo así que invadan capas más profundas y en algunos casos alcancen vasos sanguíneos, facilitando la invasión a diferentes tejidos hasta penetrar la barrera hematoencefálica y llegar al SNC. Así mismo, la fagocitosis juega un papel importante ingiriendo partículas de las células recién desprendidas a través de diferentes estructuras fagocíticas denominadas amebostomas o bocas fagocíticas.

En general los factores dependientes e independientes de contacto actúan sinérgicamente para producir un efecto citopático (CPE) en las células hospederas. Aunque es importante considerar otros factores que de manera indirecta contribuyen en la virulencia, como son las características propias del hospedero, diversos factores ambientales y características propias de cada cepa.

## 2. Introducción

A mediados del siglo XX se descubrió la capacidad infectiva de algunos géneros y especies de AVL, provocando desde infecciones leves como diarrea, sinusitis, vaginitis, hasta enfermedades crónicas y letales del SNC (Visvesvara *et al.*, 2007); razón por la cual fueron renombradas como amebas anfitriónicas (Page, 1967) y con ello designaron aquellas especies con la capacidad de infectar al ser humano y diversos animales, correspondiendo así una fase endozóica o parasítica cuando entra en contacto con dicho hospedero, o bien presentar una fase exozóica o de vida libre (Martínez, 1993). Dentro del género *Acanthamoeba* destacan; *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga* como las especies clínicamente relevantes, tanto por el número de casos, como por su virulencia y letalidad, no obstante, se han reportado casos asociados con, *A. palestinensis*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*, *A. griffini*, *A. lenticulata*, *A. royreba*, *A. divionensis*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. triangularis*, *A. healyi*, *A. stevensoni*, *A. jacobsi*, *A. hatchetti* y *A. byers* (Zhang y Cheng, 2021).

### 2.1 Antecedentes históricos

Culbertson *et al.*, (1959), al realizar pruebas rutinarias de seguridad de la vacuna de poliomielitis, revelaron la presencia de organismos ameboides en cultivos celulares de riñón donde observaron que algunos de estos presentaban un daño citopático. Posteriormente se inoculó el contenido de las mismas muestras a ratones y monos, los cuales murieron en pocos días a consecuencia de una meningoencefalitis. El análisis histológico del cerebro de estos animales reveló la presencia de AVL identificadas más tarde como *Acanthamoeba castellanii* como la responsable de la patología en SNC con alta letalidad.

El primer reporte de infección en SNC en humanos ocasionado por *Acanthamoeba* spp., se publicó en 1960, el cual fue referido en Tucson, Arizona y correspondió a una niña de 6 años de edad que falleció por una lesión cerebral, la cual fue descrita como un granuloma cerebral (Kernohan *et al.*, 1960).

Posteriormente Fowler y Carter, (1965), registran otro caso de infección en SNC en Australia provocado por amebas anfitriónicas, inicialmente se pensó que el agente causal era una ameba del género *Acanthamoeba*, pero finalmente se identificó a



*Naegleria fowleri* como la responsable del daño, y cuya patología fue designada posteriormente como meningoencefalitis amebiana primaria (MAP).

En 1973, se reportó en EUA el primer caso de una infección en la córnea provocada por *Acanthamoeba* spp., denominada queratitis amebiana (QA), la cual correspondió a un paciente masculino de 41 años de edad del sur de Texas, que refirió un traumatismo corneal y exposición de su ojo con agua contaminada (John, 1993).

Y a partir de la década de los años ochenta se marcó un notable aumento de la QA que llevó al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EUA en 1985 a emitir un informe para alertar a los oftalmólogos sobre la relación entre el uso de lentes de contacto y el surgimiento de esta difícil infección amebiana (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EUA (DHHS), 1986). Lo que aumentó el interés y la investigación sobre estas amebas anfitriónicas.

### **2.3 Justificación**

Las amebas anfitriónicas del género *Acanthamoeba* son capaces de producir lesiones cutáneas, infecciones en vías respiratorias, sinusitis, vaginitis, prostatitis, QA, EAG y enfermedades diseminadas, por lo que son protozoos de importancia clínica. Aunque su incidencia es baja, la infección resultante es grave, no obstante, hasta el momento no existe un tratamiento de elección 100% efectivo. Es por ello que consideramos importante una comprensión profunda de las características biológicas y en particular los mecanismos de patogenicidad con el propósito de ayudar en el diagnóstico clínico, encontrar blancos terapéuticos, así como un tratamiento eficaz. Por lo que conocer la biología de este parásito oportunista, permitirá utilizar estrategias para el control de la infección y tratar a las amebas de una manera más óptima.

### **2.4 Objetivos**

En este escrito se presenta y resume el conocimiento actual sobre las infecciones provocadas por las amebas del género *Acanthamoeba*, se realizó una búsqueda sistemática de la literatura a partir de Enero del 2021 a Junio del 2023 en las bases de datos de PubMed Central y Medline acerca de todo los casos, biología, epidemiología y patogenia reportados desde los años 60s a la actualidad, utilizando

las palabras clave: *Acanthamoeba*, patogenia, casos, epidemiología, mecanismos, reporte, enfermedades, patogénesis, diagnóstico, virulencia, propiedades y características biológicas, EAG, QA, infecciones diseminadas, manifestaciones clínicas, apoptosis, efecto citopático, amebiasis, inmunología, reconocimiento, enzimas, anticuerpos, entre otras. Haciendo relevancia en los mecanismos de patogenicidad, en función de los datos disponibles.

### 3. *Acanthamoeba* spp.

#### 3.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp., consta de dos fases; una fase vegetativa o activa, infectiva o de trofozoíto y una fase latente, quística o de quiste, con actividad metabólica mínima (Marciano- Cabral y Cabral, 2003).

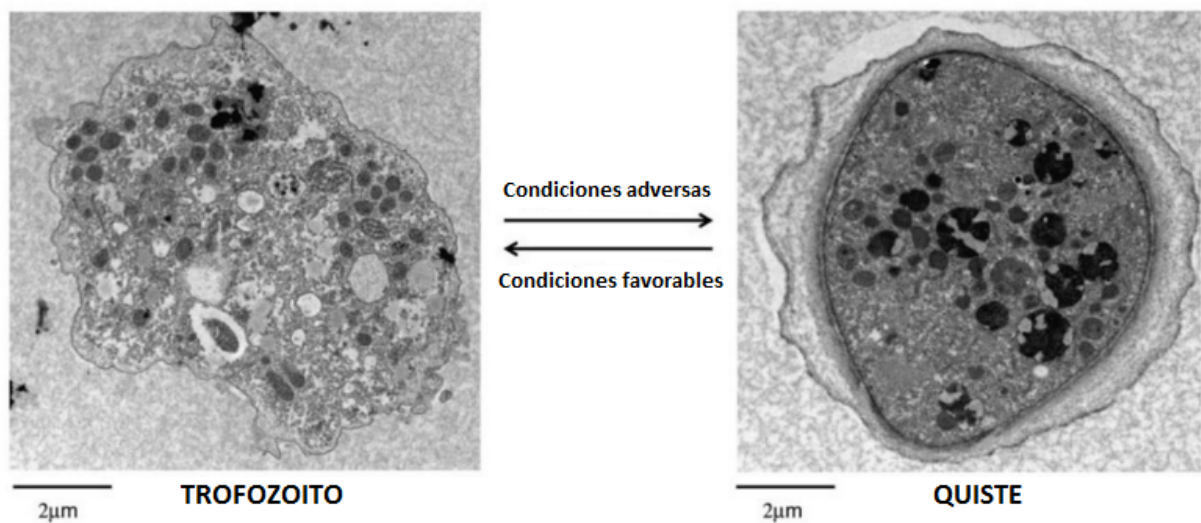


Figura 1. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp., donde bajo condiciones favorables se prevalece el estadio de trofozoíto, mientras que en condiciones adversas se presenta el estadio de quiste, los cambios pueden ser reversibles dependiendo las condiciones ambientales con las que la ameba interactúe (Imagen: Siddiqui, 2012).

##### 3.1.1. Trofozoíto

Los trofozoítos miden entre 15 a 40 µm de longitud, son metabólicamente activos, se reproducen por fisión binaria, se alimentan de bacterias, algas, levaduras y otras

amebas más pequeñas por medio de fagocitosis, también se pueden alimentar por pinocitosis a través de la captación de nutrientes del ambiente. El citoplasma es abundante y tiene un aspecto granular con numerosas vacuolas alimentarias, algunas contráctiles ubicadas alrededor del núcleo, el cual es central de forma esférica u ovalada, con un prominente nucléolo denso y redondeado compuesto por cromatina oscura y condensada (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

### **3.1.2 Quiste**

El tamaño del quiste es variable de 13 a 20  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la especie, se compone de una doble pared; la pared externa o exoquiste puede ser ondulada o lisa y está compuesta de proteínas y receptores en su superficie, mientras que la pared interna o endoquiste puede ser poligonal, estrellada, ovalada o redonda compuesta principalmente de celulosa y quitina (Rubin, 1976). Este estadio les confiere resistencia a muchos factores físicos y químicos como: cambios de pH, temperatura, de presión osmótica, desecación, falta de alimento, compuestos orgánicos e inorgánicos, así como dosis extraordinariamente altas de radiación UV y gamma (Marciano y Cabral, 2003), también se ha reportado que pueden permanecer por más de 24 años a 4 °C conservando su capacidad invasiva (Mazur *et al.*, 1995), además son resistentes a varios agentes antimicrobianos, por ello es importante la implementación y desarrollo de enfoques terapéuticos alternativos para poder erradicarlos (Anwar *et al.*, 2018).

### **3.2. Taxonomía**

Basados en la morfología quística Poussard y Pons en 1977, conformaron en 3 grupos al género *Acanthamoeba*; el grupo 1 posee los quistes de mayor tamaño (mayores a 18  $\mu\text{m}$ ), su exoquiste es rugoso o liso y su endoquiste es de forma estrellada, estas paredes se encuentran separadas entre sí y se unen solo por pequeños poros. El grupo 2 está conformado por las amebas más comunes y de importancia clínica, en las que el exoquiste es rugoso y el endoquiste es poligonal, ovalado o redondo y el tamaño del quiste suele ser menor a 19  $\mu\text{m}$ . En el grupo 3 el exoquiste es delgado y ovalado, el endoquiste redondo u ovalado de aproximadamente 18  $\mu\text{m}$  o menor.

### **3.3 Genotipos**

Actualmente, se agrupan las especies del género *Acanthamoeba* en 22 genotipos; T1 a T22, basado en la secuencia del gen que codifica la fracción 18s del RNA ribosomal, siendo el genotipo T4 el más abundante y de mayor importancia médica (Fuerst y Booton, 2020).

Las 22 secuencias genéticas identificadas, se distinguen genéticamente por diferencias cercanas al 5% entre estas. De las cuales, T4 y T5 son las más frecuentemente aisladas de la naturaleza. Sin embargo, el genotipo T4 es responsable del 90% de estos casos clínicos, por lo que podemos sugerir que T4 es el genotipo más ubicuo y se encuentra en mayor contacto con el ser humano, caracterizado por una mayor virulencia y una menor sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos, mientras que el resto de las patologías reportadas son producidas en menor proporción por los genotipos T2, T3, T6, T11, T13 y T15 (Moreira *et al.*, 2020). Los genotipos T3 y T11 son cercanos al grupo T4 y son el segundo y el tercero más frecuentemente asociados con la QA por lo que podemos pensar que también son los genotipos más virulentos, con mayor resistencia a los agentes quimioterapéuticos y con mayor capacidad de adhesión (Maciver *et al.*, 2013).

Se han descrito y caracterizado alrededor de 31 especies dentro del género *Acanthamoeba* hasta 2020, entre las cuales 18 especies son patógenas o están implicadas en el área médica: *A. polyphaga*, *A. palestinensis*, *A. castellanii*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. lenticulata*, *A. royreba*, *A. divionensis*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. triangularis*, *A. healyi*, *A. stevensoni*, *A. jacobsi*, *A. hatchetti* y *A. byers* (Zhang y Cheng, 2021).

### **3.4 Ecología**

Las amebas del género *Acanthamoeba* son protozoos cosmopolitas, que habitan diversos ambientes acuáticos y terrestres (Zhang y Cheng, 2021). Su hábitat principal es el suelo, desde donde pueden llegar a cuerpos de agua, las cuales son arrastradas por escurrimientos o dispersadas por el aire (De Jonckheere, 1991). Han sido aisladas de muestras de suelo, polvo de diferentes fuentes, diversos tipos de agua: dulce, natural, tratada, de mar, residuales, piscinas, sedimentos, tinas de hidromasaje, aire acondicionado, diversos sitios de hospitales, de la vegetación, de

animales, así como de lentes de contacto y cultivos celulares, por mencionar algunos (Chauque *et al.*, 2022).

Tanto en el agua como en el suelo las amebas desempeñan un papel fundamental en el flujo energético y en el reciclado de nutrientes, por su rápido crecimiento, el uso eficiente de los recursos naturales y el hecho de ser un enlace fundamental entre desintegradores y niveles tróficos superiores, las convierte en un eslabón importante en las cadenas tróficas (Rodríguez-Zaragoza, 1994).

### **3.5 Endosimbiontes**

Se ha observado que *Acanthamoeba* spp., además de comportarse como depredadores también pueden establecer relaciones simbióticas con diversas bacterias, incluyendo aquellas de interés clínico: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. Las amebas también pueden transportar algunos hongos (*Candida albicans*), otros protozoos y algunos virus (*Poxviridae* y *Phycodnaviridae*) (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Denyer *et al.*, 2010).

Las bacterias han sido llamadas bacterias ameba-resistentes las cuales albergan y protegen de ambientes hostiles, generando un medio de transporte y de dispersión, que les favorece su colonización de nuevos ambientes, por lo que las amebas se transforman en peligrosos vectores de estos patógenos al ser humano, ya que las bacterias pueden resistir la acción enzimática y de endocitosis que lleva a cabo la ameba actuando como un “caballo de Troya”, no obstante, algunas bacterias tienen además, la capacidad de reproducirse dentro de la ameba, ocurriendo un proceso de endosimbiosis, convirtiéndose así en reservorios (Schuster y Visvesvara, 2004). Sin embargo, se considera que estas bacterias no solo emplean como reservorios a las amebas, sino que juegan un papel importante en la patogenicidad de las bacterias, ya que su reproducción dentro de las amebas puede incrementar la resistencia bacteriana a los antibióticos y los biocidas, aumentando así su virulencia (Walochnik *et al.*, 2004).

Por ejemplo, se ha observado que *Legionella pneumophila*, agente causal de neumonía y la enfermedad del legionario, secreta el complejo proteico Icm/Dot tipo IV (T4SS) para replicarse dentro de *Acanthamoeba* spp., al igual que lo hace en los macrófagos humanos (Hochstrasser y Hilbi, 2019). Además, se observan varias similitudes en el ciclo de infección por *L. pneumophila* en ambos hospederos, por lo que se sugiere que *L. pneumophila* adquirió las herramientas necesarias para la infección de los macrófagos durante un proceso de coevolución con *Acanthamoeba* spp., (Escoll *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2021).

Se ha reportado que algunas especies del género *Acanthamoeba*, interaccionan sinérgicamente con hongos y bacterias para inducir queratitis. Lo anterior se refuerza con recientes estudios que sugieren que el 10% de casos de QA corresponde a coinfecciones con hongos, mientras que un 5% de éstos son con bacterias (Raghavan *et al.*, 2019).

Por lo que se propone que *Acanthamoeba* spp., proporciona indirectamente un campo de aprendizaje y entrenamiento para intensificar la patogenicidad microbiana, así como mantener los factores de virulencia de sus endosimbiontes, y a su vez ayudar a la transmisión a huéspedes susceptibles, por lo que es un punto de alerta para la salud pública (Mungroo *et al.*, 2021).

#### **4. Importancia médica del género *Acanthamoeba***

##### **4.1 Aspectos clínico**

Su importancia como patógeno para el hombre se reafirma en 1983 al reportarse en EUA veinte casos de EAG, la mayoría de los cuales se reportaron en individuos inmunocomprometidos. Así mismo, *Acanthamoeba* spp., inducen también lesiones cutáneas (Hunt *et al.*, 1995), infecciones en vías respiratorias (Abraham y Lawande, 1982), pulmones (Newsome *et al.*, 1992) y QA en personas inmunocompetentes, patología con mayor número de casos, creciente incidencia e interés médico, la QA está relacionada con el uso de lentes de contacto (Lacerda y Lira, 2021), reportándose casi un millón de consultas médicas anuales en 2010 sólo en los EUA

por QA, con un costo aproximado de \$175 millones de dólares anuales en gastos directos de atención médica (Collier *et al.*, 2014).

#### **4.1.1 Queratitis amebiana**

Se define a la QA como una infección corneal ocular aguda caracterizada por una necrosis progresiva del epitelio corneal (Martínez y Visvesvara, 1997), es una infección poco común, aunque su incidencia va en aumento. Está relacionada en un 85% de los casos con el uso de los lentes de contacto (Lacerda y Lira, 2021), la cual si no es manejada adecuadamente puede causar la pérdida de la visión y después de meses puede incluso llevar a la pérdida del ojo (Hassan *et al.*, 2019). Los síntomas incluyen enrojecimiento, dolor y lagrimeo intenso, fotofobia, sensación de ardor en el ojo, también se ha descrito inflamación de la glándula lagrimal y el músculo extraocular. Por lo general la infección es unilateral, no obstante, también se han descrito casos de una invasión bilateral (Bouheraoua *et al.*, 2014).

#### **4.1.2 Encefalitis amebiana granulomatosa**

La EAG es una enfermedad oportunista con mortalidad entre 97- 98%, ya que, por lo general, la infección ocurre en personas con trastornos metabólicos, fisiológicos e inmunológicos, incluidas personas positivas al VIH, y personas sometidas a trasplantes de órganos o enfermedades crónicas como la diabetes (Visvesvara *et al.*, 2007).

La patogénesis de EAG es compleja ya que la vía de entrada al SNC puede darse a partir de un foco primario en piel lesionada o ulcerada, la mucosa oral, la mucosa intestinal y principalmente por el epitelio olfatorio de la cavidad nasal por inhalación del aire o aspiración de agua contaminada, donde los trofozoítos migran a través de la membrana de la mucosa nasal, la diseminación hematogena y la barrera hematoencefálica hasta los capilares del endotelio del cerebro, alcanzando los pulmones o los senos paranasales (Martínez y Visvesvara, 1997). El período de incubación no está bien definido ya que a menudo es difícil determinar en qué momento tuvo lugar la exposición. El inicio de la enfermedad es lento y sutil, los síntomas se desarrollan en varias semanas o meses. Las características clínicas de EAG incluyen cambios de comportamiento y personalidad, hemiparesia, letargo,

ataxia, fiebre, convulsiones, fotofobia, pérdida de visión, rigidez en el cuello, disfunción inespecífica de los nervios craneales, incluyendo dolor de cabeza, náuseas, vómitos, aumento de la presión intracraneal y pérdida del conocimiento (Visvesvara *et al.*, 2007).

Las autopsias revelan edema cerebral, áreas con reblandecimiento de los ganglios corticales y basales, así como múltiples áreas necróticas y hemorrágicas en los tejidos del SNC. El tronco encefálico, los hemisferios cerebrales y el cerebelo pueden mostrar áreas de necrosis hemorrágica e infiltrados inflamatorios compuesta por células T CD4 y CD8, linfocitos B, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes multinucleadas que forman granulomas en tejidos de pacientes inmunocompetentes las cuales caracterizan la enfermedad, a excepción de huéspedes inmunosuprimidos, que no forman los granulomas (Król y Olender, 2017).

#### **4.1.3 Dermatitis amebiana**

La dermatitis amebiana o amebiasis cutánea ocasionada por *Acanthamoeba* spp., es una infección oportunista poco común. Las lesiones características consisten en nódulos, pústulas, pápulas o ulceraciones cutáneas que contienen trofozoítos y quistes. Particularmente esta patología se presenta en pacientes inmunocomprometidos con VIH, aunque la enfermedad también se ha reportado en pacientes no infectados por el VIH y huéspedes inmunocompetentes (Pritzker *et al.*, 2004).

Las lesiones se localizan principalmente en la cara y las extremidades. Dichas lesiones tienen una consistencia blanda, no dolorosa. Los factores de riesgo para esta infección incluyen áreas traumatizadas, como cicatrices quirúrgicas, lesiones cutáneas, mordeduras, traumatismos mecánicos, quemaduras y trasplante de órganos (Walia *et al.*, 2007). Esta lesión cutánea primaria puede preceder por semanas o incluso meses y puede llegar a provocar EAG o infecciones sistémicas (Król y Olender, 2017).

#### **4.1.4 Infecciones diseminadas o Acanthamebiasis**



Las infecciones causadas por *Acanthamoeba* spp., también afectan los pulmones, el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, el corazón y los huesos. Estas infecciones por lo regular se reportan en individuos inmunocomprometidos como en personas que sufrieron trasplantes de órganos, pacientes con enfermedades crónicas y personas inmunosuprimidas, o sometidas a terapias inmunosupresoras, donde a pesar de su muy rara y baja incidencia, suele ser de muy alta letalidad.

La patogenia sigue sin ser muy clara, ya que *Acanthamoeba* spp. es capaz de invadir dichos órganos a través de diferentes vías, como el tracto respiratorio, el tracto oral o lesiones en la piel (Król y Olender, 2017). En ratones se han observado pulmones con hiperplasia en el epitelio bronquiolar, engrosamiento y congestión de las paredes alveolares y trofozoítos visibles en las paredes vasculares, en el hígado cambios necróticos, acompañados de infiltrados inflamatorios y en los túbulos y glomérulos se observan cambios necróticos (Kot *et al.*, 2018).

#### **4.2 Epidemiología de las infecciones ocasionadas por *Acanthamoeba* spp.**

El reporte de casos de las patologías asociadas por las amebas del género *Acanthamoeba* a nivel mundial es relativamente bajo, a pesar de su amplia distribución mundial y el hecho de que se considera imposible evitar su contacto.

La QA es la patología más común, registrando un aumento significativo tanto en países desarrollados como los subdesarrollados; en gran parte se debe al creciente uso de lentes de contacto a partir de los años 80. En 1985 el CDC emitió un informe para alertar a los oftalmólogos sobre la relación entre el uso de lentes de contacto y está difícil infección amebiana (DHHS de EUA 1986), en él alertaron también del saneamiento, la calidad del agua, la virulencia de las cepas de *Acanthamoeba*, la amplia distribución ambiental y la resistencia de los quistes como los factores de riesgo más importantes a considerar en la epidemiología de la QA (Lacerda y Lira, 2021).

Hasta agosto de 2006, se habían reportado alrededor de 3,000 casos de QA sólo en los EUA (Visvesvara, *et al.*, 2007). No obstante, hasta el día de hoy no existe una cifra certera del número de casos totales reportados de QA, una estimación es de aproximadamente un caso por cada 30 mil usuarios de lentes de contacto, lo que en

general indica una baja incidencia de la infección (Irezabal *et al.*, 2006). Al menos diez especies de *Acanthamoeba* spp., se han descrito como agentes causales de QA: *Acanthamoeba culbertsoni* es la más predominante en los aislados de QA, seguido por *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. quina*, *A. healyi*, *A. hatchetti*, *A. stevensoni*, *A. rhysodes*, *A. lugdunensis* y *A. griffini* (Schaumberg *et al.*, 1998; Roshni *et al.*, 2020).

Se han reportado como agentes causales de EAG: *Acanthamoeba culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* y *A. divionensis*. (Visvesvara *et al.*, 2007), y el número de casos reportados de individuos con esta patología es de aproximadamente 200 en el mundo (Schuster y Visvesvara, 2004), de los cuales 84 casos ocurrieron en EUA y 50 fueron en pacientes diagnosticados con SIDA. En México, se tiene el registro de un caso de EAG por *Acanthamoeba* spp., en el que el paciente sobrevivió (Ortiz *et al.*, 2000); y otro de una infección cerebral mixta, entre *Acanthamoeba* spp., y *Aspergillus* spp., (Bonilla *et al.*, 2001).

Hasta Diciembre del 2021, de todos los casos reportados en el mundo a través de publicaciones internacionales, se registraron 3 595 casos de QA, 88 % de ellos eran usuarios de lentes de contacto; la edad promedio fue de 37.33 años con un rango de los 13 a los 88 años, cabe resaltar 3 casos, en el que se reportaron las amebas *Hartmannella* spp., *Vahlkampfia* spp., y *Vermamoeba vermiformis* en coinfección con *Acanthamoeba* spp., respectivamente.

Se notificaron además de 31 casos de EAG, 36 casos de dermatitis amebiana solo en EUA, 33 casos de escleroqueratitis amebiana, 8 casos de rinosinusitis, uno de ellos fue una coinfección con *Naegleria Fowleri* y un raro caso de acanthamebiasis gástrica donde el paciente no sobrevivió.

#### **4.3 Diagnóstico de las infecciones que causa *Acanthamoeba* spp.**

Para el diagnóstico para la EAG se toman muestras de líquido cefalorraquídeo en donde se observan comúnmente pleocitosis linfocítica, glucosa normal o reducida y elevados niveles de proteínas., también se puede aislar del tejido del paciente y cultivarse monoaxenicamente con *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* a 37 °C. Otros métodos utilizados son el inmunodiagnóstico o herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o RT-PCR (Khan, 2006).

El diagnóstico de la QA se basa en raspados corneales o material recolectado en las biopsias corneales, donde se usan métodos de tinción con hematoxilina y eosina, microscopía confocal o inmunofluorescencia. No se recomienda tomar muestras con hisopos del glóbulo ocular o de las lágrimas, ya que la ameba suele penetrar la córnea en cuestión de horas. Además, igual que en EAG se pueden utilizar técnicas de cultivo *in vitro*, así como los métodos moleculares ya mencionados (Clarke *et al.*, 2006).

El diagnóstico de acanthamebiasis cutánea se basa principalmente en el examen histopatológico de secciones de piel, donde suele visualizarse granulocitos que rodean los linfocitos, células plasmáticas, necrosis cutánea y subcutánea, así como infiltrados de neutrófilos., los malos diagnóstico han provocado un aproximado de 70% de letalidad en dicha patología (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

#### **4.4 Tratamiento de las infecciones ocasionadas por *Acanthamoeba* spp.**

Por lo general los tratamientos implementados contra la QA son de larga duración. Los fármacos utilizados son a base de biguanida (0,02% de polihexametileno biguanida o digluconato de clorhexidina al 0,02%) y las diamidina (0,1% de isetionato de propamidina o 0,1% de hexamidina), en combinación con la aplicación tópica combinada de miconazol al 1% y propamidina al 1%, y el suministro de antibióticos como neomicina, cloranfenicol y netilmicina, por la posible coinfección con bacterias. Los esteroides a veces también son utilizados para aliviar el dolor y reducir la inflamación. En la mayoría de los casos es exitoso este tratamiento; pero es esencial que se tenga un diagnóstico oportuno para dar inicio tempranamente a él (Sengor *et al.*, 2015).

En la EAG más del 90% pueden ser fatales debido a la dificultad del diagnóstico por los síntomas inespecíficos, ya que en muchas ocasiones se puede llegar a confundir con una leptomeningitis bacteriana o viral, además de que el tratamiento sólo logra ser exitoso solo en las primeras etapas, por lo que es muy difícil controlar la infección, donde en la mayoría de ocasiones se ha optado por dar fármacos combinados como anfotericina B con voriconazol, trimetoprim sulfametoxazol con rifampina o meropenem, linezolid, moxifloxacino, miltefosina, fluconazol, entre otros. En general no hay tratamientos recomendados para la EAG, esto se debe a la baja

capacidad y efectividad de que estos agentes puedan cruzar la barrera hematoencefálica hacia el SNC y tengan actividad antiamebiana (Gupta *et al*, 2015).

En cuanto al tratamiento de lesiones cutáneas se ha empleado aplicaciones tópicas de clorhexidina gluconato y ketoconazol en crema en combinación con alguno de estos fármacos: isetato de pentamidina, sulfadiazina, flucitosina, fluconazol y voriconazol con buenos resultados (Schuster y Visvesvara, 2004).

## **5. Respuesta inmune ante la invasión de *Acanthamoeba* spp.**

En la literatura científica disponible hay pocos datos que describen la respuesta inmune del hospedero ante la invasión de estas amebas sobre todo para la EAG y las infecciones diseminadas que no se conoce mucho a diferencia de la QA que es más ampliamente investigada. Los estudios demuestran que se inducen respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas destacando lo siguiente.

### **5.1 Reconocimiento de *Acanthamoeba* spp.**

Las primeras células del cuerpo humano en reconocer a los antígenos de *Acanthamoeba* spp., son las células dendríticas, mastocitos, monocitos, NK, macrófagos, neutrófilos, así como las células epiteliales, entre otras, donde a través de los receptores transmembranales tipo Toll (TLR) son los encargados en detectarlos (Takeda y Akira, 2015). Los TLR son importantes componentes celulares en la detección de elementos estructurales altamente conservados, como los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), expresados por los microorganismos, y los Patrones Moleculares Asociados a Daños (DAMP), que son partículas endógenas liberadas por células necróticas del cuerpo humano. El reconocimiento de los PAMP y DAMP dependiente de TLR induce la activación del sistema inmunitario innato, que posteriormente activa la inmunidad adaptativa específica de antígeno (Ren *et al.*, 2010).

Los TLR más estudiados en la detección de *Acanthamoeba* spp., son los TLR2 y los TLR4, donde se ha observado que los TLR2 reconocen los ligandos de los productos deteriorados de las células muertas o dañadas por la ameba (DAMP) y los TLR4 reconocen las proteínas de choque térmico de la superficie de *Acanthamoeba* spp., (PAMP). Por ejemplo, en el cerebro humano se ha observado que en las células

microgliales, oligodendrocitos, astrocitos y neuronas expresan TLR2 y TLR4 en su superficie cuando reconocen la EAG (Kot *et al.*, 2021).

La detección de *Acanthamoeba* spp., en la córnea de ratas Wistar se da a través del receptor TLR4, el cual se ha observado que ejerce su efecto a través de el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), activando factores de transcripción como el factor kappa B (TLR4-NF- $\kappa$ B) y la vía TLR4-Erk1/2, que en conjunto conducen la secreción de citocinas, incluida la interleucina-8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el interferón beta (IFN- $\beta$ ) principalmente, que son claves en la respuesta inflamatoria y la respuesta innata (Ren y Wu, 2011). La intensidad de la inflamación depende de la funcionalidad del sistema inmunitario, y esta es regulada por la ciclooxygenasa 1 (COX 1), la ciclooxygenasa 2 (COX 2) y los cambios en la defensa antioxidante (Kot *et al.*, 2021).

El sistema del complemento es una barrera para muchas otras infecciones oportunistas y es un elemento clave en la activación de las células del sistema inmune innato, y funciona como un sistema en cascada opsonizando y destruyendo bacterias, protozoos, entre otros (Gutiérrez y Kobeth, 1997). El complemento juega un papel crítico en el reconocimiento y eliminación de *Acanthamoeba* spp., por medio de las células del sistema inmune innato. Este protozoo activa el complemento a través de la vía clásica y la vía alterna. Sin embargo, el papel de estas proteínas no se comprende completamente (Pumidonming *et al.*, 2011).

El primer paso de activación se da mediante la enzima C3, que se divide en dos subunidades C3a y C3b, en donde C3b reconoce y opsonina al microorganismo. La C3b a su vez también participa en la producción de la enzima convertasa C5 que conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana, que se inserta en la membrana del parásito, provocando la lisis celular (Toney y Marciano-Cabral, 1998). Se sabe que muchas amebas son susceptibles al sistema del complemento, sin embargo, se ha reportado que algunas especies de *Acanthamoeba* patógenas son resistentes al ataque de las vías del complemento (Leher *et al.*, 1999).

## **5.2 Respuesta inmune innata contra *Acanthamoeba* spp.**

Se caracteriza por la presencia de macrófagos y neutrófilos como parte de la primera línea de defensa en la QA (Clarke y Niederkorn 2006). Los macrófagos brindan

protección particularmente durante las primeras etapas de la QA; estos son atraídos quimiotácticamente por las amebas. *In vitro* se ha reportado que los macrófagos son capaces de fagocitar los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., (Marciano-Cabral y Toney, 1998). Lo que sugiere que la muerte de los trofozoítos mediada por los macrófagos depende del contacto, sin embargo, *in vivo* se ha visto que pueden soportar su acción (Leher *et al.*, 1999). También se ha observado que los macrófagos no responden quimiotácticamente a los quistes intactos, en cambio la evidencia indica que los macrófagos son capaces de fagocitar a los quistes cuando se encuentran lisados (Hurt *et al.*, 2003).

Los neutrófilos son elementos indispensables de la respuesta inmune innata a patógenos protozoos como *Acanthamoeba* spp. Las evaluaciones histológicas de córnea infectadas por *Acanthamoeba* spp., han revelado una abundancia de neutrófilos tanto en humanos como en animales de experimentación, lo que sugiere que los neutrófilos pueden estar involucrados en la prevención de la QA (Larkin y Easty, 1991).

Los estudios *in vitro* han demostrado que los neutrófilos son capaces de matar a los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., a través de un mecanismo dependiente de mieloperoxidasa (enzimas lisosomales y peróxido de hidrógeno), siendo hasta tres veces más eficiente que la fagocitosis mediada por los macrófagos (Hurt *et al.*, 2003). Además, *in vivo* se demostró la capacidad de los neutrófilos para eliminar los trofozoítos intraoculares, en los que hasta un millón de trofozoítos fueron inyectados en la cámara anterior del ojo y estos fueron eliminados por un infiltrado de neutrófilos, lo que sugiere que los neutrófilos son importantes para prevenir la QA y que ésta progrese hasta una infección intraocular (Clarke *et al.*, 2005).

### **5.3 Respuesta inmune adaptativa contra *Acanthamoeba* spp.**

Se ha observado en muchos casos de QA que los pacientes requieren trasplantes de córnea para restaurar su visión, y aun después de ello los pacientes pueden seguir siendo susceptibles a los trofozoítos, por lo tanto el trasplante de córnea puede contribuir a una recurrencia de la infección, lo que sugiere que la memoria inmunológica no se establece en las infecciones oculares y por lo tanto, el aparato

inmunitario adaptativo no es eficaz para prevenir la infección corneal por *Acanthamoeba* spp., (McClellan *et al.*, 2001).

Es probable que la ausencia de las células presentadoras de antígenos residentes en la córnea, sean las responsables del fracaso para activar el sistema inmune adaptativo en la infección corneal por *Acanthamoeba* spp., ya que se ha visto en cortes histopatológicos de biopsias de QA en humanos y animales de experimentación, una notable ausencia de linfocitos en la córnea (Larkin y Easty, 1991).

También se ha observado que los anticuerpos séricos IgG y la hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) pueden generarse mediante la inmunización sistémica con antígenos de *Acanthamoeba* spp., (Alizadeh *et al.*, 1995). Sin embargo, dicha respuesta de los anticuerpos secretores pueden prevenir la infección corneal solo en los primeros momentos, ya que una vez *Acanthamoeba* spp., supera el epitelio corneal el sistema adaptativo difícilmente altera el curso de la infección, lo que sugiere que la inmunidad mediada por células T y los anticuerpos séricos no protegen directamente contra la QA por *Acanthamoeba* spp., (Nieder Korn, 2021).

El anticuerpo IgA secretor es considerada la inmunoglobulina más abundante en el cuerpo del ser humano y es el principal componente antimicrobiano de las lágrimas, estas recubren continuamente la córnea y sirven para eliminar muchos patógenos potenciales de la superficie ocular. *In vitro* se ha observado que el anticuerpo IgA no afecta la viabilidad de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., Sin embargo, inhibe su adherencia a las células epiteliales de la córnea en los primeros momentos de la infección (Leher *et al.*, 1999). Por lo que se sugiere que es al menos el único componente del sistema inmunitario adaptativo que se ha visto tener la capacidad de proteger contra la QA, no solo de prevenir la adhesión de los trofozoítos al epitelio corneal, sino que también se ha reportado ser capaz de inhibir la metaloproteasa de 133 KDa (MIP-133), que en parte es la responsable de la destrucción del epitelio corneal, incluso cuando IgA se administra después de la infección mejora los signos de la enfermedad (Hurt *et al.*, 2003; Nieder Korn, 2021).

Otros estudios han mostrado contener IgA en la mucosa lagrimal, salival y en la leche materna, y cuando IgA se encuentra ausente las mucosas también son capaces de inhibir el efecto citopático (CPE), sin embargo, en presencia de IgA llega a ser hasta 3 veces más potente. Por lo que dichas secreciones mucosas, contienen constitutivamente una variedad de otros factores humorales, incluido el anticuerpo IgA secretor y otras proteínas antimicrobianas como la lisozima, la lactoferrina y las defensinas que brindan protección contra el CPE inducido por *Acanthamoeba* spp., (Panjwani, 2010). Por lo que la caracterización y comprensión de estos factores presentes en las lágrimas humanas, debería conducir a una mejor comprensión del mecanismo por el cual los tejidos del hospedero resisten la infección y también ayudar a decodificar las circunstancias que predisponen a las infecciones corneales por *Acanthamoeba* spp.,

En cuanto a la respuesta de la inmunidad específica contra la EAG existe muy poca información, aunque, Massilamany *et al.*, (2010), caracterizaron las células inflamatorias del cerebro y médula espinal de ratones infectados con *Acanthamoeba castellanii*. Los infiltrados estaban compuestos en un 51 % de células T (CD4 y CD8 en las mismas porciones) y un 49 % representado por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células B y células natural killer., por lo que nos sugiere que las infecciones causadas por estas amebas pueden inducir linfocitos T específicos de *Acanthamoeba* spp., en el SNC. Además se reconoce que en el cerebro los TLR2 y TLR4 sean los responsables en activar las respuestas Th1 (celulares) y Th2 (humorales) a través de las células presentadoras de antígenos y algunas citocinas como la IL-12, IL-23 e IL-27 que promueven la diferenciación de las células Th1, e inhiben la diferenciación de las células Th2 (Kot *et al.*, 2021).

## **6. Mecanismos de patogenicidad**

Entre las patologías causadas por *Acanthamoeba* spp., como la EAG o las infecciones diseminadas, el mecanismo de patogenicidad no es evidente y se conoce poco, en comparación a la QA que es relativamente más común y cuenta con mayor número de estudios (Wang *et al.*, 2020). Donde una vez que *Acanthamoeba* spp., se adhiere a la célula diana, activa la transducción de señales intracelulares que desencadena una serie de eventos en cascada que incluyen la secreción enzimática, la fagocitosis, la inducción de la apoptosis, la migración y



penetración a las células más profundas., así como la activación de múltiples vías de señalización celulares del hospedero (muchas de ellas aún desconocidas).

En estudios realizados en modelos animales como ratones BALB/c, ratones suizos, ratas, hámsteres, cerdos, conejo y langostas ha descrito la interacción de *Acanthamoeba* spp., y su hospedero. De igual forma se han empleado líneas celulares corneales humanas, células microgliales, células del neuroblastoma, neuronas, células MDCK, queratinocitos, entre otros, donde se sugiere que, en la mayoría de los casos, los cambios observados sean análogos a lo que podría suceder en las infecciones de los humanos. (Visvesvara, 2013).

El daño causado por los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., en el curso de las infecciones corneales o cerebrales se deben a varios mecanismos patogénicos diferentes, de los cuales podemos dividir en mecanismos dependientes e independientes de contacto, los cuales trabajan sinérgicamente para producir un CPE en las células hospederas (Panjwani, 2010).

También es importante considerar otros factores indirectos que contribuyen en la virulencia de la ameba, como diversos factores ambientales, características propias de cada cepa, la resistencia del hospedero, entre otras (Siddiqui y Khan, 2012).

## **6.1 Vías de entrada**

Una de las vías en que estos protozoos entran a el cuerpo humano es a través de la inhalación de aire o aspiración de agua contaminada, la infección generalmente comienza con la penetración del tracto respiratorio superior (sinusitis, rinosinusitis) o a través de la piel ulcerada o lesionada (dermatitis amebiana) y ésta una vez que ha ingresado al cuerpo se puede dispersar vía hematógena al SNC (encefalitis amebiana granulomatosa) o diseminarse a otros órganos (infecciones sistémicas) e incluso llegar invadir los huesos, especialmente cuando dichas barreras tisulares se encuentran dañadas., y en cualquiera de estos casos existe un mayor riesgo para personas inmunosuprimidas, VIH/SIDA, pacientes con trasplante de órganos e individuos alcohólicos o diabéticos (Król y Olender, 2017).

A través la membrana de la mucosa nasal *Acanthamoeba* spp., puede abrirse camino al SNC, por el endotelio de los capilares del cerebro y el hueso etmoides a lo

largo de los nervios olfatorios, llegando interaccionar con neuronas, células de Schwann y células microgliales (Król y Olender, 2017). Otras vías como, la mucosa oral, la mucosa intestinal o el tracto reproductivo son posibles sitios para la infección y diseminación de los trofozoítos, sin embargo, la vía más común de infección es a través de la córnea, donde suele alojarse solamente en el tejido corneal, poniendo en riesgo la visión del hospedero (Visvesvara, *et al.* 2007).

Inicialmente se llegó a pensar que *Acanthamoeba* spp., para penetrar la superficie de la córnea, previamente tendría que estar lesionada y así pudiera invadir el estroma y llegar a destruir la lamela del ojo. Por lo tanto, se aceptó que un traumatismo previo en el epitelio corneal puede dar inicio a la QA (Khan, 2001). Más recientemente se ha demostrado que las amebas son capaces de provocar daño en las córneas intactas ya que pueden adherirse a las superficies inertes de los lentes de contacto y llegar directamente así a la córnea, lo que genera hipoxia y la reducción de la resistencia del epitelio, lo cual puede fomentar la invasión microbiana (Clarke y Niederkorn, 2006). Además, el uso prolongado de lentes de contacto puede generar úlceras corneales y aumenta el período de contacto de estas amebas en la córnea, lo que incrementa la posibilidad de QA, especialmente para aquellos ya con abrasión o lesión corneal (Clarke *et al.*, 2005).

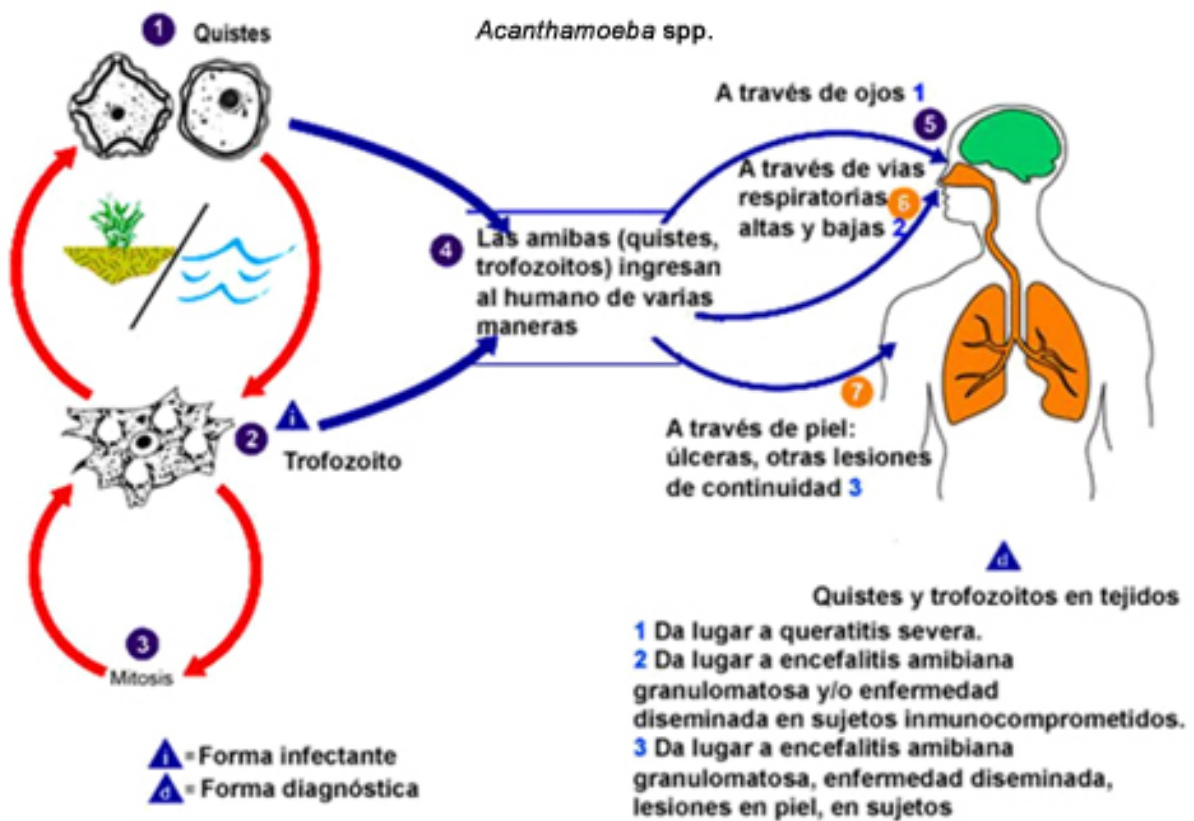


Figura 2: Vías de entrada de *Acanthamoeba* spp., al cuerpo humano; Las flechas rojas muestran su ciclo de vida; en una fase exozóica o de vida libre, y las flechas azules corresponden a la fase endozóica o parasítica, donde puede provocar diferentes patologías dependiendo la vía de entrada al cuerpo humano. Por ejemplo, a través de la córnea provoca QA, a través del tracto respiratorio EAG e infecciones diseminadas en personas inmunocomprometidas, y a través de la piel también puede provocar dermatitis amebiana, EAG e infecciones diseminadas en personas inmunocomprometidas (Traducido del CDC).

## 6.2 Mecanismos dependientes de contacto

Dichos mecanismos están relacionados con la interacción física directa de la ameba sobre sus células hospederas, tal como la capacidad de adherencia, la fagocitosis, la migración y la secreción de enzimas específicas.

### 6.2.1 Adhesión y la secreción de proteasas dependientes de contacto

La adhesión al epitelio es considerada el primer paso importante en la patogenia que estas amebas provocan y un prerrequisito crucial para desencadenar los posteriores mecanismos de patogenicidad en el establecimiento de la infección (Visvesvara *et al.*, 2007). Distintos autores han demostrado que esta adherencia al epitelio está mediada por las adhesinas presentes en la membrana de la ameba, como una proteína de unión a manosa (MBP) (Garate *et al.*, 2006). En modelos *in vitro* de QA en humano (Moore, 1991), córnea de cerdo, hámster chino (Niederhorn *et al.*, 1992) y de conejo (Panjwani, 1997; Feng *et al.*, 2015), entre otras, se ha reportado esta adherencia mediada por MBP.

La MBP es una molécula transmembranal con un receptor de superficie celular típico, con un peso de 400 kDa compuesto de subunidades de 136 kDa, que se encuentra presente en la membrana de la ameba. Esta molécula interactúa con gran afinidad con las células de la córnea a través de las glucoproteínas, que son uno de los principales componentes en la superficie de la membrana celular de todas las células eucariotas. Las glucoproteínas presentes en el epitelio corneal contiene gran cantidad de carbohidratos con bastantes residuos de proteínas manosiladas, y es ahí donde se lleva a cabo la adhesión (Panjwani, 2010).

Además de adherirse con gran afinidad a la manosa del epitelio corneal, la MBP también es crucial para la adherencia de los trofozoítos a otros componentes de la matriz extracelular (MEC), como lo es el colágeno, la fibronectina y la laminina (Garate *et al.*, 2006; Panjwani, 2010). Por ejemplo, se ha visto que *A. polyphaga* se une a laminina, colágeno IV y fibronectina de manera dependiente de manosa y calcio, y esta adhesión llega a estimular la secreción de una metaloproteinasa dependiente del contacto (Yang *et al.*, 1997; Soto-Arredondo *et al.*, 2014).

Se sabe que MBP se une además al metil-manopiranosil, pero no se adhiere a otros sacáridos como la galactosa-BSA, la lactosa o la fructosa (Soto-Arredondo *et al.*, 2014). Se ha observado en cerdos y hámsteres que la inmunización oral con MBP recombinante de *Acanthamoeba* spp., induce un aumento de las IgA anti-MBP en sus lágrimas y esto les brinda protección al inhibir la adhesión de *Acanthamoeba* spp., (Panjwani, 2010). También se ha observado que la  $\gamma$ -manosa libre exógena es

capaz de inhibir la unión de *Acanthamoeba* spp., al epitelio corneal, y esta inhibición se correlaciona con el aumento de la secreción de las proteasas, por lo que se sugiere que MBP favorece la expresión y secreción de algunas proteasas (Garate *et al.*, 2006).

*In vitro* se evidenció que una Metaloproteasa de 133 KDa (MIP-133) dependiente de manosa, posee actividad colagenolítica al degradar el colágeno tipo I y IV y migrar a través de él, por lo que se ha sugerido que MIP-133 juega un papel importante en la infección corneal (Hurt *et al.*, 2003). Así mismo se ha reportado otra metaloproteína P3 citotóxica que también es mediada por manosa la cual es capaz de inducir un CPE en las células hospederas, y su acción se inhibe al bloquear la adhesión (Panjwani, 2010).

Además, se considera que pueden existir más de 10 adhesinas implicadas en el proceso de adhesión con las células hospederas (incluyendo MBP) y todas ellas se encuentran fuertemente ancladas a la red del citoesqueleto de la ameba, por lo que utilizando despolimerizadores de la actina como la citocalasina B y latrunculina B se vio una notable disminución en la adhesión, así como la nula formación de acantopodios, por lo que supone son unas estructuras altamente importantes en el proceso de infección, por lo que MBP podría no ser la única adhesina presente en el proceso de adhesión como se ha sugerido (Soto-Arredondo *et al.*, 2014), se reconocen otras adhesinas implicadas en la adhesión del epitelio corneal, como la proteína de unión a laminina (LBP). En *A. healyi* se ha reportado que se adhiere mediante AhLBP (55 kDa) a la membrana de Bowman y a los componentes de la MEC (laminina, colágeno tipo I), que subyacen a la lámina basal (Ng *et al.*, 2017). Sugiriendo que la unión a laminina y colágeno es un atributo de las especies patógenas de *Acanthamoeba* spp., (Gordon *et al.*, 1993; Ng *et al.*, 2017).

Kennett *et al.*, (1999) analizó la capacidad de adhesión de los diferentes genotipos probando que los genotipos T3, T4 y T11, son los genotipos que poseen una mayor capacidad de adhesión a las células epiteliales de la córnea y son de los genotipos con mayor número de casos reportados. Principalmente se mostró que el genotipo T4 tiene una mayor capacidad de adhesión y es el genotipo con mayor número de casos reportados, a diferencia de los genotipos T2 y T7 que exhibieron una mínima adhesión, así como una nula cantidad de antecedentes de casos reportados, lo que

fue comprobado por Gárate *et al.*, (2006) mostrando una mayor capacidad de adhesión por las cepas aisladas T4 de casos clínicos, donde expresaron sólidamente MBP y un potente CPE, por lo que podemos pensar que el potencial patogénico de *Acanthamoeba* spp., está directamente correlacionado con el nivel de expresión de MBP de la ameba (Panjwani, 2010).

## 6.2.2 Fagocitosis y efecto citopático

Posterior a la adhesión, algunas células hospederas ya sea en infecciones corneales o de SNC pueden presentar un efecto citopático (CPE) (Cao *et al.*, 1998). Takeda y Akira (2015) propone que es esencial que las células entren en contacto directo con los trofozoítos para inducir y desencadenar su CPE en células de la córnea humana, observado que gran parte del daño celular será por los amebostomas y otras estructuras endocíticas que emite *Acanthamoeba* spp., en minutos posteriores de iniciar la interacción con las células hospederas. Por lo que se piensa que al mismo tiempo que se desprenden y fagocitan las células hospederas, éstas comienzan a entrar a un CPE (Panjwani, 2010). Sin embargo, la ameba también puede dejar las células intactas y migrar a través de las uniones estrechas para dañar células más profundas. *In vitro* utilizando células MDCK y células de córnea de hámster, se observó que el daño en la monocapa celular y el CPE está relacionado con la interacción trofozoíto-célula y el movimiento de las amebas entre estas células favorece su migración (Omaña-Molina *et al.*, 2013).

La fagocitosis es un proceso de endocitosis dependiente de actina que implica la internalización de las partículas o células dañadas de la superficie epitelial, las cuales son desprendidas y engullidas por los trofozoítos, los cuales muestran ciertos cambios morfológicos y producen los amebostomas para posteriormente introducir el material ingerido dentro de sus vacuolas alimenticias intracitoplasmáticas. González-Robles *et al.*, (2009) observó en *Acanthamoeba castellanii* que además de presentar amebostomas, pueden ingerir partículas más pequeñas que se acoplan a través de otras estructuras microfagocíticas que han sido designadas como digitopodios, “food cups”, ventosas cilíndricas o estructuras succionadoras, que comienzan a emitirse hasta en minutos después de la adhesión. Sin embargo, queda por esclarecer cuál es la naturaleza del tejido diana que desencadena las señales que estimulan las diferentes estructuras endocíticas.

Además se ha observado el impacto de *Acanthamoeba castellanii* y su CPE en la monocapa de células MDCK, mostrando que las co-incubaciones donde se pudo detectar el primer daño citopático fue en 1h por una acción mecánica/ enzimática directa de la ameba, midiendo la resistencia transepitelial (RTE) la cual disminuyó gradualmente hasta un 51% en 6h. Por otra parte también se incubó solo el medio condicionado de *A. castellanii* en donde se observó una moderada reducción de la RTE en un 86% en 6h., por lo que podemos suponer que la acción mecánica de los trofozoítos sobre las células diana juega un papel importante en el mecanismo citolítico, y la producción de estructuras fagocíticas representa un mecanismo importante de daño celular (González-Robles *et al.*, 2006).

También se ha reportado el mecanismo de patogenicidad en otros géneros de AVL como *Hartmannella* sp. y *Vahlkampfia* sp. mostrando que en presencia de contacto un CPE total en la monocapa de queratinocitos en las primeras 24 h, mientras en ausencia de contacto, se mostró un daño mucho más lento de hasta un 75% en el mismo tiempo. Además la fagocitosis fue el principal mecanismo de daño celular (Kinnear, 2003).

Utilizando a *A. culbertsoni* se indujo el CPE en células microgliales de rata, y se reportó que los trofozoítos producen digitopodios al entrar en contacto con las células microgliales que provocan cambios en los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  que las lleva a sufrir un proceso apoptótico, llevando a la lisis de la membrana plasmática y lisis de las pequeñas membranas de las vacuolas citoplásmicas (Shin *et al.*, 2001). Alizadeh *et al.*, (1994) también reportan características propias de la apoptosis en células tumorales expuestas al parásito, como la contracción celular, lisis de la membrana plasmática y la condensación nuclear.

De la misma manera es apoyado por Petit *et al.*, (1996) usando células de neuroblastoma de rata B103, y trofozoítos de cuatro especies diferentes de *Acanthamoeba*, donde después de entrar en contacto con las células diana se producen estructuras denominadas “food cups” que fagocitan las células nerviosas, y lleva a procesos propios de la apoptosis como la lisis de la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y la lisis celular.

Así mismo, en neuroblastoma de ratón se describen procesos proapoptóticos como la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, la liberación del citocromo B y la activación de las caspasas, habiéndose observado que pueden intervenir las ecto ATPasas en la activación de la caspasa 3 y las proteínas antiapoptóticas mitocondriales Bax y Bcl-2 (Chusattayanond *et al.*, 2010).

También, se ha observado que la interacción entre *Acanthamoeba* spp., y las células Schwann, puede resultar en autofagia y necrosis como otros mecanismos de muerte celular., sin embargo, esta interacción se caracterizó principalmente por mecanismos dependientes de contacto, incluido el contacto íntimo y la fagocitosis a través de la emisión de amebostomas desempeñando un papel activo en la lisis y la absorción de diferentes partículas (Castelán-Ramirez *et al.*, 2020).

### **6.2.3 Migración e interacción con las uniones celulares**

*Acanthamoeba* spp., al ser un patógeno extracelular, su ruta de migración probablemente ocurre a través de la ruta paracelular interrumpiendo las uniones estrechas y/o a través de la vía transcelular por el daño que puede ejercer sobre las células hospederas (Elsheika y Khan, 2010).

En ensayos *in vivo* reportados por Omaña-Molina *et al.* (2004), se describe la interacción de *A. castellanii* con la córnea del hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*). Después del proceso de adhesión de los trofozoítos a la superficie epitelial ocurre su fagocitosis y daño del tejido, que lleva a la migración de las amebas entre los bordes celulares, provocando la separación de las células adyacentes en tan solo una 1h después del co-cultivo, migrando y penetrando hacia capas más profundas formando abultamiento de la superficie corneal y desestabilización del tejido.

Lo anterior fue probado *in vitro* en células de córnea humana, donde los trofozoítos de *A. castellanii* migraron entre las células formando protuberancias causando la separación de las células adyacentes, llegando a apreciar diferencias morfológicas cuando los trofozoítos penetran a través de los espacios reducidos de las uniones estrechas, adoptando una forma alargada para atravesar, induciendo la alteración de la arquitectura normal del epitelio corneal y llegar a la membrana de Bowman en tan solo 3 h, donde la mayoría de las células superficiales y células medias del epitelio corneal se han desprendido y separado del resto del tejido, además se demostró que



el medio condicionado de *A. castellanii* causó daño solo en la capa corneal más superficial y esto solo promovió la separación de las células, dañando sus uniones estrechas (Omaña-Molina *et al.*, 2010).

Esto vuelve a ser confirmado *in vitro* por Omaña-Molina *et al.*, (2013) en células corneales de hámster y células MDCK donde la invasión y disrupción del tejido se realizó por la penetración de los trofozoítos por un efecto totalmente mecánico a las capas subsecuentes más profundas de la córnea mediante las uniones estrechas o a través de las propias células de la córnea. Además se observó que la contribución enzimática solo daña las uniones estrechas, separando las células y dejando pequeños espacios entre ellas, lo que facilita la migración de las amebas.

De una manera similar en la interacción con las células endoteliales microvasculares primarias del cerebro humano, se demostró que las serinas proteasas extracelulares de *Acanthamoeba* spp., perturban la integridad de la monocapa de la célula huésped al degradar las proteínas de las uniones estrechas, como la ocludina y la zonula-occludens-1 de una manera dependiente de Rho cinasa, resultando en un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, penetración y migración de las amebas (Khan y Siddiqui, 2009).

También se ha reportado la interacción con las células endoteliales de rata al degradar las proteínas de las uniones estrechas, incluidas la ocludina y la zonula-occludens-1, reduciendo los valores de RTE a casi cero, provocando una reducción dependiente de Rho de zonula-occludens-1 de manera dependiente del tiempo, de manera similar a los observado en *Naegleria fowleri* (Coronado-Velázquez *et al.*, 2018).

Flores-Maldonado *et al.*, (2017), usando células MDCK, confirma daño también en las uniones estrechas pero principalmente por parte de los trofozoítos, dejando las células epiteliales adyacentes intactas, degradando las proteínas como claudina 2 y redireccionando claudina 4, aboliendo la RTE y aumentando la permeabilidad paracelular por más de 6h, manteniendo esta condición hasta las 24h.

Hernández-Jasso *et al.*, (2020), reportó en un modelo *in vivo* de piel de rata el proceso de migración de *A. castellanii* en las células epiteliales a través de la dermis, hipodermis y el músculo, que en conjunto se vio alterada toda la arquitectura tisular,

ya que durante su invasión los trofozoítos fagocitaron y degradaron la MEC con su actividad colagenolítica de las diferentes enzimas., ya que *in vitro* mostraron la capacidad de degradación del colágeno tipo I, la cual aumenta la permeabilidad y beneficia la migración a las capas epiteliales más profundas, hasta una diseminación hematógena, pudiendo invadir eficientemente cualquier tipo de células, pulmonares, hepáticas, entre otras.

Aunque resulta evidente el tropismo que tienen *Acanthamoeba* spp., al SNC, recientemente se ha revelado el papel de las sustancias neuroactivas como dopamina, glutamato, serotonina y taurina como quimioatrayentes en la migración de las amebas al SNC e inducir la formación de un mayor número de bocas fagocíticas (Talamás-Lara *et al.*, 2022).

### **6.3 Mecanismos independientes de contacto**

Dichos mecanismos están relacionados con la interacción indirecta de la ameba sobre sus células hospederas, tal como las proteasas, las vesículas extracelulares, los factores de evasión del sistema inmune, entre otras.

#### **6.3.1 Enzimas**

Es importante la actividad proteolítica de las diversas enzimas hidrolíticas que segrega *Acanthamoeba* spp., y que incluyen fosfolipasas, glucosidasas, metaloproteasas, así como una variedad de serina y cisteína proteasas, ya que todas ellas catalizan la degradación de los enlaces peptídicos y varias proteínas de las células hospederas, como las proteínas de las uniones estrechas, proteínas estructurales de la MEC como el colágeno, la fibronectina y la laminina, suponiendo tener una actividad de colagenasa, elastasa y peroxidasa, que son fundamentales para las amebas patógenas, además de una baja actividad de superóxido dismutasa (Cho *et al.*, 2000; Na *et al.*, 2001;).

El uso de las proteasas proteolíticas se ha reportado en varios protozoarios como *Entamoeba*, *Leishmania*, *Trichomonas*, *Tripanosoma*, y *Plasmodium* donde son un importante factor de la virulencia, ya que están implicados en su patogenicidad como la invasión de tejidos, la degradación de proteínas del huésped, la ingesta de nutrientes y la inducción al enquistamiento-desenquistamiento (Wang *et al.*, 2023). En *Acanthamoeba* spp., se ha demostrado que segregan una gran variedad de

enzimas de diferente peso molecular (33, 35, 47, 60, 65,75, 100 y 230 kDa) de serin proteasas y en menor medida de cistein proteasas (43, 59, 70, 100, 130 kDa). Sin embargo, también se han reportado otras enzimas con actividad nula principalmente en las cepas no patógenas, como la fosfolipasa A y algunas otras proteasas (Leher *et al.*, 1998; Khan y Siddiqui, 2009).

Recientemente se han identificado 711 genes presentes en dos aislados patógenos de *Acanthamoeba* y ausentes en especies no patógenas, por lo que dichos genes pueden participar en los mecanismos de patogenicidad que ayudan en los procesos fisiológicos, de reconocimiento y digestión. Entre tales genes están los que codifican la proteína de la actina, una proteína del citoesqueleto y los de la síntesis de las lipasas incluidas la fosfolipasas y la lisofosfolipasas involucradas en la ruptura de la membrana y la lisis celular. Además se han hallado diferentes peptidasas y la proteína de la subfamilia S8/S53, que ayudan también en la invasión del huésped (Venny *et al.*, 2020).

Las cistein proteasas son esenciales en el ciclo de vida de muchos protozoos al influir en procesos como la degradación de proteínas del hospedero, la ingesta de nutrientes, la evasión de células del sistema inmune, el enquistamiento y desenquistamiento. Por ejemplo, la cisteína proteasa de *A. castellanii* (AcCP 3), se reconoce por su capacidad de hidrolizar algunas proteínas del hospedero incluidas la hemoglobina, la albúmina, la IgG y la IgA. Por su parte, la AcCP 6 tiene una participación en el desarrollo del enquistamiento y desenquistamiento, principalmente empaquetando materiales de la pared del quiste en respuesta de señales ambientales, lo que sugiere que ambas cisteína proteasas son elementos importantes en la patogénesis de *Acanthamoeba* spp., (Wang *et al.*, 2023).

Las serin proteasas también son elementos importantes en la patogenicidad de *Acanthamoeba* spp., se ha observado que la enzima purificada es capaz de degradar el colágeno, la fibronectina, la IgG, la IgA, el plasminógeno, la hemoglobina (Na *et al.*, 2001) y proteínas de las uniones estrechas (Khan y Siddiqui, 2009), además ha mostrado inducir un CPE en células epiteliales de la córnea humana y fibroblastos (Cho *et al.*, 2000).

Las Metaloproteinasas de matriz (MMP) son más de 20 subtipos de proteínas que desempeñan un papel importante en la regulación de procesos, como la diferenciación, comunicación y migración celular, la angiogénesis y el desarrollo de la inflamación por su capacidad de degradar las citocinas. Las MMP también influyen en la supervivencia celular, la activación de la apoptosis y la degradación de la MEC (Kot *et al.*, 2021). Por lo que pueden ser otra causa de llevar al CPE a las células hospederas (Panjwani, 2010).

Las neuraminidasas también son relevantes en la colonización del parásito, produciendo daño en el epitelio corneal en sitios ricos en ácido salicílico y alteraciones de los glucolípidos asociados a la meningitis (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

En general, en el proceso patogénico de *Acanthamoeba* spp., se favorece en gran medida por la secreción de las diversas enzimas patógenas, sin embargo, se ha observado que estas inducen también la activación de una serie de vías de señalización celular en el hospedero, como los receptores acoplados a la proteína G y los receptores beta adrenérgicos de adrenalina (Aqeel *et al.*, 2015), el receptor TLR4, el gen (MyD88) y sus factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (TLR4- NF- $\kappa$ B) y la vía TLR4-Erk1/2 que en conjunto regulan las citocinas que incluyen IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , entre otras (Ren y Wu, 2011), el fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) (Sissons *et al.*, 2005), la fosfolipasa citosólica A2 y las ecto-ATPasas que inducen apoptosis (Tripathi *et al.*, 2013).

Las proteasas también son capaces de activar la vía Ras/Raf/Erk, que es la principal vía de señalización que regula la aparición de tumores y la regulación de la apoptosis, a través de la liberación de del citocromo C mitocondrial, la caspasa 9, la caspasa 8 y p53 (Sonoda *et al.*, 1998)., Esta vía también se encuentra implicada en la respuesta inflamatoria de córneas de ratones, y además, activan el factor de crecimiento de los hepatocitos en córneas humanas, por lo que se sugiere que las proteasas que secreta *Acanthamoeba* spp., pueden contribuir de una manera indirecta a inducir la apoptosis en las células hospederas (Liang *et al.*, 1998 ;Panjwani, 2010).

### **6.3.2 Vesículas extracelulares y toxinas**

Recientemente se comprobó la participación de las vesículas extracelulares (EVs) en la comunicación intercelular tanto en células procariotas como eucariotas. Las EVs, son un grupo diverso de nanopartículas liberadas rodeadas por una bicapa de fosfolípidos que contienen una carga bioactiva de proteínas, metabolitos, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y lípidos. Dependiendo de su composición, tamaño y biogénesis estas EVs podrían clasificarse en exosomas (< 100 nm); microvesículas, micropartículas o ectosomas (100 nm–1 µm) y cuerpos apoptóticos (> 2 µm). Además de la comunicación intercelular y la patogénesis, las EVs se han involucrado en la inmunomodulación, la evasión de la respuesta inmune y la metástasis, entre otros aspectos relevantes y de interés en la patogenia por *Acanthamoeba* spp., (Marcilla *et al.*, 2014).

Se sabe también que varios protozoos producen toxinas proteicas solubles que generan poros dentro de la membrana celular del hospedero provocando la muerte de las células diana y daños en los tejidos, tal es el caso de los amebaporos de *Entamoeba histolytica*. Se ha reportado que *Acanthamoeba* spp., posee una toxina, la acanthaporina, la cual mostró ser citotóxica para las células neuronales humanas, además de presentar actividad antimicrobiana contra un amplia variedad de especies bacterianas, ya que la acanthaporina tiene la capacidad de permeabilizar su membrana plasmática con poros de aproximadamente 0,5 nm (Michalek *et al.*, 2013).

### **6.3.3 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero**

Muchos parásitos protozoarios han desarrollado una variedad de mecanismos diseñados para evadir la respuesta inmune del hospedero y establecer infecciones crónicas. Algunos de los mecanismos utilizados por *Acanthamoeba* spp., son la variación de sus antígenos de superficie, la degradación de anticuerpos, la modulación de la respuesta inmunitaria del huésped, la prevención de la lisis mediada por el complemento y el desarrollo de quistes (Clarke y Niederkorn, 2006).

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., pueden ser capaces de enmascarar sus antígenos de superficie para escapar del reconocimiento inmunológico (Mathers *et al.*, 1987). Sin embargo se ha observado que los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.,

pueden ser inmunogénicos y capaces de provocar hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) de IgG e IgA secretora de respuestas (Alizadeh *et al.*, 1995; Said *et al.*, 2004). Sin embargo en células epiteliales corneales de hámster chino se ha demostrado que tras la estimulación de *Acanthamoeba* spp., hay un aumento significativo de los anticuerpos IgG e IgA, y ellos son degradados principalmente por las MMP y las serinas proteasas (Betanzos *et al.*, 2019).

El sistema del complemento se activa como parte de la respuesta inmune del sistema innato contra los patógenos protozoarios y consta de varias enzimas que están presentes en el suero humano, el cual tiene un comportamiento amebicida que facilitan la opsonización y eliminación de los patógenos (Pumidonming *et al.*, 2011). Los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., activan la vía clásica y la vía alternativa del complemento. Sin embargo, el papel del complemento en la eliminación de trofozoítos durante la infección de la córnea por *Acanthamoeba* spp., es incierto ya que hay autores que afirman que los trofozoítos pueden sucumbir a la lisis del complemento en presencia de anticuerpos (Ferrante y Abell, 1986; Ferrante, 1991; Toney y Marciano -Cabral, 1998; Leher *et al.*, 1999).

*In vitro* se ha demostrado que *Acanthamoeba* spp., puede resistir la lisis mediada por el complemento, posiblemente debido a la presencia de proteínas inhibitoras del complemento en la superficie del trofozoíto, que en gran medida se puede explicar dependiendo la cepa que sea utilizada, ya que se ha observado que los aislamientos patógenos de *Acanthamoeba* spp., son más resistentes a la vía del complemento que los aislados no patogénicos. Por ejemplo, Toney y Marciano-Cabral (1998) utilizaron 3 especies de *Acanthamoeba* patógenas y al interaccionar con las proteínas del complemento del suero humano, demostraron que las proteínas agotaron su actividad principalmente por *Acanthamoeba castellanii* al resistir la lisis mediada por el complemento.

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., también tienen la capacidad de enquistarse durante la fase más activa de la infección y pueden migrar para enquistarse a diferentes tejidos humanos, lo que genera que sean aún más resistentes al ataque inmunológico y sea un mayor riesgo para la infección (Aksozek *et al.*, 2002; Niederkorn, 2021).

Sin embargo, se ha reportado que el quiste de *Acanthamoeba* spp., es antigénico cuando se introduce en sitios no oculares (McClellan *et al.*, 2002), ya que, se ha observado un alto número de quistes en las córneas infectadas, por lo que estos poseen una débil inmunogenicidad en el tejido ocular debido a que se ubican en un sitio inmunológicamente privilegiado, lo cual explica cómo pueden permanecer latentes en la conjuntiva y el estroma del ojo sin ser detectados y eliminados por el sistema inmunitario por largo tiempo, incluso después de un tratamiento “exitoso” o bien después de un trasplante de córnea, lo que supone un gran riesgo al contribuir a una recurrencia de la infección (Hurt *et al.*, 2003).

#### **6.4 Factores indirectos de virulencia**

La capacidad de *Acanthamoeba* spp., para producir enfermedades humanas es un proceso multifactorial y depende de su capacidad para sobrevivir fuera de su hospedero durante períodos variables de tiempo y de soportar diversas condiciones ambientales. Se ha observado que las cepas patógenas muestran una mayor resistencia a las altas temperaturas, pudiendo crecer a más de 42°C, así como soportar una alta osmolaridad y pH, suponiendo una mayor capacidad de prevalencia en el ambiente, así como del cuerpo humano (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Otros factores indirectos a tomar en cuenta son su capacidad de enquistarse, su amplia ubicuidad, las interacciones en las biopelículas, la quimiotaxis, la salud del hospedero, así como la resistencia a los medicamentos, entre otros (Siddiqui y Khan 2012).

##### **6.4.1 Ubicuidad**

*Acanthamoeba* spp., ha sido aislada de muestras de suelo, polvo de diferentes fuentes, diversos tipos de agua: dulce, natural, tratada, de mar, residuales, piscinas, sedimentos, tinas de hidromasaje, del aire acondicionado, diversos sitios de hospitales, así como de lentes de contacto, cultivos celulares, de la vegetación y de animales por mencionar algunos (De Jonckheere, 1991). Además, *Acanthamoeba* spp., se ha aislado de la mucosa nasofaríngea y muestras orales de individuos sanos asintomáticos, lo que sugiere una exposición omnipresente de este protozooario en el ambiente (Cursons *et al.*, 1980) También, analizando los linfocitos

de sangre periférica, se ha encontrado que el 50% de los individuos sanos muestran respuestas proliferativas de células T a los antígenos de *Acanthamoeba* spp., apoyando la hipótesis de que la exposición no infecciosa a *Acanthamoeba* spp., estimula el aparato inmunitario adaptativo y buena parte de la población ha estado en contacto con la ameba al menos en una ocasión (Nieder Korn, 2002).

En un estudio más reciente de Brindley *et al.*, (2009), demostraron que más del 85% de la población humana contiene anticuerpos IgA séricos contra antígenos de *Acanthamoeba* spp., secreciones mucosas, lo que sugiere claramente nuestra exposición cotidiana al parásito. También se ha reportado acantamebiasis a diferentes especies animales como perros, monos, toros, canguros, búfalos, aves, peces, reptiles, equinodermos, entre otros, por lo que podemos asegurar que son uno de los organismos más ubicuos del mundo (Visvesvara *et al.*, 2007).

#### **6.4.2 Cambio fenotípico**

El cambio fenotípico es la facultad de *Acanthamoeba* spp., para diferenciarse de una forma vegetativa de trofozoíto a una forma de quiste con una capacidad metabólica mínima, así como de resistir a diversos agentes antimicrobianos, condiciones adversas o el propio sistema inmune del hospedero. lo que las hace más difícil de erradicar (Aksozek *et al.*, 2002). También se ha reportado que pueden permanecer por más de 24 años a 4 °C conservando su capacidad invasiva (Mazur *et al.*, 1995). Este es un cambio reversible y depende de las condiciones ambientales como altas temperaturas o la desecación. Todo esto nos sugiere que la forma quística supone una gran capacidad de soportar condiciones adversas del ambiente, la propagación por él, así como la prevalencia de las infecciones (Turner *et al.*, 2000).

#### **6.4.3 Tolerancia fisiológica**

*Acanthamoeba* spp., al entrar en contacto con las células del cuerpo se exponen a una alta osmolaridad (por ejemplo, la salinidad de las lágrimas), así como las altas temperaturas del cuerpo, donde deben soportar, adaptarse y crecer sin problemas, habiéndose demostrado que estos factores son distintivos de los genotipos patógenos de *Acanthamoeba* (De Jonckheere, 1983). También se ha reportado que la *Acanthamoeba* patógena puede crecer tanto a pH ácido como básico, lo que



sugiere su capacidad para colonizar diversos nichos, desde ambientes hostiles a varios sitios en el cuerpo humano (Khan, 2006).

#### **6.4.4 Factores del hospedero**

Se sabe que existen factores propios del hospedero que influyen ampliamente en la susceptibilidad de la patogénesis de las infecciones por *Acanthamoeba* spp., aunque aún no está claro hasta qué punto estos factores contribuyen al resultado de las infecciones. Esto se debe a que los factores del hospedero son más complejos y difíciles de estudiar que los del propio parásito. Aunque podemos mencionar múltiples factores del hospedero que pueden contribuir a las infecciones por *Acanthamoeba* spp., tales como la desnutrición, el estrés mental, la edad, los factores metabólicos e inmunológicos, así como la presencia de otras infecciones o enfermedades. Por ejemplo, se sabe que el 85% de la QA por *Acanthamoeba* spp., ocurre en personas que usan lentes de contacto. En comparación con la EAG donde se ha reportado sólo en personas inmunosuprimidas (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

#### **6.4.6 Biofilms**

En el medio ambiente *Legionella pneumophila* forma y coloniza biopelículas, donde generalmente forma comunidades complejas de múltiples especies. En estas biopelículas, se ha observado que persiste y se replica intracelularmente en *Acanthamoeba castellanii* facilitando su diseminación y colonización, llegando a suceder lo mismo con otros microorganismos, muchos de ellos patógenos (Hochstrasser y Hilbi, 2019). Sin embargo, las especies de *Acanthamoeba* spp., utilizan los biofilms para su propio beneficio, ya que les brindan alimento y les proporcionan protección frente a las agresiones ambientales, además que la interacción con otros patógenos como *Legionella pneumophila* genera una presión evolutiva que conduce a un aumento de los factores de virulencia y favoreciendo así una mayor patogenicidad (Mungroo *et al.*, 2021).

### **7. Discusión**

Estas amebas representan una amenaza para la salud pública, debido a su capacidad de dispersión, resistencia y desarrollo en el hospedero y el ambiente, la dificultad en su diagnóstico, la eficacia limitada de los tratamientos, la resistencia a

los fármacos antimicrobianos y la abundancia de enfermedades que predispone a personas inmunocomprometidas, hace que su incidencia aumente año con año., y en muchos casos es esencial un diagnóstico temprano para el éxito del tratamiento (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta lo anterior existe una necesidad urgente de mejorar la comprensión de su biología básica, la patogénesis y los procesos de diferenciación celular de *Acanthamoeba* spp., ya que son la clave en los ensayos de diagnóstico y tratamiento, junto con su concientización son el camino hacia mejores resultados.

Los estudios resumidos aquí destacan en pequeña medida el progreso reciente en la comprensión de la biología de *Acanthamoeba* spp., y la interacción con su hospedero que nos lleva a identificar los mecanismos de patogenicidad en el proceso de invasión de los diferentes epitelios: olfativos, respiratorios, alveolares, la barrera hematoencefálica, entre otros. Donde el proceso de invasión se supone asemejarse a lo observado en la córnea, ya que es el epitelio con mayor cantidad de ensayos, dado que la QA representa la patología con mayor número de casos y una creciente incidencia.

Para la QA se conocen como factores de riesgo el traumatismo corneal, la exposición a agua contaminada y principalmente el uso generalizado de los lentes de contacto donde a partir de su surgimiento en la década de los 80s comenzó una epidemia relacionada con su uso, y en 1987 se demostró una mayor frecuencia de la infección (Schamberg, 1998), Posteriormente a mediados de los años 90s con la adopción de los lentes de contacto “desechables” no se disminuyó el riesgo de la QA como se pensaba, y persisten las preocupaciones con respecto a la eficacia de los tratamientos y el aumento de los casos.

Para invadir y colonizar al hospedero *Acanthamoeba* spp., ha desplegado diversas tácticas, como la invasión exitosa de las células y moléculas epiteliales del hospedero, lo que conlleva la pérdida de la arquitectura de los epitelios y abrirse camino hacia otros tejidos y órganos, todo ello mediante el uso de varias moléculas, algunas presentes en la superficie del parásito y otras secretadas por éstos.

Algunas proteínas de *Acanthamoeba* spp., exhiben similitudes estructurales con las proteínas del hospedero, por lo que las imitan, compiten y las desplazan durante la

invasión, además que desencadenan cascadas de señalización para la regulación positiva y negativa de las proteínas efectoras del hospedero contra los factores de virulencia del parásito (Kot *et al.*, 2018).

*Acanthamoeba* spp., requiere como primer paso en la invasión, la expresión de las adhesinas, la producción enzimática, la capacidad de resistir los diversos factores inmunes y ambientales, así como la acción de los posibles fármacos., sin embargo, aún no es del todo claro cómo ocurren dichos mecanismos, y sigue siendo complejo y controversial por parte de muchos autores.

Tal es el caso del papel enzimático en el proceso de infección, donde se llegó a pensar que tenía una supuesta capacidad citolítica de las células hospederas. Sin embargo, años más tarde se comprobó que por una acción mecánica directa de las amebas resulta en un proceso más potente y rápido de CPE de las células hospederas, aunque eventualmente hay una secreción enzimática no es suficiente para provocar el CPE por completo (Omaña-Molina *et al.*, 2013).

Se ha logrado comparar el daño del medio condicionado de los trofozoítos y la acción directa de los diferentes genotipos de las amebas patógenas, en interacción con diversos medio de cultivo (células de la córnea, células del neuroblastoma, células microgliales, células MDCK, queratinocitos, entre otras), mostrando en todos ellos un CPE considerablemente más evidente y rápido con un contacto físico directo, posiblemente debido la secreción de proteasas dependientes de contacto (Panjwani, 2010) y la producción de estructuras fagocíticas que representan un método importante de daño celular (González *et al.*, 2009). En comparación con el medio condicionado que ocasionó solo daño a las células más superficiales, promoviendo su separación, degradando principalmente la ocludina y la zonula-occludens-1 de las uniones estrechas, por lo que el medio condicionado no es determinante para destruir, penetrar y llevar al CPE a las células hospederas por completo como era sugerido anteriormente (Omaña-Molina *et al.*, 2010)

Además, los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., se colocan cerca de los bordes celulares y migran principalmente a través de las uniones estrechas o bien a través de las propias células cuando estas entran al CPE, y con la emisión de los acantopodios se van introduciendo en dicho espacio intracelular (Betanzos *et al.*,

2019). Adoptando una forma alargada para pasar por los espacios reducidos de las uniones estrechas, desestabilizando la arquitectura del epitelio y su función de barrera, disminuyendo los valores de la RTE y aumentando la permeabilidad celular., lo que favorece a su vez en la migración a las células más profundas (Omaña *et al.*, 2013).

Llama la atención que durante la migración y penetración entre las uniones celulares no se observa citólisis de las células MDCK, ni en células corneales de hamster, solo se aprecia la desestabilización y daño del tejido en zonas cercanas a la ameba y se evidenció daño celular hasta que se detectó primero un proceso fagocítico (Omaña *et al.*, 2013). Por ello y todo lo anterior mencionado nos sugiere la importancia de los mecanismos dependientes de contacto, son más relevantes en el proceso de patogenicidad para las amebas del género *Acanthamoeba* independientemente del tipo de epitelio.

Los avances científicos y tecnológicos de los últimos años han favorecido el conocimiento de la enfermedad y su mejor diagnóstico, pero sigue siendo necesario más estudios sobre el mecanismo inmunogénico y bioquímico involucrados en la eliminación del parásito para dilucidar completamente la patogenia, la cual es clave en el desarrollo de estrategias de diagnóstico y el desarrollo de enfoques terapéuticos más apropiados.

## **8. Conclusiones**

La comprensión de las características biológicas y de patogenicidad de *Acanthamoeba* spp., pueden ayudar al diagnóstico clínico, el tratamiento eficaz, el control de la infección, así como proporcionar una base teórica para el desarrollo de nuevos medicamentos contra *Acanthamoeba* spp.

Nuestros antecedentes muestran los eventos clave que conducen al daño epitelial e incluyen, la adherencia a las células diana, la secreción de enzimas, la fagocitosis, la interacción con las uniones estrechas, la penetración y migración a través de las células transcelular o paracelularmente y la evasión de la respuesta inmune, como parte de los mecanismos de patogenicidad dependientes e independientes de contacto, que actúan sinérgicamente en las infecciones provocadas por las amebas

del género *Acanthamoeba* provocando lisis y la muerte celular de las células hospederas de diferentes órganos blanco como SNC, córnea, piel, entre otros.

Está claro que los factores independientes de contacto contribuyen al CPE de las células hospederas, la degradación de algunas proteínas estructurales y la activación de algunos factores de transcripción de regulación en el hospedero. Sin embargo, las interacciones dependientes de contacto conducen a la secreción de diversos factores de virulencia que juegan un papel de mayor relevancia durante la infección por *Acanthamoeba* spp.

El mecanismo por el cual las amebas del género *Acanthamoeba* invaden al hospedero es complejo e involucra características propias de cada especie (adhesinas, proteasas, fosfolipasas), así como características determinantes del hospedero (IL- $\alpha$  y  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , apoptosis). Considerando que el potencial de virulencia de la ameba depende de su capacidad de sobrevivir y adaptarse a las diversas condiciones ambientales, su resistencia a los fármacos y la capacidad de soportar la acción de las diversas moléculas y células del sistema inmune.

## **9. Perspectivas**

Los avances recientes nos sitúan a las puertas de comprender este complejo mecanismo de patogenicidad en detalle a nivel molecular, así como la biología básica, la epidemiología y la respuesta inmune humana. Con la integración de las herramientas de biología celular, bioquímica, biofísica y genómica, los enfoques experimentales en los próximos años nos deberían brindar conocimientos sin precedentes sobre las interacciones de *Acanthamoeba* spp., con su hospedero, con el fin de planear el desarrollo de posibles estrategias para prevenir y tratar las infecciones que se puedan generar, lo que conducirá al diseño de nuevas formas de diagnóstico y tratamientos contra estos parásitos.

## **10. Referencias**

Aksozek K, McClellan K, Howard, Alizadeh H, Niederkorn JY. Resistencia de los quistes de *Acanthamoeba castellanii* a condiciones físicas, químicas y radiológicas, J. Parasitol. 88, 2002, 621-623.

Alizadeh H, Neelam S, Niederkorn JY. Effect of immunization with the mannose-induced *Acanthamoeba* protein and *Acanthamoeba* plasminogen activator in mitigating *Acanthamoeba* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 597-604.

Alizadeh H, Pidherney MS, McCulley JP, Niederkorn JY. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. Infect Immun. 1994, 129-303.

Alizadeh H, Y. He, JP McCulley, D. Ma, GL Stewart, M. Vía, E. Haehling, Niederkorn JY. Inmunización exitosa contra la queratitis por *Acanthamoeba* en un modelo porcino, *Córnea* 14, 1995, 180-186.

Anwar A, Khan NA, Siddiqui R. Combating *Acanthamoeba spp.* cysts: ¿what are the options? Parasit Vectors. 2018, 9;11(1):26.

Aqeel Y, Siddiqui R, Manan Z, Khan NA. The role of G protein coupled receptor-mediated signaling in the biological properties of *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype. Microb Pathog. 2015; 81:22-7.

Betanzos A, Bañuelos C, Orozco E. Host Invasion by Pathogenic Amoebae: Epithelial Disruption by Parasite Proteins. Genes (Basel). 2019, 14;10(8):618.

Brindley N, Matin A, Khan NA. *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. Exp Parasitol. 2009; 121(3):254-6.

Bouheraoua N, Labbé A, Chaumeil C, Liang Q, Laroche L, Borderie V. Kératites amibiennes [*Acanthamoeba* keratitis]. J Fr Ophtalmol. 2014, 37(8):640-52.

Castelan-Ramírez I, Salazar-Villatoro L, Chávez-Munguía B, Salinas-Lara C, Sánchez-Garibay C, Flores-Maldonado C, Hernández-Martínez D, Anaya-Martínez V, Ávila-Costa MR, Méndez-Cruz AR, Omaña-Molina M. Schwann cell autophagy and necrosis as mechanisms of cell death by *Acanthamoeba*. Pathogens 2020; 9(6): E458 226.

Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N. Papel de la adherencia mediada por carbohidratos en los mecanismos citopatógenos de *Acanthamoeba*. J Biol Chem 1998; 273:15838-45

Chappell CL, Wright JA, Coletta M Newsome AL. Método estandarizado de medición de anticuerpos contra *Acanthamoeba* en sueros de sujetos humanos sanos. Clin Diag Lab Immunol 2001;8:724–30.

Chaúque BJM, Dos Santos DL, Anvari D, Rott MB. Prevalence of free-living amoebae in swimming pools and recreational waters, a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res. 2022, 30:1–18.

Cho JH, Na BK, Kim TS, Song CY. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. IUBMB Life. 2000; 50(3):209-14.

Chusattayanond AD, Boonsilp S, Kasisit J, Boonmee A, Warit S. Thai *Acanthamoeba* isolate (T4) induced apoptotic death in neuroblastoma cells via the Bax-mediated pathway. Parasitol Int. 2010; 59(4):512-6.

Clarke DW, Alizadeh H, Niederkorn JY. Fracaso de *Acanthamoeba castellanii* para producir infecciones intraoculares, Invest. Oftalmol. Vis. Ciencia 46. 2005, 2472-2478.

Clarke DW, Niederkorn JY. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. Microbes Infect. 2006; 8(5):1400-5.

Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. Trends Parasitol. 2006, 22(4):175-80.

Collier SA, Gronostaj MP, MacGurn AK, Cope JR, Awsumb KL, Yoder JS, Beach MJ. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Estimated burden of keratitis--United States, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2014; 63(45):1027-30.

Coronado-Velázquez D, Betanzos A, Serrano-Luna J, Shibayama M. An In Vitro Model of the Blood-Brain Barrier: *Naegleria fowleri* Affects the Tight Junction

Proteins and Activates the Microvascular Endothelial Cells. *J Eukaryot Microbiol.* 2018, 65(6):804-819.

Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK, Minner JR. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol.* 1959;35(1):185-97.

Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun.* 1980; 29(2):401-7.

De Jonckheere JF. Características de crecimiento, efecto citopático en cultivo celular y virulencia en ratones de 36 cepas tipo pertenecientes a 19 *Acanthamoeba* spp. diferentes. *Appl Environ Microbiol* 1983;39: 681–5.

De Jonckheere JF. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis.* 1991;13 5:S385-7.

Elsheikha HM, Khan NA. Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; (4):532-53.

Escoll P, Rolando M, Gomez-Valero L, Buchrieser C. From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;376:1-34.

Ferrante A, Abell TJ. El medio acondicionado de leucocitos mononucleares estimulados aumenta la muerte mediada por neutrófilos humanos de una *Acanthamoeba* spp. virulenta. *Infectar. inmune* 51., 1986, 607-617.

Ferrante A. Immunity to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis.*1991, 13 Suppl 5: S403-9.

Feng X, Zheng W, Wang Y, Zhao D, Jiang X, Lv S. A Rabbit Model of *Acanthamoeba* Keratitis That Better Reflects the Natural Human Infection. *Anat Rec (Hoboken).* 2015; 298(8):1509-17.

Flores-Maldonado C, González-Robles A, Salazar-Villatoro L, Omaña-Molina M, Gallardo JM, González-Lázaro M, Hernández-Ramírez VI, Talamás-Rohana P, Lorenzo-Morales J, Martínez-Palomo A. *Acanthamoeba* (T4) trophozoites cross the MDCK epithelium without cell damage but increase paracellular permeability



and transepithelial resistance by modifying tight junction composition. *Exp Parasitol.* 2017, 183:69-75.

Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br. med J.* 1965, 25;2(5464):740-2.

Fuerst PA, Booton GC. Species, Sequence Types and Alleles: Dissecting Genetic Variation in *Acanthamoeba*. *Pathogens.* 2020 2;9(7):534.

Gárate M, Marchant J, Cubillos I, Cao Z, Khan NA, Panjwani N. La patogenicidad *in vitro* de *Acanthamoeba* está asociada con la expresión de la proteína de unión a manosa. *Invertir. Oftalmol. Vis. ciencia* 2006, 47, 1056–1062

González-Robles A, Castañón G, Cristóbal-Ramos AR, Lázaro-Haller A, Omaña-Molina M, Bonilla P, Martínez-Palomo A. *Acanthamoeba castellanii*: structural basis of the cytopathic mechanisms. *Exp Parasitol.* 2006; 114(3):133-40.

González-Robles A, Castañón G, Hernández-Ramírez VI, Salazar-Villatoro L, González-Lázaro M, Omaña-Molina M, Talamás-Rohana P, Martínez-Palomo A. *Acanthamoeba castellanii*: identification and distribution of actin cytoskeleton. *Exp Parasitol.* 2008; 119(3):411-7.

Gordon VR, Asem EK, Vodkin MH, McLaughlin GL. *Acanthamoeba* se une a la matriz extracelular proteínas *in vitro*. *Invertir. Oftalmol. Vis. ciencia* 1993, 34, 658–662

Gupta R, Gorski M, Henderson T, Lazzaro D, Haseeb MA. Curso clínico de queratitis unilateral por *Acanthamoeba* en un usuario de lentes de contacto cosméticos. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 2015, 45:366-370.

Hassan F, Bhatti A, Desai R, Barua A. Analysis from a year of increased cases of *Acanthamoeba* Keratitis in a large teaching hospital in the UK. *Cont Lens Anterior Eye.* 2019, 42(5):506-511.

He YG, McCulley JP, Alizadeh H, Pidherney M, Mellon J, Ubelaker JE, Stewart GL, Silvano RE, Niederkorn JY. A pig model of *Acanthamoeba* keratitis:

transmission via contaminated contact lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992 ; 33(1):126-33.

Hernández-Jasso M, Hernández-Martínez D, Avila-Acevedo JG, Benítez-Flores J, Gallegos-Hernández IA, García-Bores AM, Espinosa-González AM, Villamar-Duque TE, Castelan-Ramírez I, González-Valle M, Omaña-Molina M. Descripción morfológica de los primeros eventos durante la invasión de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* en un modelo murino de piel irradiada bajo luz UV-B. *Patógenos (Basilea, Suiza)*. 2020. 9 (10), 794.

Hochstrasser R, Hilbi H. Migration of *Acanthamoeba castellanii* Through Legionella Biofilms. *Methods Mol Biol*. 2019;1921:79-89.

Hunt SJ, Reed SL, Mathews WC, Torian B. Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multidrug therapy. *Cutis*. 1995; 56(5):285-7.

Hurt, Proy V, Niederkorn JY, Alizadeh H. La interacción de los quistes de *Acanthamoeba castellanii* con macrófagos y neutrófilos, *J. Parasitol*. 2003, 89.

Khan NA. Patogenicidad, morfología y diferenciación de *Acanthamoeba* *Curr Microbiol* 2001;43:391–5.

Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30(4):564-95.

Khan NA, Siddiqui R. *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *Int J Parasitol*. 2009.,39(14):1611-6.

Kennett MJ, Hook RR Jr, Franklin CL, Riley LK. *Acanthamoeba castellanii*: characterization of an adhesin molecule. *Exp Parasitol*. 1999, 92(3):161-9.

Kernohan JW, Margath TB, Schloss GT. Granuloma of brain probably due to *Endolimax williamsi (Iodamoeba butschlii)*. *Arch Pathol*. 1960 ;70:576-80.

Kinnear FB. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella*: quantitative & qualitative in vitro studies on keratocytes. J Infect. 2003; 46(4):228-37.

Król-Turmińska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae. Ann Agric Environ Med. 2017, 11;24(2):254-260.

Kot K, Łanocha-Arendarczyk N, Kosik-Bogacka DI. Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. Ann Parasitol. 2018 ;64(4):299-308.

Kot K, Łanocha-Arendarczyk N, Kosik-Bogacka DI. Immune Pathogenicity of *Acanthamoeba* spp. in the Brain and Lungs. Int J Mol Sci. 2021, 27;22(3):1261.

Lacerda AG, Lira M. *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. Ophthalmic Physiol Opt. 2021,41(1):116-135.

Larkin, Easty DL. Queratitis experimental por *Acanthamoeba*: II. Evaluación inmunohistoquímica, Br. J. Oftalmol. 75, 1991, 421-424.

Leher HF, Alizadeh H, Taylor WM, Shea AS, Silvany RS, Van Klink F, Jager MJ, Niederkorn JY. Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998; 39(13):2666-73.

Leher HF, Zaragoza F, Taherzadeh S, Alizadeh H, Niederkorn JY. Monoclonal IgA antibodies protect against *Acanthamoeba* keratitis. Exp Eye Res. 1999, 69(1):75-84.

Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite. 2015, 22:10.

Maciver SK, Asif M, Simmen MW, Lorenzo-Morales J. Un análisis sistemático de la frecuencia del genotipo de *Acanthamoeba* correlacionada con la fuente y la patogenicidad: T4 se confirma como un genotipo rico en patógenos. *Revista Europea de Protistología* . 2013; 49 (2):217–221.

Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. como agentes de enfermedades en humanos. Revisiones De microbiología clínica 16, 2003, 273-307.

Marciano-Cabral F, Toney DM. The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. J Eukaryot Microbiol. 1998; 45(4):452-8.

Marcilla A, Martin-Jaular L, Trelis M, de Menezes Neto A, Osuna A, Bernal D, Fernandez Becerra C, Almeida IC, del Portillo HA. Vesículas extracelulares en enfermedades parasitarias. *J.Extracel. Ves.* 2014; 3 :2504.

Martinez AJ. Free-living amebas: infection of the central nervous system. Mt Sinai J Med. 1993 Sep;60(4):271-8.

Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol. 1997;7(1):583-98.

Massilamany C, Steffen D, Reddy J. An epitope from *A. castellanii* that cross-react with proteolipid protein 139-151-reactive T cells induces autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. J Neuroimmunol. 2010, 26;219(1-2):17-24.

Mathers G, Stevens Jr, Rodrigues M, Chan CC, Gold J, Visvesvara GS, Lemp MA, Zimmerman LE. Inmunopatología y microscopía electrónica de la queratitis por *Acanthamoeba*, Am. J. Oftalmol. 1987, 626-635.

Mazur T, Hadas E, Iwanicka I. La duración de la etapa de quiste y la viabilidad y virulencia de los aislamientos de *Acanthamoeba*. Trop Med Parasitol 1995, 46:106–8

McClellan, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Efecto de los esteroides en los quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba*, Invest. Oftalmol. Vis. Ciencia 42, 2001, 2885-2893.

McClellan, Howard K, Mayhew E, Niederkorn JY, Alizadeh H. Respuestas inmunitarias adaptativas a los quistes de *Acanthamoeba*, Exp. ojo Res. 75, 2002, 285-293.

Michalek M, Sönnichsen FD, Wechselberger R, Dingley AJ, Hung CW, Kopp A, Wienk H, Simanski M, Herbst R, Lorenzen I, Marciano-Cabral F, Gelhaus C, Gutschmann T, Tholey A, Grötzinger J, Leippe M. Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic *Acanthamoeba*. *Nat Chem Biol*. 2013; 9(1):37-42.

Mungroo MR, Siddiqui R, Khan NA. War of the microbial world: *Acanthamoeba* spp. interactions with microorganisms. *Folia Microbiol (Praha)*. 2021; 66(5):689-699.

Newsome AL, Curtis FT, Culbertson CG, Allen SD. Identification of *Acanthamoeba* in bronchoalveolar lavage specimens. *Diagn Cytopathol*. 1992;8(3):231-4.

Nieder Korn JY, Ubelaker JE, McCulley JP, Stewart GL, Meyer DR, Mellon JA, Silvano RE, He YG, Pidherney M, Martin JH. Susceptibilidad de las córneas de varias especies animales a la unión in vitro e invasión por *Acanthamoeba castellanii*, *Invest. Mol oftálmica. Vis. Ciencia* 33, 1992, 104-112.

Nieder Korn JY. El papel de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en la queratitis por *Acanthamoeba*, *Arch. inmunol. El r. Exp.* 50, 2002, 53-59.

Nieder Korn JY. The biology of *Acanthamoeba* keratitis. *Exp Eye Res*. 2021; 202:108365.

Ng SL, Nordin A, Abd Ghafar N. *Acanthamoeba*-mediated cytopathic effect correlates with MBP and AhLBP mRNA expression. *Parasites Vectors* 10, 2017, 625.

Omaña-Molina M, González-Robles A, Salazar-Villatoro LI, Lorenzo-Morales J, Cristóbal-Ramos AR, Hernández-Ramírez VI, Talamás-Rohana P, Méndez Cruz AR, Martínez-Palomo A. Reevaluación del papel de las proteasas de *Acanthamoeba* en la invasión de tejidos: observación de mecanismos citopatógenos en monocapas de células MDCK y células corneales de hámster. *Investigación internacional de BioMed* , 2013 , 461-329.

Omaña-Molina M, González-Robles A, Salazar-Villatoro LI, Cristóbal-Ramos AR, González-Lázaro M, Salinas-Moreno E, Méndez-Cruz R, Sánchez-Cornejo M, De la Torre-González E, Martínez-Palomo A. *Acanthamoeba castellanii*: morphological analysis of the interaction with human cornea. *Exp Parasitol*. 2010;126(1):73-8.

Omaña-Molina M, Navarro-García F, González-Robles A, Serrano-Luna JJ, Campos-Rodríguez R, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Shibayama M. Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after *in vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun*. 2004; 72(6):3245-51.

Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf*. 2010;8(2):70-9.

Pérez-Irezábal J, Martínez I, Isasa P, Barrón J. Keratitis due to *Acanthamoeba*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006 ;24 Suppl 1:46-52.

Pinto LF, Andriolo BNG, Hofling-Lima AL, Freitas D. The role of *Acanthamoeba* spp. in biofilm communities: a systematic review. *Parasitol Res*. 2021; 120(8):2717-2729.

Pritzker AS, Kim BK, Agrawal D, Southern PM Jr, Pandya AG. Fatal granulomatous amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* presenting as a skin lesion. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 50(2 Suppl):S38-41.

Pumidonming W, Walochnik J, Dauber E, Petry F. Binding to complement factors and activation of the alternative pathway by *Acanthamoeba*. *Immunobiology*. 2011, 216(1-2):225-33.

Pussard, M. y Pons, R. Morfología de la parálisis quística y taxonomía del género *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 1977, 557–598.

Ren MY, Gao L, Wu XY. TLR4: the receptor bridging *Acanthamoeba* challenge and intracellular inflammatory responses in human corneal cell lines. *Immunol Cell Biol*. 2010, 88(5):529-36.

Ren MY, Wu XY. Toll-like receptor 4 signaling pathway activation in a rat model of *Acanthamoeba* Keratitis. *Parasite Immunol.* 2011, 33(1):25-33.

Retana-Moreira L, Vargas-Ramírez D, Linares F, Prescilla-Ledezma A, Vaglio-Garro A, Osuna A, Lorenzo-Morales J, Abrahams-Sandí E. Aislamiento de *Acanthamoeba* T5 del agua: caracterización de su potencial patógeno, incluida la producción de vesículas extracelulares. *Patógenos (Basilea, Suiza)*, 2020, 9 (2), 144.

Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol.* 1994;20(3):225-41.

Roshni Prithviraj S, Rajapandian GK, Gnanam H, Gunasekaran R, Mariappan P, Sankalp Singh S, Prajna L. Clinical presentations, genotypic diversity and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* species causing keratitis. *J Med Microbiol.* 2020, 69(1):87-95.

Said, Shoeir A, Panjwani N, Garate M, Cao Z. Respuesta inmune humoral local y sistémica durante la queratitis aguda y crónica por *Acanthamoeba* en conejos, *Curr. ojo Res.* 29, 2004.

Schaumberg DA, Snow KK, Dana MR. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand? *Cornea.* 1998 ;17(1):3-10.

Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol.* 2004 9;126(1-2):91-120.

Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 2004; 34(9):1001-27.

Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat.* 2004; 7(1):41-51.

Sengor T, Kurna SA, Altun A, Irkec M, Aki SF, Aksoy S. Queratitis por *Acanthamoeba* relacionada con lentes de contacto y dacrioadenitis acompañante de lente de contacto, 2015, 204-209.

Shin HJ, Cho MS, Jung SY, Kim H, Park S, Seo JH, Yoo JC, Im KI. Cytopathic changes in rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba culbertsoni*: morphology and cytokine release. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8(4):837-40.

Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasit Vectors. 2012; 10;5:6.

Sissons J, Kim KS, Stins M, Jayasekera S, Alsam S, Khan NA. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. Infect Immun. 2005; 73(5):2704-8.

Soto-Arredondo KJ, Flores-Villavicencio LL, Serrano-Luna JJ, Shibayama M, Sabanero-López M. Mecanismos bioquímicos y celulares que regulan la adherencia de *Acanthamoeba castellanii* a las células huésped. Parasitología 2014, 141,531–541.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. Curr Protoc Immunol. 2015 1; 109:14.12.1-14.12.10.

Talamás-Lara D, Lagunes-Guillén A, Chávez-Munguía B, Salazar-Villatoro L, Acosta-Virgen K, Omaña-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. *Acanthamoeba castellanii*: Effect of neuroactive substances on trophozoite migration. Exp Parasitol. 2022, 236-237.

Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. FEMS Microbiol Rev. 2010;34(3):231-59.

Tripathi T, Abdi M, Alizadeh H. Role of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitors in attenuating apoptosis of the corneal epithelial cells and mitigation of *Acanthamoeba* keratitis. Exp Eye Res. 2013; 113:182-91.

Toney, Marciano-Cabral F. Resistencia de las especies de *Acanthamoeba* a la lisis del complemento, J. Parasitol. 84, 1998, 338-344.

Turner NA, Russell AD, Furr JR, Lloyd D. Emergencia de resistencia a biocidas durante la diferenciación de *Acanthamoeba castellanii*. J Antimicrob Chemother



2000, 46:27–34

Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;50(1):1-26.

Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. Handb Clin Neurol. 2013;114:153-68.

Walia R, Montoya JG, Visvesvera GS, Booton GC, Doyle RL. Un caso de tratamiento exitoso de infección cutánea por *Acanthamoeba* en un receptor de trasplante de pulmón. *Transpl. Infectar. Dis.* 2007; 9 :51–54.

Walochnik J, Sommer K, Obwaller A, Haller-Schober EM, Aspöck H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. Parasitol Res. 2004; 92(4):289-98.

Wang Y, Jiang L, Zhao Y, Ju X, Wang L, Jin L, Fine RD, Li M. Biological characteristics and pathogenicity of *Acanthamoeba*. Front Microbiol. 2023; 14:1147077.

Yang Z, Cao Z, Panjwani N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. Infect Immun. 1997 ;65(2):439-45.

Zhang H, Cheng X. Various brain-eating amoebae: the protozoa, the pathogenesis, and the disease. Front Med. 2021, 15(6):842-866.

Zheng X, Uno T, Goto T, Zhang W, Hill JM, Ohashi Y. Pathogenic *Acanthamoeba* induces apoptosis of human corneal epithelial cells. Jpn Ophthalmol. 2004; 48(1):23-9.

---