



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Estudio morfológico de los mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba castellanii* en la córnea humana.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
EDMUNDO SALINAS MORENO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARITZA OMAÑA MOLINA



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente estudio se realizó en:

El Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE).

El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

El Banco de ojos del Hospital Juárez de México.

El trabajo se llevó a cabo bajo el auspicio de los siguientes programas:

Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA 2007-2008 PROYECTO NUM. 66).

Apoyo a Investigadores nacionales para el Fortalecimiento de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciatura (CONACyT 102188/2008).

CONTENIDO

RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
1.1. Antecedentes.	2
1.2. Importancia clínica y patogenia de las amibas del género <i>Acanthamoeba</i> .	4
2. GENERALIDADES DE <i>Acanthamoeba</i> spp.	5
2.1. Taxonomía.	5
2.2. Ecología.	7
2.3. Ciclo de vida.	8
2.3.1. Trofozoíto.	8
2.3.2. Quiste.	9
3. QUERATITIS AMIBIANA.	9
3.1. Epidemiología de la queratitis amibiana.	10
3.2. Factores de riesgo de la queratitis amibiana.	10
3.3. Cuadro clínico de la queratitis amibiana.	11
3.4. Diagnóstico clínico de la queratitis amibiana.	12
3.5. Diagnóstico de laboratorio de la queratitis amibiana.	13
3.6. Histopatología de la queratitis amibiana.	14
3.7. Tratamiento de la queratitis amibiana.	15
3.8. Prevención de la queratitis amibiana.	17
3.9. Virulencia de <i>Acanthamoeba</i> en la queratitis amibiana.	17
3.9.1. Adherencia.	17
3.9.2. Migración.	19
3.9.3. Invasión de tejidos.	19
3.10. Modelos experimentales de queratitis amibiana.	20
4. JUSTIFICACIÓN.	23

5. OBJETIVOS.	24
5.1 Objetivo general.	24
5.2 Objetivos particulares.	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS.	25
6.1 Obtención de la cepa amibiana.	25
6.2 Evaluación de la virulencia de las amibas en estudio.	26
6.3 Corneas humanas.	26
6.3.1 Medio óptimo para llevar a cabo las interacciones de <i>Acanthamoeba castellanii</i> en la córnea humana.	27
6.3.2 Estandarización de las condiciones óptimas para la interacción de <i>Acanthamoeba castellanii</i> en la córnea humana.	27
6.3.3 Interacción de <i>Acanthamoeba castellanii</i> con la córnea humana	27
6.3.3.1 Microscopía electrónica de barrido.	28
6.3.3.2 Microscopía electrónica de transmisión.	28
6.3.4 Interacción del medio condicionado en córnea humana.	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Evaluación de la virulencia de las amibas en estudio.	29
7.2 Medio óptimo para llevar a cabo las interacciones de <i>Acanthamoeba castellanii</i> en la córnea humana.	30
7.3 Condiciones óptimas para la interacción de <i>Acanthamoeba castellanii</i> en la córnea humana.	31
7.4 Interacción de <i>Acanthamoeba castellanii</i> con la córnea humana.	33
7.4.1 Análisis morfológico a través de microscopía electrónica de barrido.	33
7.4.2 Análisis morfológico a través de microscopía de luz.	36
7.5 Interacción del medio condicionado de <i>Acanthamoeba castellanii</i> con la córnea humana.	38
8. DISCUSIÓN.	39

9. CONCLUSIONES.	43
10. PERSPECTIVAS.	44
11. ANEXO	45
12. BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Las amibas del género *Acanthamoeba* son protozoos oportunistas que en ocasiones provocan una infección corneal de difícil diagnóstico y tratamiento; llamada queratitis amibiana. En el presente estudio se trabajó con una de las especies de *Acanthamoeba* más frecuentemente aislada de casos de queratitis; *Acanthamoeba castellanii*, con el propósito de describir los mecanismos de patogenicidad que estas amibas provocan en la córnea humana. Las córneas de origen humano fueron donadas por el Hospital Juárez de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México. Se trabajó con muestras sin lesiones superficiales libres de infección viral y bacteriana. Se conformaron tres grupos de segmentos corneales: Grupo a) Fragmentos de córneas interaccionadas amibas en fase trófica, Grupo b) Fragmentos de córneas interaccionadas con los productos amibianos (medio condicionado) y Grupo c) Grupo control interaccionado con medio bactocasitona (el cual resultó ser óptimo para el desarrollo amibiano y preservación de la córnea humana), a una temperatura de 37 °C. Las interacciones se llevaron a cabo en tiempos tempranos de 1, 2 y 3 h, posteriormente se procesaron acorde a las técnicas convencionales para microscopía electrónica de barrido y transmisión. El análisis morfológico de la interacción demostró que desde tiempos tempranos de interacción, los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, son capaces de invadir y provocar daño al epitelio corneal intacto, el cual da inicio con la adherencia de los trofozoítos a la superficie corneal, seguida de la migración hacia las uniones celulares del epitelio corneal, la invasión continúa con la penetración a las capas más profundas del mismo, y finalmente la fagocitosis de las células recién desprendidas, provocando la pérdida de la arquitectura del tejido corneal. Las muestras corneales interaccionadas con los productos amibianos presentan un daño directo en la superficie corneal, el cual también es proporcional al tiempo de interacción.

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos de considerable importancia médica por las patologías que originan (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Si bien dichas patologías no representan un problema de salud pública, si son de importancia clínica ya que generalmente no son consideradas en los diagnósticos diferenciales primarios y los tratamientos para erradicarlas no han resultado ser efectivos en la mayoría de los casos (Martínez *et al.*, 1997).

1.1 Antecedentes

El interés por el estudio de las amibas de vida libre en las primeras décadas del siglo XX era muy limitado, y de no ser por las observaciones realizadas por curiosos protozoólogos hubieran pasado inadvertidas. Jahnes y Fullmer en 1957, las refieren como contaminantes de cultivos de tejido, con lo que comienzan a ser consideradas en el área microbiológica. Culbertson *et al.*, en 1959, al realizar pruebas rutinarias de seguridad de la vacuna de polio revelaron la presencia de organismos ameboideos en cultivos celulares de riñón y observaron que algunos de los cultivos presentaban efectos citopáticos, considerando inicialmente que el virus era el responsable de dicho efecto. Con el contenido de las mismas inocularon 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 amibas de vida libre, identificadas más tarde como *Acanthamoeba castellanii*. El hallazgo más significativo fue referido a la capacidad de estos protozoos de invadir la mucosa nasal de organismos sanos, de migrar hacia el cerebro y producir una patología en el sistema nervioso central (SNC) de consecuencias fatales (Rondanelli, 1987).

Fowler y Carter en 1965, reportaron en Australia los cuatro primeros casos de infección amibiana causada por amibas de vida libre en humanos, designada posteriormente como meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), identificando a una amiba del género *Naegleria* como la responsable del daño.

El primer caso de infección cerebral claramente diagnosticado como una patología causada por *Acanthamoeba*, fue reportado por Kenney en 1971.

Jager y Stamm en 1972, reportaron un granuloma cerebral en un paciente con linfoma de Hodgkin, en el que se demostró la presencia de *Acanthamoeba* a través del método de inmunofluorescencia indirecta.

Martínez en 1980, designó como encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) a la enfermedad provocada por amibas del género *Acanthamoeba* en el cerebro, la cual se presenta tanto en animales como en el ser humano.

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

Nanington en 1975, reportó en Gran Bretaña dos casos de queratitis causados por *Acanthamoeba*, en donde las amibas originaron una ulceración crónica y progresiva en la córnea en uno de los pacientes y fue necesaria una intervención quirúrgica del ojo infectado del segundo paciente, las amibas fueron identificadas como *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba castellanii* respectivamente.

Latapie *et al.*, en 2003, reportaron en América Latina un caso de QA en una paciente femenina de 36 años, la cual presentaba visión borrosa y severo dolor ocular en el ojo izquierdo, la paciente tenía como hábito el uso prolongado de lentes de contacto blandas con higiene inadecuada.

Pérez *et al.*, en 2005, reportaron en Madrid España, un caso de QA en un paciente de 15 años, usuario de lentes de contacto blandas, que acudió a la consulta de oftalmología por dolor, enrojecimiento y disminución de la agudeza visual en el ojo derecho.

Pineda *et al.*, en 2007, divulgaron en el departamento de oftalmología de Massachusetts un caso de escleroqueratitis por *Acanthamoeba* spp. en un paciente de 42 años de edad, el cual presentó en el ojo derecho cataratas y baja agudeza visual, logrando una mejoría visual por medio de queratoplastia.

Se han incrementado el número de pacientes afectados por esta patología a nivel mundial, guardando una relación estrecha con usuarios de lentes de contacto y de

manera especial con lentes de contacto blandas (Stehr-Green *et al.*, 1987; Thebpatiphat *et al.*, 2007).

En México no se tienen estadísticas confiables de esta patología, sin embargo se han registrado al menos cinco casos de QA en el Hospital “Asociación para evitar la ceguera en México Luís Sánchez Búlnes” en donde cuatro de ellos eran portadores de lentes de contacto y el último correspondió a un paciente con traumatismo corneal (Omaña, 1997; Omaña *et al.*, 2005).

1.2 Importancia clínica y patogenia de las amibas del género *Acanthamoeba*

A mediados del siglo pasado se descubrió que algunas amibas pequeñas del suelo y del agua, que hasta entonces se consideraban inocuas, podían invadir al hombre y a otros animales, llegando a causarles la muerte o daño cerebral irreversible. Debido a su habilidad para vivir como organismos de vida libre y como endoparásitos, a las amibas del género *Acanthamoeba* se les designó como amibas anfizóicas (Page, 1976). De esta manera se describe y diferencia a la fase exozoica que se refiere al periodo del ciclo de vida que corresponde al de vida libre, de la fase endozoica o parasítica que es cuando llega a invadir diversos tejidos como son: corneal, prostático, vaginal o el sistema nervioso central, entre otros (Visvesvara y Stehr-Green, 1990; Martínez, 1993).

Las amibas del género *Acanthamoeba* son capaces de producir lesiones cutáneas (Hunt *et al.*, 1995; Van Hamme *et al.*, 2001), infecciones en vías respiratorias (Abraham y Lawande, 1982), sinusitis (Allen *et al.*, 1992; Szenási *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000), vaginitis, prostatitis, o una simple diarrea (Curtis *et al.*, 1992; Martínez, 1993; Álvarez *et al.*, 1995). Estas amibas proliferan en la piel de personas que han sufrido lesiones o quemaduras y pueden vivir en casi cualquier microambiente (Rivera *et al.*, 1994).

Estas amibas pueden producir una enfermedad crónica progresiva llamada encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) (Martínez, 1980), generalmente se asocia con algún tipo de inmunosupresión y con padecimientos crónicos como diabetes y alcoholismo (Visvesvara *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 1995). Se piensa que el protozoo se disemina por vía sanguínea desde una lesión cutánea o pulmonar

hasta el SNC (Gullet *et al.*, 1979). La muerte se produce principalmente debido a complicaciones neurológicas, sin embargo, el estudio de la patología asociada a esta enfermedad sigue siendo incompleta (Khan *et al.*, 2009).

No menos importante es la QA, la cual aunque no llega a ser fatal tiene gran importancia clínica por el número de casos que se han presentado en todo el mundo y por los daños que llega a causar en los ojos de las personas afectadas (Acharya *et al.*, 2007).

Aunque el número de casos de infecciones causadas por estas amibas son bajos, la dificultad para poder diagnosticar y encontrar un tratamiento adecuado ha sido un tema de inquietud y de importancia para el área médica (Schuster y Visvesvara, 2004).

2. GENERALIDADES DE *Acanthamoeba* spp

2.1 Ubicación taxonómica del género *Acanthamoeba*

En un principio se consideraba a *Mayorella*, *Hartmannella* y *Acanthamoeba*, como sinónimos, sin embargo Sawyer y Griffin en 1975, propusieron formar la familia Acanthamoebidae, la cual comprendía a tres géneros: *Acanthamoeba*, *Protacanthamoeba* y *Comandonia*. En la actualidad este último se ha separado de la familia Acanthamoebidae ubicándolo dentro de la familia Echinamoebidae.

Pussard y Pons en 1977, reorganizaron a las amibas del género *Acanthamoeba* en tres grupos usando la morfología quística y la tolerancia a la temperatura y establecieron 18 especies diferentes basándose en las diferencias de talla y en las características morfológicas del quiste.

Con base en el análisis bioquímico, principalmente con el enzimático, se reubicó taxonómicamente a estas amibas cuya base fundamental era la morfológica quística (John, 1993).

Page en 1976 y Pussard y Pons en 1977, reconocieron finalmente 17 especies para el género *Acanthamoeba*.

Los tres grupos que conforman el género *Acanthamoeba* propuestos por Pussard y Pons en 1977 son:

Grupo I. Organismos con un diámetro promedio del quiste $>18\mu\text{m}$; el endoquiste y el ectoquiste están separados y solo se unen en puntos llamados poros u opérculos que están a nivel del ectoquiste, el número de poros y brazos es el mismo. El endoquiste presenta una forma estrellada rodeada por el ectoquiste, el cual es más o menos redondeado. No tienen representantes patógenos. Generalmente no crecen a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y es difícil que se desarrollen en medios axénicos. Son los más comunes en la naturaleza.

Grupo II. Formado por diez especies de *Acanthamoeba*. El diámetro promedio del quiste es $<18\mu\text{m}$. Este grupo incluye las especies más comunes y ampliamente distribuidas en la naturaleza. El endoquiste tiene una forma estrellada o poligonal, de tal manera que, tanto el quiste como el endoquiste se unen en las esquinas. El ectoquiste presenta una forma más o menos redondeada. En este grupo se encuentran las especies de importancia médica, responsables de la QA. Son los más comunes en agua y suelo.

Grupo III. El diámetro promedio del quiste es usualmente $<18\mu\text{m}$ presentan un exoquiste muy delgado, el endoquiste es redondeado y no presenta extensiones ni brazos, ya que las paredes están muy juntas entre sí. Toleran temperaturas mayores a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La utilización de técnicas de: microscopía de luz, análisis bioquímicos y fisiológicos han contribuido a mejorar el conocimiento de estos organismos lo que ha permitido reorganizar a las amibas que conforman el género.

El género *Acanthamoeba*, grupo con alrededor de 24 especies, ha sido reclasificado en 15 diferentes genotipos. La especie predominante en gran parte de los casos clínicos corresponde al genotipo T4, y se sugirió que fuera denominado complejo *A. castellanii* (Booton *et al.*, 2005.)

Niyyati *et al.*, en 2009, mencionan que diferentes genotipos de *Acanthamoeba* son agentes que causan la queratitis amibiana (QA), en especial el genotipo T4 el cual se relaciona con mayor frecuencia con casos de QA en Irak.

En la actualidad el esquema clásico que dividía a los protozoos en cuatro grupos: Sarcodina (amibas), Mastigophora (flagelados), Sporozoa (parásitos) e Infusoria (ciliados), ha sido remplazado por uno nuevo, el cual toma en cuenta los avances

morfológicos, bioquímicos y moleculares (Visvesvara *et al.*, 2007). Los más viejos sistemas taxonómicos que consistían en el tradicional del Reino, Fila, Clase, Subclase, Superorden y Orden, han sido sustituidos. De acuerdo al nuevo esquema los eucariontes han sido clasificados en seis súper grupos nombrados Amoebozoa (en donde se encuentra *Acanthamoeba*), Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata (Ald *et al.*, 2005; Visvesvara *et al.*, 2007).

2.2. Ecología de *Acanthamoeba*

El género *Acanthamoeba* se encuentra ampliamente distribuido en la biósfera, medios acuáticos y terrestres e incluso pueden establecer relaciones simbióticas con bacterias, virus y micoplasmas (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Su distribución geográfica depende en gran medida de las condiciones físicas y biológicas del medio que los rodea (Biddick *et al.*, 1984).

Las amibas se encuentran en cualquier tipo de agua; salobre, dulce, residual, piscinas y embotelladas (Biddick *et al.*, 1984; Keleti y Sykora, 1992; Rivera *et al.*, 1994; Magnet *et al.*, 2009; Marciano-Cabral *et al.*, 2009). También están presentes en lagos de agua dulce (Solarte *et al.*, 2006) y en aguas termales (Moore *et al.*, 1987), estaciones para lavados oculares (Byers y Sawyer, 1990), en sistemas hidráulicos de unidades de hemodiálisis y dentales (Dendana *et al.*, 2008), en sistemas de aire acondicionado y torres de enfriamiento, en plantas nucleares (Visvesvara y Schuster, 1993), en cualquier tipo de suelo; a nivel de la superficie y a distintas profundidades del mismo e incluso en aguas oceánicas y sedimentos marinos. Se han reportado trabajos que han monitoreado la atmósfera de la ciudad de México, encontrándose en mayor cantidad en aquellas zonas donde la contaminación atmosférica es elevada (Hernández, 1991). Son resistentes a cambios extremos, lo que facilita su colonización y el mantenimiento de las poblaciones amibianas en una amplia variedad de microambientes (Rodríguez-Zaragoza, 1994).

Se han aislado amibas de diferentes zonas de la región antártica, de la superficie de vegetales y hongos comestibles y con cierta facilidad se pueden aislar de los

intestinos de distintos animales como: patos salvajes, gaviotas, ratas, peces, reptiles y de anfibios (Lewis y Sawyer, 1979; Dyková *et al.*, 1999).

La ubicuidad de los organismos en el suelo y la superficie de zonas acuáticas sugieren que la mayoría de los seres humanos están expuestos a estos patógenos, más aún, causando enfermedades leves en piel y vías respiratorias que no son diagnosticadas (Chapell *et al.*, 2001).

2.3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba*

El ciclo biológico de *Acanthamoeba* consta de dos estadios; un estado vegetativo y otro quístico.

2.3.1. Trofozoíto

El estado vegetativo o trófico representa la fase reproductiva la cual se distingue morfológicamente, ya que presenta una forma amibiana clásica con sus característicos lobópodos (Pussard y Pons, 1977).

En su morfología el trofozoíto presenta finas proyecciones a lo largo de todo el cuerpo amibiano conocidas como acantópodos (*Acantos* ; espinas), las cuales le dan el nombre al género (Bowers y Korn, 1968), también presentan lobópodos hialinos de gran tamaño con movimientos lentos con respecto a otros grupos.

El trofozoíto varía en tamaño que va de 25 a 40 μm con formas ovales, alargadas o irregulares (Lewis y Sawyer, 1979; Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Presenta un núcleo con un gran nucléolo localizado centralmente, también presenta un citoplasma abundante con mitocondrias, lisosomas, vacuolas alimenticias y una vacuola contráctil (Martínez y Visvesvara, 1997), fácilmente observables a través del microscopio de luz, las cuales carecen de una forma y tamaño definidos (Byers y Sawyer, 1990).

Durante esta fase también se llevan a cabo los procesos metabólicos básicos y esenciales que permiten la alimentación a través de fagocitosis y pinocitosis, además de la síntesis y transformación de estos materiales.

La división celular en *Acanthamoeba* se denomina metamitosis de acuerdo al patrón que se lleva a cabo en los metazoos en general (Page, 1988).

2.3.2. Quiste

El estado quístico se origina cuando las condiciones del ambiente no son las adecuadas para el desarrollo amibiano, ya sea por cambio de temperatura, escasez de nutrientes, disminución de la concentración de iones, entre otros (Pearl *et al.*, 1990). Representa una forma de resistencia y protección a situaciones adversas, aún por largos periodos (Ibrahim *et al.*, 2007).

Mazur *et al.*, 1995 demostraron que quistes de *Acanthamoeba* conservados a 4°C, continúan siendo viables por más de 24 años, sin perder su capacidad invasiva.

El tamaño del quiste varía entre las especies que conforman el género, con una longitud promedio de 15 a 28 µm. Los quistes tienen una doble pared, la externa o exoquiste que es moderadamente redondeada mientras que el endoquiste o pared interna muestra un arreglo poligonal.

El citoplasma del quiste es muy denso por lo que se dificulta la descripción de su estructura interna, contiene glóbulos de lípidos, lisosomas, mitocondrias generalmente esféricas y retículo endoplásmico rugoso dispuesto en forma circular y rodeando a mitocondrias, núcleo, vacuolas y otras inclusiones (Lares, 1990).

Las dos paredes quísticas parecen estar separadas entre sí a lo largo del perímetro celular y se unen solamente en algunos puntos que corresponden a las zonas angulares del endoquiste. En estas zonas de contacto se forman poros denominados opérculos con bordes circulares (Rondanelli, 1987).

Cuando las condiciones del entorno al quiste son favorables, el trofozoíto emerge a través de los opérculos, quedando el quiste vacío (John, 1993).

3. QUERATITIS AMIBIANA

Acanthamoeba spp., produce una infección crónica en la córnea llamada queratitis amibiana (QA), la cual es una infección corneal de curso crónico de difícil resolución, caracterizada por una necrosis progresiva del epitelio corneal y destrucción de la lamela estromal que puede causar la pérdida del ojo (Martínez y Visvesvara, 1997).

La QA ocurre en dos fases, la primera se restringe a la superficie del epitelio corneal y la segunda se presenta cuando las amibas han invadido el estroma

subyacente el cual produce inflamación intensa. Se han descrito al menos ocho especies de *Acanthamoeba* causantes de queratitis: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina* y *A. griffini*, (Schaumberg *et al.*, 1998).

3.1. Epidemiología de la queratitis amibiana

Hasta agosto de 2006, se habían reportado alrededor de 5,000 casos de QA en los Estados Unidos (Visvesvara *et al.*, 2007).

Se estima que se ha incrementado considerablemente el número de casos de QA en todo el mundo, debido a la proporción creciente de portadores de lentes de contacto (Ibrahim *et al.*, 2007). Esta cifra incluye a países como la India en donde los casos de QA, están relacionados principalmente con traumatismos y contacto directo con agua que contenga a los parásitos (Sharma *et al.*, 2000) y Gran Bretaña en donde se estima que los casos han aumentado en la medida en que se utilizan métodos caseros en la limpieza de lentes de contacto (Radford *et al.*, 2002).

En nuestro país el estudio de la QA se encuentra en una etapa temprana de investigación misma que dio inicio con el hallazgo de los primeros casos en el Hospital “Asociación para evitar la ceguera en México Luís Sánchez Búlnes” sin embargo se desconoce la incidencia real de ésta patología en nuestro país (Omaña, 1997; Omaña *et al.*, 2005).

3.2. Factores de riesgo de la queratitis amibiana

El 85 % de los casos reportados de QA se relaciona con usuarios de lentes de contacto (Kilvington *et al.*, 1990; Martínez y Visvesvara, 1997), el 13 % de éstos corresponde a pacientes con algún traumatismo corneal provocado por la introducción de un cuerpo extraño y el 2 % no tiene razón aparente de su presencia (Stehr-Green *et al.*, 1987; John *et al.*, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

El uso prolongado de lentes de contacto en general y en particular de tipo blandos y desechables es considerado como un factor de riesgo para la QA (Limp, 1990).

Las soluciones conservadoras, el lavado inadecuado de los estuches de lentes de contacto y la contaminación de las botellas de esterilizadores químicos juegan un papel importante para la adquisición de la patología (Donzin *et al.*, 1989).

Con frecuencia se han aislado amibas del género *Acanthamoeba* de soluciones conservadoras de lentes de contacto, de personas sin sintomatología de QA (Larkin, 1990).

Se ha observado la capacidad que tienen las amibas para poder adherirse a cualquier tipo de lentes; rígidos, permeables, blandos y desechables. Sin embargo las amibas no se adhieren con facilidad a los lentes con bajo contenido en agua y aquellos elaborados con materiales no iónicos (John *et al.*, 1991; Perkovich *et al.*, 1991; Lema *et al.*, 2001).

Se ha reportado que *Acanthamoeba* se adhiere con mayor afinidad a lentes de contacto que han sido utilizados en tiempos prolongados a diferencia de lentes nuevos (Ramachandran *et al.*, 1997), sin embargo se considera que pacientes con uso apropiado de lentes de contacto y el frecuente reemplazo de las soluciones preservadoras no están exentos de la infección por QA (Thebpatiphat *et al.*, 2007). La adherencia de las amibas se incrementa con la presencia de bacterias las cuales se ha demostrado dejan una película sobre los lentes (Simmons *et al.*, 1998). Badenoch *et al.*, en 1990 y Bottone *et al.*, en 1992, resaltan la importancia de encontrar bacterias asociadas a los lentes de contacto de usuarios con la infección. Esta relación puede ser sinérgica y es probable que sea el paso inicial en la invasión de las amibas en la córnea.

Marciano-Cabral *et al.*, en 2009, lograron aislar bacterias y parásitos patógenos en los sistemas de distribución de agua de uso doméstico en los Estados Unidos, entre las amibas que se lograron aislar se encuentra *Acanthamoeba* y *Naegleria*, concluyendo que la presencia de estas amibas patógenas en los sistemas de agua de consumo humano son un gran factor de riesgo para las personas.

3.3. Cuadro clínico de la queratitis amibiana

Se presenta en individuos sanos e inmunocompetentes, con historia de contacto directo en córnea con fluidos contaminados (agua destilada, solución salina, agua

de tubería) (Martínez y Visvesvara, 1997). Utilización de lentes de contacto en general y lentes de tipo blando en particular (Epstein *et al.*, 1986).

Los síntomas que presentan los pacientes son: severo dolor, fotofobia, irritación, sensación de cuerpo extraño, lagrimeo y disminución de la visión, se observa epiteliopatía o pseudodendritas (Pérez *et al.*, 2005).

Se reporta un curso crónico y progresivo resistente al tratamiento, además de presentar cultivos repetidos negativos a bacterias (Moore *et al.*, 1987; Rabinovich *et al.*, 1991; Mannis, 1998).

En etapas avanzadas de la infección generalmente se presenta pérdida del epitelio corneal y opacidad estromal ligada con la pérdida gradual de la visión (Lindsay *et al.*, 2007).

La descripción de los eventos que se llevan a cabo en los pacientes con esta infección es muy limitada debido a que sólo se cuenta con las evidencias que muestran casos aislados detectados en diferentes estadios y curso clínico, por lo que no es factible hacer generalizaciones (John, 1993).

3.4. Diagnóstico clínico de la queratitis amibiana

Para formular un diagnóstico oportuno es preciso que el oftalmólogo tenga muy presente la queratitis por *Acanthamoeba* entre sus diagnósticos de sospecha ante pacientes en situación de riesgo (Wong *et al.*, 2007).

A la queratitis amibiana difícilmente se le toma en cuenta en los diagnósticos diferenciales primarios (Bacon *et al.*, 1993). Frecuentemente se confunde con queratitis causada por virus (Lindsay *et al.*, 2007). Lo anterior se explica por que las características clínicas de la QA son semejantes a las observadas en infecciones por *Herpes simplex* (Rodríguez *et al.*, 1998), este diagnóstico erróneo de queratitis herpética favorece que se presenten complicaciones que conduzcan a un mal pronóstico (Li *et al.*, 2002).

La QA, rara vez es diagnosticada oportunamente y en la mayoría de los casos la infección se diagnostica después de varias semanas o meses de evolución (Ledee *et al.*, 1996). La presencia de *Acanthamoeba* es difícil de confirmar si las muestras se toman de manera superficial.

En la fase inicial de la QA se puede encontrar el epitelio corneal intacto, por lo cual se recomienda hacer biopsias corneales para asegurar el hallazgo de la amiba, las cuales deben ser tomadas en quirófano por personal calificado, que solamente tome la muestra de la parte afectada.

3.5. Diagnóstico de laboratorio de la queratitis amibiana

El diagnóstico de la QA, dentro del laboratorio suele ser difícil ya que depende del equipo y material necesario para su identificación.

La infección por *Acanthamoeba* puede ser confirmada cuando se hace un raspado vigoroso de la córnea con un hisopo, espátula o bisturí (Noopur y Rodhika, 2008), colocando el material obtenido en un portaobjetos y tiñendo con la técnica de Giemsa, Gram, PAS, Wright o naranja de acridina (Hahn *et al.*, 1998), pero es necesaria la búsqueda meticulosa de un observador experto.

Los raspados corneales se colocan en placas de agar no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor (medio NNE) para el aislamiento de *Acanthamoeba* (Schaumberg *et al.*, 1998).

Si el paciente es usuario de lentes de contacto; tanto los lentes como las soluciones conservadoras deben sembrarse en el medio para la búsqueda de amibas (Mathers *et al.*, 1987; Linqvist *et al.*, 1998).

Cuando se realiza una queratoplastia, es decir un trasplante de córnea, un fragmento de ésta se debe colocar en un recipiente estéril o directamente en el medio NNE.

En la actualidad se pueden utilizar otras técnicas de diagnóstico e identificación como el diagnóstico a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Noopur y Tandon, 2008), es una prueba más sensible y precisa y se puede emplear en muestras corneales y de lágrimas de pacientes, sin embargo, en México no es posible realizarlas en la mayoría de los hospitales debido a la falta de material adecuado para llevarla a cabo.

3.6. Histopatología de la queratitis amibiana

La QA se caracteriza por presentar una inflamación crónica del estroma corneal que va de leve a moderada (Kremer *et al.*, 1994). Es probable que la persistencia de antígenos amibianos en la córnea como los neutrófilos cause una inflamación de la córnea y la esclera en ausencia de trofozoítos activos (Yang *et al.*, 2001). Se observan leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos, en zonas cercanas a quistes y trofozoítos. Pueden estar presentes también macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y células gigantes multinucleadas (Martínez y Visvesvara, 1997). En ocasiones la conjuntiva puede presentar una congestión intensa e inflamación aguda o subaguda (Moore *et al.*, 1987).

Na *et al.*, 2002, evaluaron el efecto de una proteína secretada por *Acanthamoeba castellanii* sobre las inmunoglobulinas del portador encontrando que IgA, IgE e IgM fueron degradadas. Se ha encontrado que en pacientes con QA se eleva considerablemente la IgA en comparación con individuos asintomáticos (Clarke y Niederkorn, 2006).

La evaluación histológica de las lesiones por QA en humanos y animales de experimentación revela numerosos neutrófilos en la córnea, más aún, se ha reportado que en casos severos de QA la necrosis del estroma es mediada por proteasas liberadas por neutrófilos más que por el efecto de las amibas, por lo que se cree que los neutrófilos infiltrados en el estroma corneal exacerban la patología (Hurt *et al.*, 2001), aunque se piensa que la ruptura del tejido corneal, el edema y la infiltración de neutrófilos es también debida a la acción colagenolítica de las amibas (Yu-Guang *et al.*, 1990).

Los cambios histológicos que se reportan en la QA son: ulceración epitelial, pérdida de queratocitos, inflamación del estroma anterior, además de que los trofozoítos por lo general se observan en el estroma anterior y las formas quísticas en el estroma posterior.

Vemuganti *et al.* en el 2000, propusieron una posible secuencia de eventos que lleva a cabo el parásito en su invasión en la córnea:

- A) Infección inicial que involucra el rompimiento de la barrera epitelial de la córnea.

B) Invasión de los trofozoítos de *Acanthamoeba* al estroma corneal con disgregación y pérdida de los queratocitos.

3.7. Tratamiento de la queratitis amibiana

El tratamiento para la QA no ha resultado ser el adecuado en la mayoría de los casos, debido al diagnóstico tardío de la enfermedad, el tratamiento médico exitoso depende en gran medida del momento en que éste se inicie.

Bacon *et al.*, en 1993; reportaron una buena recuperación visual de pacientes con QA, después del tratamiento que se llevó a cabo durante el primer mes de la infección.

Es importante el diagnóstico oportuno con base en la observación de las amibas, cuando no es posible establecer diferencias clínicas que permitan distinguir el agente etiológico de la patología, sin embargo, en la mayoría de los casos la identificación de estos protozoos se lleva a cabo a un nivel genérico en el mejor de los casos.

Tu *et al.*, 2009, reportan que durante el tratamiento de casos de QA se han presentado infecciones producidas por bacterias, dichas infecciones secundarias pueden tener una relación de endosimbiosis con la amiba, sin embargo esta combinación de microorganismos acelera el tiempo de infección.

Se han realizado investigaciones para evaluar esquemas terapéuticos que ayuden a limitar el daño que provocan estas amibas anifzóicas. Los fármacos que han sido utilizados con cierto éxito son: itraconazol, ketoconazol, miconazol, isotionato de propamidina y trobamicina (Linguist *et al.*, 1988; Cohen *et al.*, 1991).

Ishibashi *et al.*, en 1990, fueron los primeros en reportar la eficacia del itraconazol en pacientes con QA, aunque su utilización no ha sido tomada en cuenta de manera generalizada.

Junes *et al.*, en 1994, evaluaron el efecto del itraconazol y ketoconazol, diazoles eficaces en el tratamiento contra agentes amibianos y fúngicos, los cuales son bien tolerados y pueden emplearse en aquellas infecciones diagnosticadas como no virales y no bacterianas.

En el caso de los corticoesteroides, su uso es controversial ya que la inmunosupresión que producen puede facilitar la invasión de las amibas, aunque ayudan a disminuir la inflamación corneal y el severo dolor ocular (Park *et al.*, 1997).

En la actualidad las biguanidas: polihexametilenbiguanida (PHMB) y las diamidinas (Bolene), se han utilizado como antiamebianos y quisticidas en donde se ha reportado recuperación visual de pacientes con queratitis amibiana en tratamientos de tres a cuatro meses (Rodríguez y *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007).

Lee *et al.*, 2007, determinaron el efecto amebicida de la PHMB y el clorhexidina y su efecto tóxico sobre los queratocitos, encontrando que ambos tratamientos mostraron un efecto amebicida eficaz, sin embargo el PHMB provocó daño a los queratocitos.

Vural *et al.*, 2007, reportaron que la clorhexidina causa daño sobre las células del epitelio corneal de rata al utilizar concentraciones mayores de 7.81 mg/ml.

Lou *et al.*, 2008, observaron que la clorhexidina al 0.02 % mata a los trofozoítos e inhibe la actividad de los quistes en el tejido córneo después de interaccionarlos durante 24 horas. Sin embargo, mencionan que los quistes inactivos pueden permanecer en la córnea durante mucho tiempo causándole inflamación.

Martín-Navarro *et al.*, 2009, evaluaron el daño que causan dos drogas, cafeína y clorhexidina a los elementos del citoesqueleto de *Acanthamoeba castellanii*, argumentando que el citoesqueleto juega un papel importante en los procesos biológicos de fagocitosis y del enquistamiento de *Acanthamoeba*. Sin embargo reportan que ambas drogas sólo produjeron un ligero daño sobre la estructura de la amiba.

Cuando se dificulta el tratamiento y la patología evoluciona puede ser necesaria la queratoplastia, siendo muy importante delimitar el área de la zona que se debe remover, cuidando de no dejar áreas contaminadas con amibas, con lo que se evita una infección recurrente (D'Aversa *et al.*, 1995; Taenaka *et al.*, 2007).

Taenaka *et al.*, en 2007, evaluaron la eficacia de la queratoplastia en dos pacientes con queratitis amibiana, obteniendo una evolución de la agudeza visual

favorable en ambos casos y consideran que dicho procedimiento quirúrgico ayudaría a tratar especialmente casos avanzados de QA.

En ocasiones es necesaria una segunda intervención e incluso algunos de los pacientes pierden el ojo afectado (Zanetti *et al.*, 1995).

La mayoría de los tratamientos utilizados para combatir la QA, han sido cuestionados por presentar reacciones de toxicidad en humanos, por esta razón se está buscando métodos alternativos para su tratamiento. Derda *et al.*, en 2008, analizaron la capacidad amebicida de distintos extractos de plantas encontrando que algunas presentaban propiedades amebicidas en bajas concentraciones lo que abre la posibilidad de poder obtener a futuro nuevas formas de tratamiento para las infecciones por *Acanthamoeba*.

3.8. Prevención de la queratitis amibiana

La queratitis por *Acanthamoeba* puede prevenirse en la mayoría de los casos. La correcta higiene de los lentes de contacto podría evitar más del 85 % de los casos de QA. Tanto el hecho de no desinfectar las lentes, como utilizar suero fisiológico no estéril o agua del grifo, entrañan un riesgo mucho mayor de queratitis (Gray, 1995; Lee *et al.*, 2007; Lindsay *et al.*, 2007).

Es necesario que los usuarios de lentes de contacto sigan las instrucciones del uso adecuado de los lentes por parte de un especialista (Lee *et al.*, 2007).

3.9. Virulencia de *Acanthamoeba* en la queratitis amibiana

Están determinados por los siguientes factores:

3.9.1. Adherencia

Las amibas pueden adherirse a distintos medios como son las superficies inertes de los lentes de contacto (John *et al.*, 1991; Gorlin *et al.*, 1996; Jaison *et al.*, 1998), o diversos tejidos como el epitelio corneal. La adherencia es favorecida por la temperatura y el tiempo de permanencia en dichas superficies (Moore *et al.*, 1991).

Ya que el 85 % de los casos de QA ocurre en usuarios de lentes de contacto, éstos son considerados vectores de los trofozoítos y quistes amibianos. La adherencia de los trofozoítos a los lentes de contacto depende en gran medida del contenido hídrico, la ionicidad y la composición de los polímeros de los lentes (Gorlin *et al.*, 1996).

Lema *et al.*, en 2001, demuestran que los lentes de contacto suaves desempeñan un factor de riesgo importante para la queratitis amibiana y que las lentes de contacto no iónicas pueden disminuir la adherencia de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

La habilidad de los trofozoítos para unirse a la superficie corneal es un prerrequisito para que la infección de inicio. Panjwani *et al.*, en 1997, demostraron a través de ensayos *in vitro* la presencia de una proteína de 207 KDa de peso molecular que se une a una manosa (Yang *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1998).

Kennett *et al.*, en 1992, sugieren la participación de una adhesina de 107 KDa, diferente a la proteína de unión de manosa, relacionada con la patogenicidad de *Acanthamoeba*.

La adherencia es un paso importante para que la amiba provoque daño en la superficie corneal y se cree que dicho daño ocurre por la citólisis como respuesta a productos de liberación amibiana (Alizadeh *et al.*, 1994).

Gordon *et al.*, en 1993, demostraron por medio de ensayos *in vitro* que *A. polyphaga* se adhiere también a la matriz extracelular y lamina basal (componentes de la córnea y conjuntiva corneal), y esta adherencia es mayor a colágena tipo IV que a la reportada hacia laminina y fibronectina. Dicha unión también es inhibida por la manosa.

Pidherney *et al.*, en 1993, reportaron que las amibas se adhieren a la córnea de cerdo y de humano de manera más eficiente de lo que se adhieren a la córnea de ratón, rata y conejo, lo que sugiere una adherencia específica.

Alizadeh *et al.*, en 2004, mencionan que el *Corynebacterium xerosis* un componente de la flora ocular, contiene grandes cantidades de manosa y se le asocia con la infección de queratitis amibiana.

Con respecto a la fase quística se determinó que de la misma manera los quistes son capaces de adherirse a diferentes superficies y lo hacen de manera pasiva, lo cual es importante si se considera que estas formas de resistencia pueden adherirse a los lentes de contacto y a la superficie corneal en donde pueden enquistar e iniciar la invasión del tejido blando (Kelly y Xu, 1995).

3.9.2. Migración

Esta depende del tipo de movimiento del protozoo, el cual es lento en cepas de *Acanthamoeba*. La temperatura juega un papel importante en este proceso ya que se ha observado que algunas amibas migran mejor a 30 °C que a temperaturas más altas. Se cree que el avance lento de la amiba es el que determina un curso crónico en las infecciones que provocan (Badenoch *et al.*, 1990; Morton *et al.*, 1991).

3.9.3. Invasión de tejidos

La penetración a las superficies mucosas, posterior a la adherencia y la colonización, es un paso importante en el proceso invasivo de estas amibas.

Se sabe que las proteasas producidas por las amibas son importantes en la invasión tisular, migración y daño al huésped. Esta actividad proteolítica ha sido reportada también en diferentes parásitos (McKerrow, 1993).

He *et al.*, en 1990, reportaron un estudio *in vitro* e *in vivo* en el que productos de excreción y secreción de trofozoítos de *A. castellanii* fueron capaces de degradar colágena de tipo I, sin embargo no se pudo afirmar si se trataba de una sola enzima o el resultado de la acción de más de una.

Mitra *et al.*, en 1994, demostraron y caracterizaron parcialmente la actividad de tres enzimas; serina, cisteina y metaloproteasas capaces de degradar colágena de tipo I. Hadas y Mazur, en 1993, evaluaron ocho especies de *Acanthamoeba* y todas produjeron una serin proteasa de 35 kDa y otra de 65 kDa.

Leher *et al.*, en 1998, encontraron que los trofozoítos de *Acanthamoeba* expuestos a manosa por 48 horas o más, eran capaces de liberar una serin proteasa de 100

kDa y a su vez producir una citólisis independiente de contacto en células epiteliales de córnea.

Alfieri *et al.*, en el 2000, evaluaron la actividad proteolítica de extractos totales amibianos y del medio condicionado (cultivo en fase logarítmica de crecimiento de 72 hrs) de *A. polyphaga* encontrando: cistein proteasas de 43, 59, 70, 100-130 kDa, de las cuales las de 43, 70 y 130 kDa se detectaron en el medio condicionado; serin proteasas de 45, 60, 75, 100-110 kDa que se liberan al medio de cultivo.

Kinnear en el 2004, evaluó la capacidad de patogenicidad que producen los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* sobre las células de la córnea, concluyendo que las células epiteliales realizan una importante función de barrera contra la infección ya que dificultaron el inicio de la penetración de los trofozoítos.

Rocha *et al.*, 2009, evaluaron los mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba culbertsoni*, sobre la membrana basal y el estroma corneal, encontrando que la actividad proteolítica juegan un papel muy importante en la invasión de la amiba.

En general se piensa que la virulencia de las diferentes especies y cepas de *Acanthamoeba* puede variar significativamente aún dentro de la misma especie, misma que disminuye con el tiempo de permanencia en los medios de cultivo (Hadas y Mazur, 1994).

John en 1993, reporta que es conveniente mantener o bien aumentar la virulencia de las amibas haciéndolas crecer en cultivos de tejido, así como a través de inoculaciones intranasales repetidas en ratón.

3.10. Modelos experimentales de queratitis amibiana

La implementación de un modelo experimental de QA es prioritaria para el estudio de los mecanismos de patogenicidad que llevan a cabo las amibas en la córnea. Es necesario conocer la serie de pasos que tienen lugar desde que las amibas entran en contacto con la córnea hasta que le producen el daño suficiente para impedir una visión adecuada. El conocimiento y análisis de este proceso en un modelo animal finalmente deben dirigirse a la aplicación de nuevos tratamientos para la patología corneal amibiana.

Un modelo experimental ideal de QA es aquel que semeje la patología que se reporta para la córnea humana. El modelo debe satisfacer los postulados de Koch en la que la infección debe ser producida por organismos vivos, los parásitos viables deben aislarse de los tejidos afectados y crecer en cultivos axénicos.

Desde que se diagnosticaron los primeros casos de QA, se comenzaron a implementar los primeros modelos experimentales de esta infección ocular sin mucho éxito. En todos ellos se han tratado de explicar los mecanismos de daño que llevan a cabo los trofozoítos y quistes en la QA. Los estudios más representativos se detallan a continuación:

Font *et al.* en 1981 y Cote *et al.* en 1991, inyectaron intraestromalmente trofozoítos y quistes de *A. polyphaga* en conejos pre-tratados con esteroides (vía subconjuntival por 4 días). Los conejos mostraron una queratitis estromal y ulceraciones corneales. Sin embargo, ahora se sabe que la infección en humanos no se asocia a condiciones de inmunosupresión como lo es la infección en el sistema nervioso central.

Badenoch *et al.* en 1990, consideraron que las amibas necesitaban ser inoculadas con una bacteria frecuentemente aislada de casos de queratitis bacteriana; *Corynebacterium xerosis*, por lo que la inocularon intraestromalmente con trofozoítos de *Acanthamoeba* en ratón. Sin embargo los resultados no fueron reproducibles.

Van Klink *et al.* en 1993, demostraron que la QA no podría producirse introduciendo trofozoítos a través de una inyección intraestromal, intraconjuntival, o a través de la aplicación tópica de trofozoítos a la superficie corneal intencionalmente dañada.

Los modelos anteriores fueron poco prometedores y poco significativos debido a que ninguno de éstos consideró llevar a cabo un modelo que semejase la vía natural de infección, es decir, por medio de contacto directo de trofozoítos o quistes a la superficie corneal.

Nieder Korn *et al.* en 1992, demostraron en estudios *in vitro* que *Acanthamoeba* no se adhiere a la superficie corneal de rata, ratón, conejo entre otros seis mamíferos estudiados y solamente se adhirieron eficientemente a la córnea de humano, cerdo y hámster chino. Sus resultados los sustentaron considerando que la adherencia de los trofozoítos a una superficie corneal previamente dañada era un factor de riesgo para la QA.

Con base en estos resultados Van Klink *et al.*, en 1993, establecieron un modelo de QA en hámster chino y cerdo, a los que se les provocó una abrasión intencional previa a la interacción, que involucró el 25 % de la superficie corneal y posteriormente se les colocaron por siete días lentes de contacto con trofozoítos de *A. castellanii* adheridos a éstos. No obstante que estos modelos parecen más relevantes que los anteriores, en éstos se presenta una resolución espontánea de la infección con la desaparición de los signos clínicos de una inflamación corneal, además de la imposibilidad de recuperar trofozoítos o quistes de las muestras corneales en etapas crónicas de la infección.

Omaña-Molina *et al.*, en el 2004, implementaron un modelo experimental *in vitro*, utilizando al hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental sin lesión corneal previa. A través de la interacción de amibas en tiempos cortos, fue posible evaluar las alteraciones morfológicas y electrofisiológicas que estos protozoos producen en la córnea.

Quijano *et al.* en el 2006, evaluaron a conejos inmunosuprimidos sistémica y tópicamente, en un modelo para reproducir la infección corneal causada por *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*, concluyendo que a pesar de haberse incrementado factores importantes de riesgo tales como la desepitelización corneal y la inmunosupresión, no fue posible reproducir la enfermedad.

4. JUSTIFICACIÓN

Para prevenir y controlar las patologías que las amibas del género *Acanthamoeba* ocasionan es indispensable conocer los aspectos biológicos de estos agentes causales, así como los mecanismos de patogenicidad que llevan a cabo desde que entran en contacto con su huésped, las vías de invasión, mecanismos de evasión de la respuesta inmune, entre otros, sin embargo, en el caso particular de *Acanthamoeba*, hasta el momento no se conocen con certeza los mecanismos de patogenicidad de estas amibas en la córnea humana. De forma general se considera que la adherencia, migración y penetración en el tejido juegan un papel importante en el proceso de invasión de estos protozoos, sin embargo, no se han descrito de manera precisa los pasos que se llevan a cabo desde que las amibas se adhieren al epitelio corneal hasta que se produce el daño en la córnea humana. Se desconoce también si el trofozoíto participa activamente en los mecanismos de patogenicidad de las amibas.

A través de la implementación de un modelo experimental de QA *in vitro* utilizando al hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*) como animal de experimentación (Omaña-Molina *et al.*, 2004), se ha podido demostrar que no es necesaria la existencia de una lesión corneal previa para que las amibas provoquen daño como otros investigadores afirmaban, de modo que sería importante detallar la forma en la que las amibas invaden la córnea de origen humano y poder validar los hallazgos reportados *in vitro*, y de este modo continuar con el análisis y descripción del proceso de invasión de estas amibas en este tejido blanco con el propósito final de evitar que estos organismos provoquen infecciones crónicas de difícil diagnóstico y resolución.

Por lo anterior, se propone en el presente estudio que a través de la observación de la interacción entre *Acanthamoeba castellanii* (una de las especies de *Acanthamoeba* más frecuentemente aisladas de casos de queratitis amibiana), con la córnea humana en diferentes tiempos, se pueda describir el proceso inicial de la invasión y la posible penetración de las amibas al tejido corneal.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar los eventos morfológicos tempranos que tienen lugar durante la interacción de la fase trófica de *Acanthamoeba castellanii* y sus productos (medio condicionado) en la córnea humana, a través de microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz.

5.2. Objetivos Particulares

Evaluar la virulencia de *Acanthamoeba castellanii*.

Determinar la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* en la proporción óptima entre el medio axénico y el medio de transporte y conservación de la córnea humana (optisol), para llevar a cabo las interacciones.

Describir morfológicamente los mecanismos de patogenicidad de formas tróficas y medio condicionado de *Acanthamoeba castellanii*, en la córnea humana a través de microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Obtención de la cepa amibiana

Se trabajó con una de las especies del género *Acanthamoeba* más frecuentemente aisladas de casos de QA; *Acanthamoeba castellanii*. La cepa en estudio se recolectó de lentes de contacto de una persona sin infección corneal, en el Hospital “Asociación para evitar la ceguera en México Luís Sánchez Búlnes” y fue aislada e identificada por Hernández, (2002), en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala.

La cepa amibiana se recibió en medio axénico y se hizo crecer en cajas de cultivo con medio bactocasitona enriquecidas con suero fetal bovino al 10 % las cuales se incubaron a una temperatura de 30 °C -determinada previamente como temperatura óptima para su desarrollo-, hasta alcanzar su fase logarítmica de crecimiento (72h), asegurando con ello contar con cultivos en las mejores condiciones.

Cultivos amibianos masivos. Para favorecer el desprendimiento de los trofozoítos, las cajas de cultivo se colocaron sobre hielo durante tres minutos, se agitaron y el contenido de la caja se vació en tubos de polipropileno de 15 ml. De cada tubo se tomaron 10 µl y se colocaron en una cámara de Neubauer para contar la cantidad total de trofozoítos.

Las amibas suspendidas en los tubos se concentraron por medio de centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y se desechó cuidadosamente el sobrenadante, para poder utilizarlas en cada una de las interacciones.

Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones para poder asegurar que se trabajó con un 100 % de trofozoítos sin formas quísticas.

6.2. Evaluación de la virulencia de las amibas en estudio

Se determinó la virulencia de la cepa en estudio a través de la inoculación intranasal de 1×10^6 trofozoítos en cinco ratones Balb/c machos de 21 días de edad, de acuerdo a la técnica propuesta por Culbertson *et al.* (1959), en la que se produjo una infección en el SNC de los ratones. Todos los animales se observaron diariamente y recibieron un cuidado convencional. De acuerdo con Culbertson los animales enfermos o moribundos fueron sacrificados y aquellos aparentemente sanos se sacrificaron después de 21 días. El cerebro, pulmones, hígado y riñones de los animales recién sacrificados se cultivaron en cajas de Petri con medio no nutritivo (NNE) a 30 °C para recuperar las amibas y su posterior axenización en el medio bactocasitona.

Con las amibas recuperadas se realizó una vez más la inoculación intranasal en tres ratones Balb/c con el propósito de aumentar la virulencia de la cepa.

6.3. Córneas humanas

Se trabajó con fragmentos corneales humanos no susceptibles para ser trasplantados, libres de erosiones corneales (donados por el banco de ojos del Hospital Juárez de México), con un patrón viral, bacterial y micótico negativo.

Se conformaron tres grupos de segmentos corneales:

Grupo a) Fragmentos de córneas interaccionadas con 5×10^5 de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, de cultivos en fase logarítmica de crecimiento (72 h).

Grupo b) Fragmentos de córneas interaccionadas con los productos amibianos (medio condicionado) de cultivos en fase logarítmica de crecimiento (72 h).

Grupo c) Considerado como grupo control, el cual se interaccionó con el medio bactocasitona el cual es el óptimo para el desarrollo amibiano y medio optisol necesario para el mantenimiento y preservación de la córnea humana.

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Se evaluaron tiempos tempranos de interacción (1, 2 y 3 h).

6.3.1. Medio óptimo para llevar a cabo las interacciones de *Acanthamoeba castellanii* en la córnea humana

Con el propósito de determinar el medio idóneo para el desarrollo de los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, al momento de ser interaccionadas con las córneas humanas.

Se incubaron 5×10^5 trofozoítos a 36.5 °C durante 24 horas en:

- Medio de transporte optisol.
- Medio optisol y bactocasitona 1:1.
- Medio optisol y bactocasitona 1:3.

La viabilidad de las amibas se determinó por medio del recuento de células vivas íntegras por la prueba de exclusión de azul tripano 0.4% (Anexo 1).

6.3.2. Estandarización de las condiciones óptimas para la interacción de las amibas en la córnea humana

Los fragmentos corneales se colocaron en placas de 24 pozos y se expusieron en ensayos separados con:

- Medio de transporte de las córneas (optisol).
- Medio optisol y medio bactocasitona 1:1.
- Medio bactocasitona.

Se incubaron a 36.5 °C durante 3 horas y se procesaron de acuerdo a la técnica convencional para microscopía electrónica de barrido con el propósito de determinar el medio idóneo para conservar en óptimas condiciones la córnea humana.

6.3.3. Interacción de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea humana.

6.3.3.1. Microscopía electrónica de barrido.

Los fragmentos corneales se colocaron en placas de 24 pozos, se lavaron con PBS estéril, para posteriormente ser interaccionadas con 5×10^5 trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* concentrados en 0.2 ml de bactocasitona y se incubaron a 36.5 °C en los tiempos preestablecidos (1, 2 y 3 h).

Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M y se procesaron de acuerdo a la técnica convencional para microscopía electrónica de barrido en donde las muestras se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol (70-100 %). Se secaron a punto crítico a partir de CO₂ líquido. Se montaron en bases de aluminio con plata coloidal y con un ionizador se cubrieron con una fina capa de oro (30nm) para observarse al microscopio electrónico de barrido PHILLIPS XL-30 ESEM.

6.3.3.2. Microscopía electrónica de transmisión.

Se manipulo el tejido corneal bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Al término de cada tiempo de interacción, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1 % por una hora y se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol (70-100 %), se transfirieron a óxido de propileno (dos cambios de 30 min), posteriormente a una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica (1:1) por 12 h y finalmente se dejaron en resina epóxica toda la noche a 60°C. Se hicieron cortes semifinos de las muestras con un grosor de 0.2 micras, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina y examinados en el microscopio de luz.

6.3.4. Interacción del medio condicionado de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea humana.

Los fragmentos corneales se colocaron en placas de 24 pozos y se interaccionaron con el medio condicionado de cultivos en fase logarítmica de crecimiento (72 h) el cual se pasó por un filtro Corning de 0.22 µm para asegurar la ausencia de trofozoítos y se incubaron a 36.5 °C durante 1, 2 y 3 h.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación de la virulencia de las amibas en estudio.

La evaluación de la virulencia de la cepa en estudio se llevó acorde a lo establecido en la metodología. Los ratones inoculados intranasalmente con trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* no murieron a los 21 días después de haber sido inoculados por lo que se dejaron transcurrir cuatro días más con el mismo resultado, después se sacrificaron conforme a la técnica propuesta por Culbertson *et al.*, 1959. Se extrajeron: hígado, riñón, cerebro y pulmones, se colocaron en cajas Petri que contenían medio NNE enriquecido con *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor y se incubaron a 30 °C. Los trofozoítos se recuperaron de todos los órganos (Tabla 1).

Ratón	Sacrificio	Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	Día 25	+++	+++	++	++
2	Día 25	+++	+++	++	++
3	Día 25	+++	+++	++	++
4	Día 25	+++	+++	++	++
5	Día 25	+++	+++	++	++

Crecimiento amibiano: escaso + moderado ++ abundante +++

Tabla 1. Recuperación de amibas de los distintos órganos de ratones Balb/c, después de haber sido sacrificados 25 días post inoculación intranasal con $1 \times 10^6/20 \mu\text{l}$ trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.

Con el propósito de aumentar la virulencia, con las amibas recuperadas se realizó una vez más la inoculación intranasal en tres ratones de la cepa Balb/c. En esta

ocasión tampoco murieron los ratones, sin embargo, nuevamente se recuperaron los trofozoítos de los cuatro órganos, con los mismos resultados.

7.2. Medio óptimo para llevar a cabo las interacciones de *Acanthamoeba castellanii* en la córnea humana.

Se observó que el medio optisol y la combinación de los medios optisol-bactocasitona 1:1 así como optisol-bactocasitona 1:3, no favorecieron el crecimiento de *Acanthamoeba castellanii*, el bactocasitona permitió un crecimiento abundante ya que se observaron 100 % de formas tróficas durante las 24 h de incubación.

Medio	Amibas #	Tiempo	Crecimiento	Formas tróficas	Formas quísticas
Optisol	5×10^5	24 h	Escaso	20 %	80 %
Optisol y bactocasitona 1:1	5×10^5	24 h	Moderado	40 %	60 %
Optisol y bactocasitona 1:3	5×10^5	24 h	Moderado	40 %	60 %
Bactocasitona	5×10^5	24 h	Abundante	100 %	0 %

Tabla 2. Incubación de 5×10^5 /ml trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* en diferentes proporciones de medio de transporte de córnea humana y medio de cultivo amibiano Bactocasitona; optisol, optisol/bactocasitona 1:1, optisol/bactocasitona 1:3 y bactocasitona incubados 24 horas a 36.5 °C, la viabilidad se determinó con la prueba de exclusión de azul tripano 0.4%.

El crecimiento adecuado de la amiba se obtuvo mediante la incubación con el medio bactocasitona enriquecido con suero fetal bovino al 10 %, lo que permitió trabajar con una población de 100 % de amibas en estado trófico y con una viabilidad mayor al 98 %. La fase logarítmica de crecimiento se obtuvo a 72 h.

7.3. Condiciones óptimas para la interacción de *Acanthamoeba castellanii* en la córnea humana.

El manejo adecuado de los segmentos corneales permitió asegurar que se trabajó en las mejores condiciones, es decir con córneas intactas ya que no se observaron alteraciones en su morfología ni signos de daño previo a la interacción.

En ensayos diferentes se evaluó el medio optisol (medio óptimo para el transporte de córneas), optisol-bactocasitona 1:1 y bactocasitona (medio óptimo para el desarrollo amibiano), incubados a 36.5 °C durante 3 h.

Los fragmentos corneales que se incubaron con optisol-bactocasitona 1:1, mostraron una superficie corneal con abundante descamación (Fig. 1A).

La superficie corneal presentó alteraciones en su morfología ya que se perdieron las uniones celulares del epitelio lo que provocó el desprendimiento de numerosas células (Fig. 1B).

Las córneas que se incubaron con optisol, mostraron descamación abundante en toda la superficie (Fig. 1C), además de que en algunas zonas se pueden distinguir separaciones celulares de gran tamaño, lo que indica que la superficie corneal no conservó su morfología normal al término del tiempo de interacción (Fig. 1D).

Mediante la interacción con el medio bactocasitona se pudo observar que no se produjeron alteraciones morfológicas en la estructura del epitelio corneal, por lo cual se consideró que el medio bactocasitona es el idóneo para poder llevar a cabo la interacción de los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea humana ya que por una parte favoreció el crecimiento amibiano, así como ayudó a preservar mejor las muestras corneales (Fig. 1E).

Las córneas incubadas con bactocasitona fueron consideradas como córneas control ya que se observó una morfología de apariencia normal con una descamación moderada y sin evidencia de daño al epitelio, ulceración, exfoliación celular excesiva o de algún otro defecto observado (Fig. 1F).

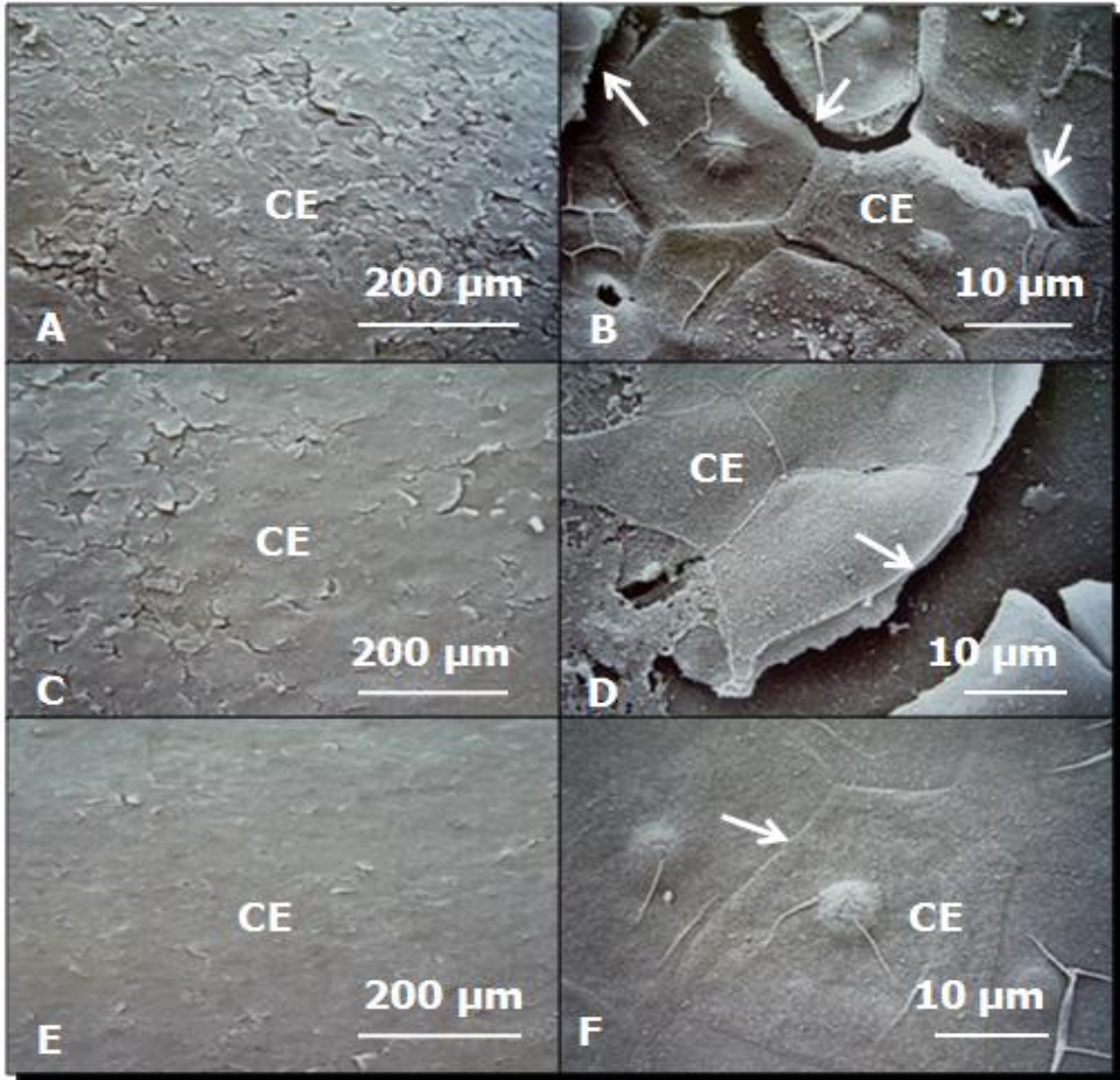


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido. Interacción de la córnea humana con optisol y bactocasitona a diferentes concentraciones durante tres horas. **A)** Se observan alteraciones anormales del epitelio corneal (CE) **B)** Numerosas células del epitelio corneal (CE) se encuentran desprendidas (flechas). Optisol **C)** La superficie del epitelio corneal (CE) muestra una desepitelización abundante. **D)** En algunas zonas se observan separaciones entre las células del epitelio (CE) que abarcan grandes áreas (flecha). Bactocasitona **E)** Se observa una morfología del epitelio corneal (CE) de apariencia normal **F)** Se observan las células del epitelio corneal (CE) sin alteraciones en la superficie (flecha).

7.4. Interacción de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea humana.

7.4.1. Análisis morfológico a través de microscopía electrónica de barrido.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la interacción de la amiba con la córnea humana se llevó a cabo la interacción de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* acorde a la metodología planteada.

Primera hora de interacción.

Mediante el análisis de las micrografías obtenidas del microscopio electrónico de barrido se puede observar que desde la primera hora de interacción, abundantes trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* se adhirieron a toda la superficie corneal, ya sea solos o en grupos los cuales desplazaron a las células del epitelio además de que comenzaron a migrar hacia las uniones celulares iniciando con la invasión del tejido de la córnea (Fig. 2A).

En varias imágenes fue posible observar que numerosos trofozoítos rodean a las células del epitelio que han sido desprendidas de la superficie iniciando aparentemente el proceso de fagocitosis (Fig. 2B).

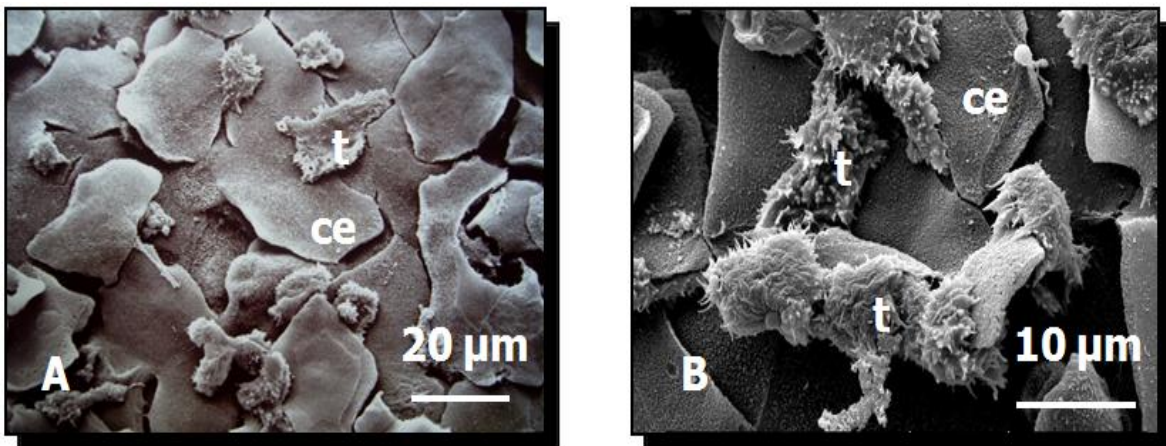


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido. Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* interactuando con córnea humana. (Primera hora). A) Se observan trofozoítos (t) de *Acanthamoeba* sobre y debajo de células del epitelio corneal (ce). B) Los trofozoítos (t) rodean a las células epiteliales (ce) y comienzan el proceso de fagocitosis.

Segunda hora de interacción.

En la segunda hora de interacción los trofozoítos continuaron con la invasión de la capa media del epitelio ya que levantaron a las células más superficiales lo cual les permitió avanzar hacia las capas subsecuentes del epitelio corneal (Fig. 3A).

Se observaron abundantes trofozoítos penetrando las capas más superficiales de la córnea colocándose debajo de éstas y formando bultos en la superficie. En repetidas ocasiones se observaron trofozoítos entre las células epiteliales, muchas de ellas se desprendieron de la superficie y comenzaron con frecuencia fueron fagocitadas a través de bocas fagocíticas (Fig. 3B).

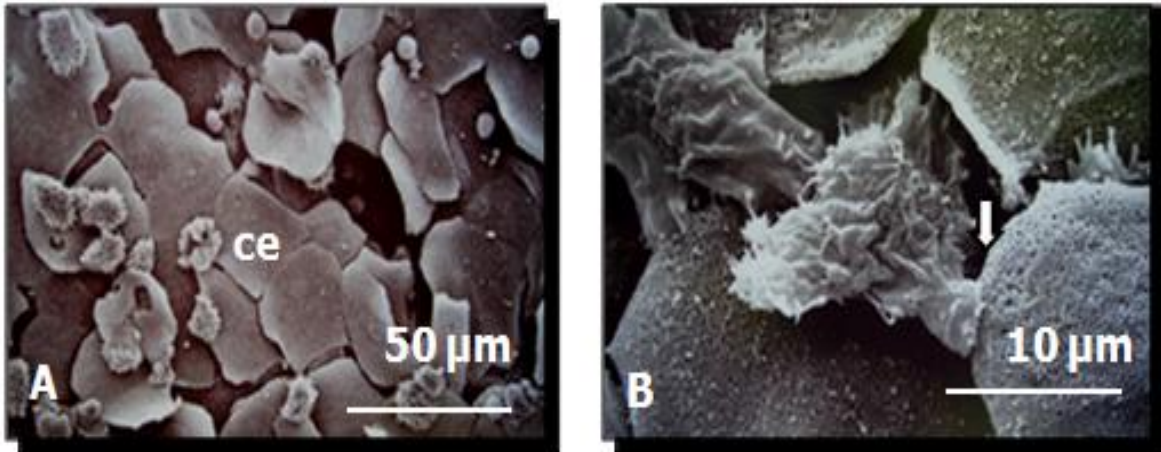


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido. Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* interactuando con córnea humana. (Segunda hora). A) Los trofozoítos (t) han separado y dañado por completo a las células epiteliales (ce). B) Se observan que los trofozoítos se encuentran fagocitando a las células del epitelio con ayuda estructuras que se asemejan a bocas fagocíticas (flecha).

Tercera hora de interacción.

Después de tres horas de interacción se observó daño y desorganización celular en las capas más profundas del epitelio corneal, en donde los trofozoítos penetraron la capa de las células basales y adoptaron una morfología extendida con múltiples acantópodos con los que cubrieron varias células a un mismo tiempo (Fig. 4A).

Durante este tiempo de interacción las amibas continuaron su migración hasta la membrana de Bowman provocando la desorganización de la arquitectura normal de la córnea (Fig. 4B).

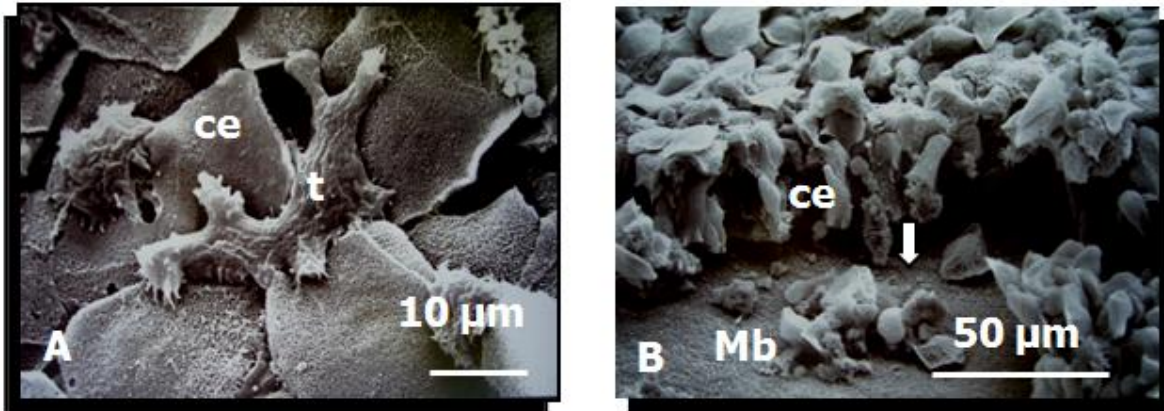


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido. Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* interactuando con córnea humana. (Tercera hora). A) Los trofozoítos adoptan una morfología que se extiende por varias células corneales. **B)** Los trofozoítos (t) fagocitaron y desorganizaron a las células epiteliales y se mantuvieron sobre la membrana de Bowman.

Cabe destacar que se observaron algunas amibas en procesos de división celular sobre la membrana de Bowman, indicando que las amibas se encontraban en perfectas condiciones lo que sugiere que son capaces de sobrevivir y proliferar en el tejido corneal (Fig. 5A).

A lo largo de los tiempos de interacción fue posible observar que los trofozoítos presentaban estructuras semejantes a bocas fagocíticas (Fig. 5B).

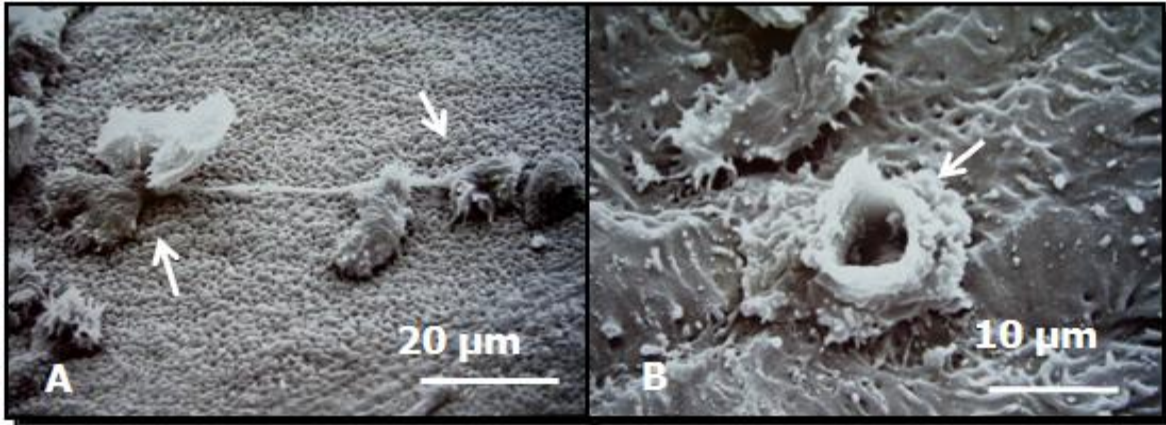


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido. Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* dividiéndose durante la interacción. A) Se observa que las amibas adoptan una forma alargada en el momento de su división por fisión binaria sobre la membrana de Bowman (flecha). **B)** A tres horas de interacción un trofozoíto presenta una estructura semejante a un amebostoma (flecha).

7.4.2. Análisis morfológico a través de microscopía de luz.

Los fragmentos de córneas interaccionadas con *Acanthamoeba castellanii* se procesaron para microscopía electrónica de transmisión sin embargo solo fue posible observar cortes semifinos los cuales se analizaron a través de microscopía de luz en donde se pudo confirmar lo observado con el microscopio electrónico de barrido.

Desde la primera hora de interacción, los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* se adherieron a la superficie corneal y comenzaron a migrar hacia las uniones celulares. En tiempos más largos de interacción (2-3 h) los trofozoítos alcanzaron la membrana de Bowman y fagocitaron las células basales. Durante las interacciones algunos trofozoítos mostraron la morfología clásica amibiana con sus característicos acantópodos y numerosas vacuolas (Fig. 6 A).

Los trofozoítos mantuvieron una morfología clásica como en las placas de cultivo, sin embargo, se observaron diferencias morfológicas solo cuando penetraron a

través de las uniones celulares en donde adoptaron una forma alargada para pasar entre los espacios reducidos (Fig. 6 B).

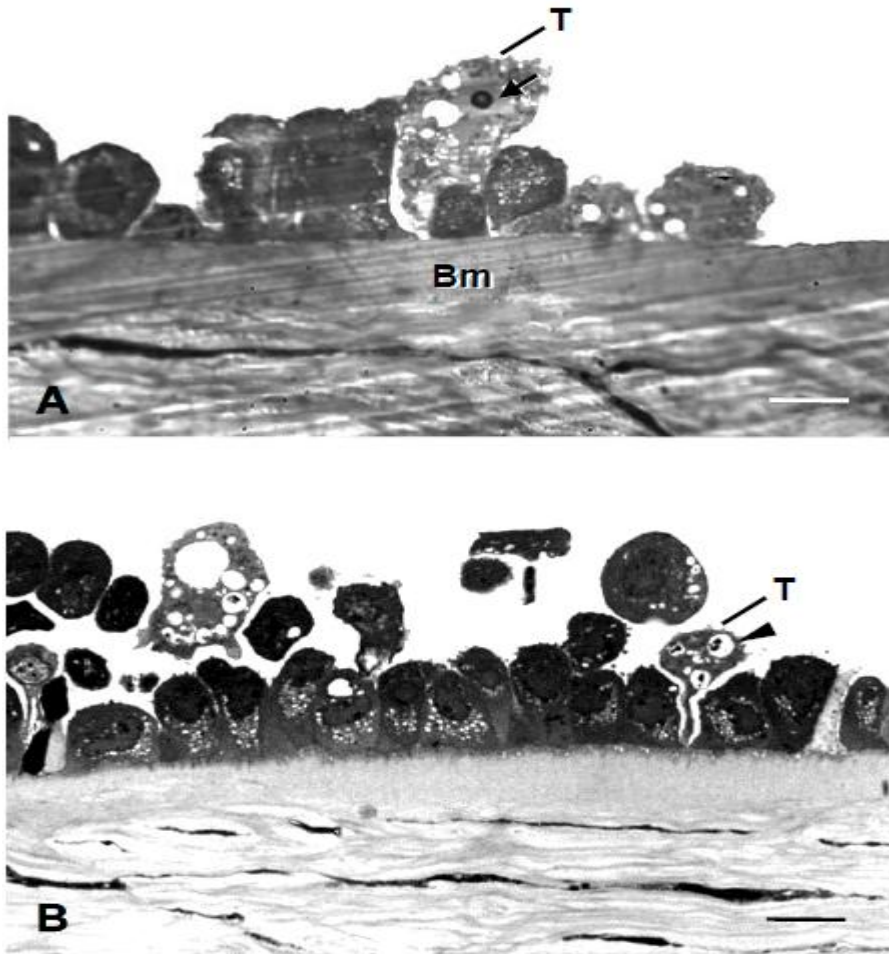


Figura 6. Microscopía de luz 40X. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina en los eventos tempranos de interacción (2, 3 h) entre los trofozoítos de *A. castellanii* con la córnea humana. **A)** los trofozoítos han migrado hacia la membrana de Bowman (Bm). Un trofozoíto (T) se encuentra separando una célula basal de la córnea. Los trofozoítos se observan con su característica morfología, tales como vacuolas contráctiles, un gran núcleo céntrico (flecha) y un nucléolo con cromatina condensada, así como acanthopodos de diferentes tamaños. **B)** un trofozoíto (t) ha cambiado su morfología para ocupar los espacios entre dos de las células basales con el fin de llegar a la membrana de Bowman. Se observa una vacuola digestiva con restos celulares (cabeza de flecha).

7.5. Interacción del medio condicionado de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea humana.

Mediante el análisis de las imágenes obtenidas a través del microscopio electrónico de barrido de la interacción del medio condicionado de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea humana, se pudo observar que la superficie corneal sufre alteraciones en su morfología desde la primera hora, ya que se pueden distinguir la pérdida de las uniones celulares (Fig. 7A). Durante la segunda hora numerosas células se han desprendido del epitelio, además se pudo observar un daño en la superficie corneal (Fig. 7B).

Después de tres horas se pudo observar que la superficie corneal sufrió daño ya que algunas células del epitelio se encontraron totalmente desprendidas de la superficie (Fig. 7C).

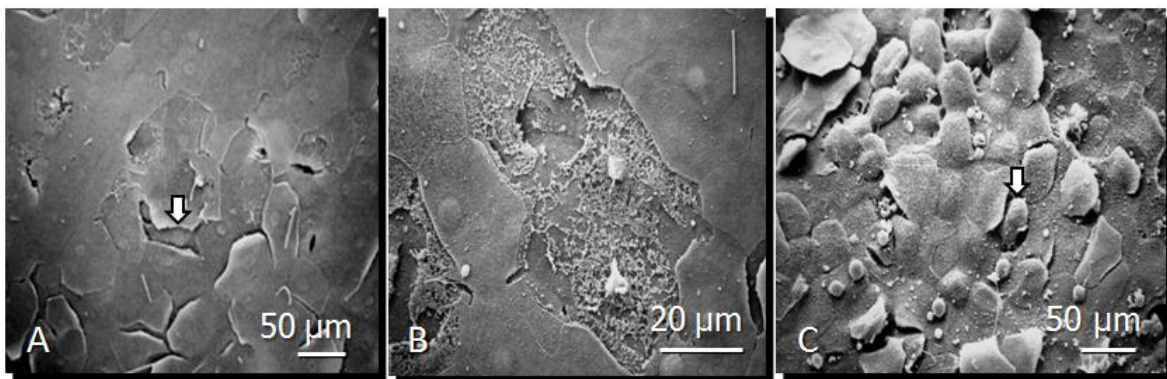


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido. Interacción del medio condicionado con la córnea humana. Se observó daño a las capas más superficiales de la córnea humana proporcional a la hora de interacción. **A)** Durante la primera hora de interacción se observan pequeñas alteraciones en la superficie corneal (flecha). **B)** En la segunda hora de interacción se pueden observar abrasiones e la superficie corneal. **C)** A la tercera hora la pérdida de las uniones celulares es más evidente ya que se observaron células del epitelio corneal parcialmente desprendidas de la superficie (flecha).

8. DISCUSIÓN

La implementación de modelos experimentales en donde se puedan explicar los mecanismos de patogenicidad que llevan a cabo las amibas en la córnea humana es de gran importancia para poder comprender a la queratitis amibiana.

En los últimos años se han implementado distintos modelos experimentales de la QA, utilizando diversas especies de animales como: ratón, rata, hámster chino, conejo y cerdo (Font *et al.*, 1981; Badenoch *et al.*, 1990; Cote *et al.*, 1991; Niederkorn *et al.*, 1992; Quijano *et al.*, en el 2006), en los que se ha tratado de explicar los procesos de daño que llevan a cabo las amibas en la córnea, sin embargo, todos ellos han sido poco significativos ya que no pudieron explicar los procesos tempranos de invasión que llevaron a cabo los trofozoítos sobre la córnea, además de que la forma en la que se efectuó la interacción de las amibas con el tejido corneal no se asemeja a la vía natural de la infección ya que en algunos modelos se indujo una lesión intencional previa de más del 25% de la superficie corneal. Recientemente se propuso al hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*) como un modelo adecuado para el estudio de los eventos tempranos de la QA (Omaña *et al.*, 2004). En dicho trabajo se describieron los mecanismos de patogenicidad que llevaron a cabo dos de las especies más frecuentemente aisladas de casos de QA: *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*, las cuales invadieron y provocaron daño al epitelio corneal intacto. La secuencia de eventos reportados por Omaña *et al.*, 2004, en el modelo de hámster, fue muy similar a lo observado en el presente estudio ya que fue posible demostrar que *Acanthamoeba castellanii* es capaz de invadir y provocar daño en córneas humanas intactas en dos horas y no en 12 como lo reportaron los investigadores antes mencionados. En ambos modelos no hubo necesidad de inducir una lesión corneal previa a la interacción a diferencia de Clarke y Niederkorn *et al.*, 2006 los cuales consideraban que era indispensable la existencia de una lesión en la superficie de la córnea que permitiera la invasión de las amibas. Con lo anterior se comprueba que los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* fueron capaces de provocar un efecto citopático en la córnea humana

sin que un traumatismo sea el requisito previo para que éstos puedan provocar la infección.

A través de la implementación de este modelo experimental, fue posible asegurar que el daño causado a la córnea fue producido por los trofozoítos y su medio condicionado, es decir el medio en el cual son cultivados. Lo anterior es posible asegurarlo ya que se trabajó con una población 100 % en estado trófico con una viabilidad mayor al 98 %, a la cual se le aumentó la virulencia (en un modelo murino de EAG) días previos al momento en que se llevó a cabo la interacción con la córnea humana. A través de la inoculación de las amibas en dicho modelo fue posible corroborar la capacidad invasiva de los trofozoítos, que si bien no provocaron la muerte de los ratones en experimentación, si fue posible su recuperación de diversos órganos como ya fue descrito en los resultados.

Las condiciones en las que se llevaron a cabo las interacciones fueron óptimas. El medio bactocasitona favoreció el crecimiento amibiano y contribuyó a preservar mejor las muestras corneales; no obstante que el medio optisol es utilizado cotidianamente como el ideal para el transporte y conservación de las córneas humanas (Galan *et al.*, 2001), este resultó no ser el mejor para los propósitos de este trabajo, lo cual puede deberse a que se recomienda mantenerlo a 4 °C, por un periodo no mayor de siete días, en el presente estudio se trabajo a 36.5 °C y posiblemente ese factor no favoreció a la córnea.

Mediante el análisis de la interacción de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea humana fue posible observar el proceso de invasión de la amiba, el cual comenzó con la adherencia de los parásitos en la superficie corneal ya sea solos o en grupo, seguido de la migración de los trofozoítos hacia la uniones celulares y la penetración de las capas más superficiales de la córnea desde la primera hora de interacción.

El efecto que provocaron los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* sobre la córnea humana, originó lesiones en toda la córnea y no se limitó a una zona en particular a diferencia de lo reportado por Moore *et al.*, en 1991, los cuales

mencionan que la lesión causada por *Acanthamoeba castellanii* interaccionada por doce horas con la córnea humana se limitó a las zonas cercanas a la esclera y en la parte central del epitelio.

La penetración de uno o varios trofozoítos en las capas subsecuentes de la córnea propicia la formación de numerosas protuberancias las cuales se han reportado por Moore *et al.* en 1991, en el cual los autores no encontraron una explicación, sin embargo Omaña *et al.*, 2004, al igual que en el presente estudio, se encontró que las protuberancias son el resultado de la penetración de uno o numerosos trofozoítos que finalmente desprenden a las células del epitelio corneal. La forma en la cual los trofozoítos se mantienen por debajo de las capas del epitelio puede provocar una elevada dificultad en el diagnóstico de la infección.

Moore *et al.* en 1991, también observaron que durante el proceso de invasión de tejidos, los trofozoítos difieren morfológicamente de amibas que se mantienen en cultivos, sin embargo en el presente estudio se observaron diferencias morfológicas sólo cuando los trofozoítos penetraron a través de las uniones celulares en donde adoptaron formas alargadas.

Los mecanismos de invasión de las amibas hacia el tejido corneal no parecen depender de la cantidad de trofozoítos ya que solos o en grupo fueron capaces de invadir la córnea humana, además de que a lo largo de las interacciones se encontraron amibas en proceso de división lo que sugiere que aumenta el número de trofozoítos durante la infección.

Es probable que los factores de virulencia que permiten la adherencia y la penetración de la amiba en las primeras capas del epitelio, se logren gracias a la combinación de mecanismos dependientes de contacto (adherencia y fagocitosis) y mecanismos independiente de contacto (proteasas extracelulares), reportados por Khan, 2009.

La adherencia de las amibas puede estar mediada por varias proteínas de distinto peso molecular (107 KDa, 136 KDa y 207 KDa) expresada por la superficie de la

amiba las cuales se unen a la manosa de las células del epitelio (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Clarke y Niederkorn, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

Una vez que las amibas se adhieren, el siguiente paso de la infección por *Acanthamoeba* es la fagocitosis. En el presente estudio se observó que la fagocitosis juega un papel importante en los mecanismos de patogenicidad de la amiba ya que las células de la superficie corneal fueron fagocitadas por los trofozoítos, con ayuda de estructuras semejantes a bocas fagocíticas, las cuales se han relacionado en los procesos de ingestión celular (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Omaña-Molina *et al.*, 2004).

Es importante mencionar que en el tiempo máximo de interacción (3 horas) los trofozoítos llegaron hasta la membrana de Bowman provocando una desorganización en la estructura celular a consecuencia del desplazamiento y fagocitosis de las células epiteliales. Durante los tiempos de interacción no se observó migración hacia el estroma, sin embargo se sabe que *Acanthamoeba* es capaz de adherirse e invadir la matriz extracelular (Rocha *et al.*, 2009), y es posible que en tiempos más largos de interacción los trofozoítos sean capaces de invadir el estroma corneal.

De acuerdo a los mecanismos independientes de contacto se encontró que mediante la interacción del medio condicionado con la córnea fue posible observar un daño directo sobre la superficie, proporcional al tiempo de interacción el cual consistió en la desorganización de las células epiteliales atribuible a la presencia de enzimas proteolíticas extracelulares independientes de contacto.

Se ha reportado la presencia de varias enzimas proteolíticas en los medios condicionados de las amibas tales como: serin proteasas, cistein proteasas (Serrano *et al.*, 2005), metaloproteasas, elasteasas (Clarke y Niederkorn, 2006; Khan, 2006), las cuales se relacionan con la inducción de factores de citólisis sobre las células del epitelio.

Consideramos que la actividad enzimática puede facilitar la separación de las células pero no puede destruir el tejido de la córnea ya que mediante la interacción

del medio condicionado con la córnea humana fue posible observar un daño directo sobre la superficie, el cual sólo provocó la separación de las células del epitelio y no explicaría cómo las amibas pueden migrar a través del epitelio e invadir la membrana de Bowman.

Como resultado de nuestras observaciones, proponemos que la migración de los trofozoítos entre las células del epitelio ejerce una fuerza mecánica la cual permite la penetración hacia las capas más profundas de la córnea, lo que explicaría la pérdida de la arquitectura corneal y la invasión de la membrana de Bowman.

9. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que proporciona información más completa sobre los eventos tempranos de los cambios morfológicos que se llevan a cabo durante la interacción de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* con córneas humanas sin daño intencional previo.

El proceso de invasión de *Acanthamoeba castellanii* en la córnea humana comienza con la adherencia de las amibas en la superficie corneal, migración hacia las uniones celulares, penetración hacia capas más profundas de la córnea a través de efecto mecánico y posible participación de enzimática. El proceso de fagocitosis tanto de células del epitelio que no han sido desprendidas como de aquellas que a través del efecto mecánico ya no conforman parte de la arquitectura normal de la córnea, constituye un mecanismo de patogenicidad que debe ser considerado más relevante de lo que había sido estimado anteriormente.

Los hallazgos descritos en este trabajo son semejantes a lo reportado por Omaña-Molina *et al.*, en 2004 en el que se describió la interacción de *Acanthamoeba castellanii* con la córnea de hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*), validando los resultados obtenidos en dicho estudio, por lo que se recomienda modelo del hámster Dorado de Siria como modelo animal de experimentación en futuras investigaciones.

10. PERSPECTIVAS

Se sugiere llevar a cabo interacciones en tiempos más largos para poder evaluar si la amiba es capaz de penetrar hacia las capas más profundas de la córnea y evaluar de manera similar el papel que juegan los quistes en el proceso de invasión. De igual manera sería importante analizar más a fondo la actividad proteolítica que presentó el medio condicionado y conocer los tipos de proteasas que contienen los productos liberados por *Acanthamoeba castellanii*.

11. ANEXO

1. Recuento de células por exclusión del azul de tripano.

El azul de tripano se utiliza para diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no son coloreados debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana. En las células viables el azul de tripano no es absorbido; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio. Debido a que las células son excluidas de la tinción, este método también es llamado Método de tinción por exclusión.

1. Se añaden 90 ml del cultivo amibiano y 10 ml de azul de tripano y se incuba durante 3 minutos. (Nota: tiempos muy largos de exposición al colorante pueden hacer que las células vivas acaben por captar también éste).

3. Recuento celular en un porta objetos se colocan 10 μ l de la mezcla de amibas y azul de tripano, se coloca un cubreobjetos para poder observar al microscópio con objetivo 40 x, posteriormente se realiza un conteo de 100 amibas.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abraham, S. N. y Lawande, R. V. (1982). Incidence of free-living amoeba in the nasal passages of local population in Zaire, Nigeria. *Journal Trop. Med. Hyg.* **85**: 217-222.

Acharya, N. R., Lietman, T. M. y Margolis T. O. (2007). Parasites on the rise: A new epidemic of *Acanthamoeba* keratitis. *American J. Ophthalmol.* **144**: (2) 292-293.

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. y Taylor, M. F. (2005). The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**: 399-451.

Alfieri, S., Correia, C., Motegi, S. y Pral, E. (2000). Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* **66**: 5-10

Alizadeh, H., Neelam, S., Hurt, M. y Niederkorn, J.Y. (2004). Role of contact lens wear, bacterial flora and mannose induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect. Immun.* **73** (2): 1061-1068.

Alizadeh, H., Pidherney, M.S., McCulley, J.P. y Niederkorn, J.Y. (1994). Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free living amoeba. *Infection. Immunity.* **62** (4): 1296-1303.

Allen, S. D., Newsome, A. L. y Powell, D. A. (1992). Isolation and characterisation of free-living amoebae from sputum specimens. VIth International Conference on the Biology and pathogenicity of free-living amoebae. Virginia. EUA.

Alsam S., Sissons, J., Dudley, R. y Khan, N. A. (2005). Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitol.* **96**: 402-409.

Álvarez, R. F., Méndez de la Rosa, R. M., Rivera, A. F., Ramírez, F. E. y Bonilla, L. P. (1995). Síndrome hemofagocítico relacionado con septicemia por amibas de vida libre de la familia *Leptomyxidae*. *Revista de salud del Distrito Federal.* **3**:5-6.

Bacon, A. S., Dart, J. K., Ficker, A. L., Mathison, M. M. y Wright, P. (1993). *Acanthamoeba* keratitis: the value of early diagnosis. *Ophthalmol.* **100**:1238-43.

Badenoch, P. R., Johnson, A. M., Christy, P. E. y Coster, D. J. (1990). Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a *Corynebacterium* in the rat cornea. *Arch. Ophthalmol.* **108**:107-112.

Biddick, C. J., Rogers, L. H. y Brown, T. J. (1984). Viability of pathogenic and non pathogenic free living amoebae in long term storage at a range of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 859-860.

Booton, G.C., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelly, D.J. y Fuerst, P.A. (2005) Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J. Clin. Microbiol.* **43** (4):1689-93.

Bottone, E. J., Madayag, R. M. y Qureshi, M. N. (1992). *Acanthamoeba* keratitis; synergy between amebic and bacterial contaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *Jl. Clinic. Microbiol.* **30** (9):2447-2450.

Bowers, B. y Korn, D. E. (1968). The fine estructure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J. Cell. Biol.* **39**: 95-111.

Byers, J. W. y Sawyer, T. K. (1990). Amoebae isolated from laboratory eyewash stations. *Curr. Microbiol.* **20**: 349-350.

Cao, Z., Jefferson, D. M. y Panjwani, N. (1998). Role of carbohydrate mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *J. Biol. Chem.* **273** (25):15838-15845

Chapell, C. L., Wright, J. A., Coletta, M. y Newsome, A. L. (2001). Standarized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjets. *Clin. Immunol.* **8**: 724-730.

Clarke, D.W. y Niederkorn, J.V. (2006). The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Parasitol.* **22** (4): 175-180.

Clarke, D.W. y Niederkorn, J.Y. (2006). The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbies and Infection.* **8** (5): 1400-14005.

Cohen, E. J., Higgins, S. E., Arentsen, J. J., Eagle, R. C. y Liabson, P. R. (1991). Clinical course of *Acanthamoeba* Keratitis. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 426

Cotê, M. A., Irvine, J. A., Rao, N. A. y Trousdale, M. D. (1991). Evaluation of the rabbit as a model of the *Acanthamoeba* keratitis. *Rev. Infect. Dis.* **13**: s443-s444.

Culbertson, C. G., Smith, J. W., Cohen, H. K. y Minner, J. R. (1959). Experimental infection of mice and monkey by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.* **35** (1): 185-197.

Curtis, F. T., Newsome, A., Culbertson, C. y Stephen, D. A. (1992). Identification of *Acanthamoeba* in broncoalveolar lavage specimens. En memories of VIth. International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae. Virginia EUA.

D'Aversa, G., Stern, G. A. y Driebe, W. T. (1995). Diagnosis and successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Arch. Ophthalmol.* **113** (9):1120-1123.

De Jonckheere, J. F. (1987). Taxonomy, from Amphizoic Amoebae. Human Pathology. Ed por Rondanelli, E. G. Capítulo 2. Puccin. Nuova Libreria. Padua, Italia. 125- 148.

Dendana, F., Sellami, H., Jarraya, F., Sellami, A., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Hachicha, J. y Ayadi, A. (2008). Free-living amoebae (FLA): detection morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an hacmodialysis unit in Tunis. *Parasite.* **15** (2): 137-142.

Derda, M., Hadas, E. y Thiem, B. (2008). Plant extracts as natural amoebicidal agents. *Parasitol.* **104**: 705-708.

Donzin, P. B., Mondino, B. J., Wisman, B. A. y Bruckner, D. A. (1989). Microbial analysis of contact lens care systems contaminated with *Acanthamoeba*. *Am. J. Ophthal.* **108**: 53 -56.

Dyková, I., Lom, J., Schroeder-Diedrich, J. M., Booton, G. C. y Byers, T. J. (1999). *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J. Parasitol.* **85**:1106-1113.

Epstein, R.J., Wilson, L. A., Visvesvara, G. S. y Pollard, E. G. (1986). Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scraping using indirect fluorescent antibody staining. *Arch. Ophthalmol.* **104**:1318-1321.

Font, R. L., Tapert, M. J., Robinson, N. M., Osato, M. S. y Jones, D. B. (1981). An animal model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol.* **20** (1):8.

Fowler, M, Carter, R.F. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp: a preliminary report. *British Medical Journal.* **5464**:740-742.

Galan, E., Rodríguez, P., Campos, R., Ruiz, L., Kouri, J., Guerrero, J., Ponce, V., y Chapa, J. (2001). Preservación de córneas para transplante en medio de cultivo MCB. *Anales Médicos.* **46** (1): 20-25.

González, R. A., Castañon, G., Cristobal, R. A., Lázaro, H. A., Omaña, M. M., Bonilla, R. P. y Martínez, P. A., (2006). *Acanthamoeba castellanii*: Structural basis of the cytopathic mechanisms. *Experimental Parasitology.* **114**: 133-140.

- Gordon, V., Asem, E., Vadkin, M. H. y Mclaughlin, G. L. (1993). *Acanthamoeba* bind to extracellular matrix proteins *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**:658-662.
- Gorlin, A., Wilson, L., y Aheam, D. (1996). Effect of adherence bacteria on the binding of *Acanthamoeba* to hydrogel lenses. *Arch. Ophthalmol.* **114** (5):575-580.
- Gray, T. B., Cursons, R. T., Sherwan, J. F. y Rose, P. R. (1995). *Acanthamoeba*, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br. J. Ophthalmol.* **79** (6): 601-5.
- Gullet, J., Mills, J., Hadley, K., Podemsky, B., Pitts, L. y Gelber, R. (1979). Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. *Am. J. Med.* **67**:891-896.
- Hadas, E. y Masur, T. (1993). Biochemical markers of pathogenicity and virulence of *Acanthamoeba* sp. *Parasitol. Res.* **79** (8): 696-698.
- Hahn, T., O'Brien, T. P., Sah, W. y Kim, J. (1998). Acridine orange staining for rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* **42**(2):108-114.
- He, Y. G., Niederkorn, J. Y., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Silvany, R. y Dougherty, J. (1990). *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthalmol. Vsi. Sci.* **3**: 2235-2240.
- Hernández, L. M. (2002). Determinación de amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* en Lentes de Contacto y Soluciones Preservadoras. Tesis de licenciatura en Biología. UNAM FES Iztacala. México. 56 pp.
- Hernández, M. M. D. (1991). Aislamiento de amibas de vida libre a partir de la atmósfera de la ciudad de México y su área metropolitana. Tesis de licenciatura en Biología. UNAM FES Iztacala. México.
- Hunt, S., Reed, S., Matthews, W. y Torian, B. (1995). Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multi drug therapy. *Cutis.* **56** (5): 285-287.
- Hurt, M., Apte, S., Leher, H., Howard, K., Niederkorn, J. y Alizadeh, H. (2001). Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect. Immun.* **69** (5): 2995.
- Ibrahim, Y. W., Boase, D. L. y Cree, I. A. (2007). Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vsci. Sci.* **84**(3):202-207.

Ishibashi, Y., Matsumoto, Y., Kabata, T., Watanabe, R., Hommura, S., Yasuraoka, K. e Ishii, K. (1990). Oral itraconazole and topical miconazole with debridement for *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* **109**: 121-126.

Jager, B. V. y Stamm, W. P. (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodking's disease. *Lancet ii*: 1343-1345.

Jahnes, W. G. y Fullmer, H. M. (1957). Free living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96** (2): 484-488.

Jaison, P. L., Cao, Z. y Panjwani, N. (1998). Binding of *Acanthamoeba* to mannose-glycoprotein of corneal epithelium effect of injury. *Curr. Eye. Eve. Res*: 770-776.

John, D. T. (1993). Opportunistically pathogenic free-living amoebae. *En: Parasitic Protozoa*. Ed. Por Kenner J. P. y Baker J. R. Academic Press, Nueva York. 240-246.

John, T., Desai, D. y Sahm, D. (1991). Adherence of *Acanthamoeba castellanii* and trophozoites to extended wear soft contact lenses. *Rev. Infect. Dis.* 13 (suppl **5**): 5419-420.

Junes, Ph., Assouline, M., David T., Legeais, J. M., Renard, G., y Pouliquen, Y. (1994). Prospective evaluation of oral itraconazole for the treatment of *Acanthamoeba* and fungal ocular infection. *Invest. Ophthamol. Vis. Sci.* **35** (4): 2284.

Keleti, G. y Sykora, J. L. (1992). The occurrence of free living amoebae in indoor environment. En: memories VIth International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Virginia. EUA.

Kelly, L. D. y Xu, L. (1995). The effect of *Acanthamoeba* concentration on adherence to four types of unworn contact lenses. *CLAO J.* **21**(1): 27-30.

Kenett, M. J. Hook, R. R., Franklin, C. L. y Riley, L. K. (1992). *Acanthamoeba castellanii*: characterization of an adhesion molecule. *Exp. Parasitol.* **92**: 161-169.

Kenney, M. (1971). The micro-kolmer complement fixation test in routine screening for soil amoeba infection. *Health. Lab. Sci.* **8** (1): 510.

Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *Microbiol. Rev.* **30**: 564-595.

Khan, N. A., Mortazavi, P., Alsam, S., Sissons, J., Kim, K.S., Jarroll, E. L. y Goldsworthy, G. (2009). *Acanthamoeba* and blood-brain barrier: the breakthrough.

En: memories XIII International Meeting of Free Living Amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife. Spain.

Kilvington, S., Larkin, D. F., White, D. C. y Beeching J. R. (1990). Laboratory investigations of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Clin. Microbiol.* **28** (12): 2722-2725.

Kim, S. Y., Syms, M. J., Holtel, M. R. y Nauschuetz, K. K. (2000). *Acanthamoeba* sinusitis with subsequent dissemination in AIDS patient. *Ear Nose Throat. J.* **79** (168): 171-174.

Kinnear, F. B., (2004). *Acanthamoeba* pathogenicity for corneal cells. *J. Infection.* **49**: 310-316.

Kremer, Y., Cohen, E. J., Eagle, R. C. Jr., Udell, Y. y Laibson, P. R. (1994). Histopathologic evaluation of stromal inflammation in *Acanthamoeba* keratitis. *CLAO J.* **20** (1): 45-48.

Lares, F. (1990). Biología y aspectos de patogenicidad de *Acanthamoeba*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **32**: 71-88.

Larkin, D. F. (1990). Experimental *Acanthamoeba* keratitis I. Preliminary findings. *Br. J. Ophthalmol.* **74**:551-555.

Latapie, L., Cremona, G., Carrasco, M. Molina, V., Bozzini, J. y Mariano, M. (2003). Queratitis inflamatoria por *Acanthamoeba* spp. análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión. *Parasitol. Latinoam.* **58** (3): 159-165.

Ledee, D., Hay, J., Byers, T., Seal, D. y Kerlees, C. (1996). *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of new corneal pathogen. *Invest. Ophthalmol. Vsi. Sci.* **37**(4):544-550.

Lee, J., Oum, S.B., Choi, Y.H., Yu, S.H. y Lee, S.J. (2007). Cysticidal effect on *Acanthamoeba* and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. *Cornea.* **26** (6): 736-741.

Leher, H., Silvany, R., Alizadeh, H., Huang, J. y Niederkorn, J. Y. (1998). Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* **66**:5-10.

Lema, M.D., Rodriguez, A. M., Gómez, T. M., y Peñalver, D. M. (2001). Adherence of *Acanthamoeba* to unworn conventional and disposable soft contact lenses. *Cornea.* **20** (6): 635-638.

Lewis, E.J. y Sawyer, T. K. (1979). *Acanthamoeba tubiashin* sp., a new species of fresh-water amoeba (*Acanthamoebidae*). *Trans. Am. Micros. Soc.* **98**: 543-549.

Li, S., Shi, W., Xie, L., Wang, J. y Wen, Y. (2002). Retrospective analysis of misdiagnosed amoebic keratitis. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. **38** (1): 21-23.

Limp, M. A. (1990). Is the dry eye contact lens wearers a risk?. *Cornea*. **9**: 48-50.

Lindsay, R.G., Watters, G., Johnson, R., Ormonde, S.E. y Snibson, G. R. (2007). *Acanthamoeba* keratitis and contact lens wear. *J. Clin. Exp. Optom*. **90** (5):351-60

Linquist, T. D., Sher, N. A. y Doughan, D. J. (1998). Clínical signs and medical therapy of early *Acanthamoeba* keratitis, *Arch. Ophthalmol*. **106**:73-77.

Lou, S.Y., Jin, X.Y., Wang, Z.G., Li, R., Yin, X.T., Wang, M. y Sun, X.G. (2008). Ultrastructure study of pathogen of *Acanthamoeba* keratitis. *Institute of Ophthalmology*. **44** (11): 1020-1024.

Magnet, A., Galván, A. L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Pérez, I., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., Da Silva A. J. y Del Aguila, C. (2009). First data on the characterization of environmental isolates of *Acanthamoeba* from the central area of Spain. XIIIth International Meeting of the Biology and pathogenicity of Free Living Amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife. Spain.

Mannis, M. J. (1998). The *Acanthamoeba* epidemic: What we have learn?. *Cornea* **17**(1): 1-2.

Marciano-Cabral F y Cabral, G. (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol*. **16**: 273-307.

Marciano-Cabral, F., Jamerson, M. y Kaneshiro, E. (2009). Identification of amoebae and bacteria in tap water supplied by a municipal water distribution system in the United States. En: memories XIII International Meeting of Free Living Amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife. Spain.

Martínez, A. J. (1993). Free living amebas: Infection of the central nervous system. *Mt. Sinai J. Medical*. **60** (4):271-278.

Martínez, A. J. (1985). Free-living Amebas: Natural Hystory, *Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of disease*. CRC. Eitorial Boca Raton, Florida. 156pp.

Martínez, A.J., (1980) Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection. *Neurology*. **30** :567-574.

Martínez, J. y Visvesvara, G. (1997). Free living amphizoic and opportunistic Amebas. *Brain Pathol*. **7**: 583-598.

Mathers, W., Stevens, G., Rodríguez, M., Chan, C. C., Gold, J., Visvesvara, G. S., Lemp, M. A. y Zimmerman, L. E. (1987). Immunopathology and electron microscopy of *Acanthamoeba keratitis*. *Am. J. Ophthalmol.* **103**:626-635.

Mattana, A., Alberti, L., Delogu, G., Fiori, P.L. y Cappuccinelli, P. (2009). *In vitro* activity of *Acanthamoeba castellanii* on human platelets and erythrocytes. *Infect. Immun.* **77** (2): 733-738.

Mazur, T. y Hadas, E. (1994). The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. *Parasitol.* **805**: 431-434.

Mazur, T., Hadas. y I. Iwanicka. (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop. Med. Parasitol.* **46**:106-108.

McKerrow, J. H. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:821-853.

Mitra, K., Bhagavathiammai, A., Zhou, O., Bobbett, G., McKerrow, J., Chokshi, R., Chokshi, B. y James, E. (1994). Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Exp. Pathol.* **78** (4): 377-385.

Moore, M. B., McCulley, J. P., Newton C., Cobo, L. M. y Foulks, G. N. (1987). *Acanthamoeba keratitis* a growing problem in soft and hard contact lens wearers. *Ophthalmol.* **94**: 1645-1650.

Moore, M., B., Ubelaker, J., Silvany, R., Martin, J., Dougherty, J.M., Meyer, D.R. y McCuelley, J. P. (1991). *In vitro* penetration of human corneal epithelium by *Acanthamoeba castellanii*: A scanning and transmission electron microscopy study. *Córnea.* **10** (4): 291-298.

Morton, L. D., Mc Laughlin, G. L. y Whiteley, H. E. (1991). Effects of temperature, amebic, and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium *in vitro*. *Infect. Immun.* **59** (11): 3819-3822.

Na, B. K., Cho, J. H., Song, C. Y. y Kim, T. S. (2002). Degradation of immunoglobulins, protease inhibitors and interleukin-1 by a secretory proteinase of *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J. Parasitol.* **40** (2): 93-99.

Nagington, J. (1975). Isolation of amoebae from eye infections in England. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* **95**: 207-209.

Martín-Navarro, C. M., Lorenzo-Morales, J., López-Arencibia, A., Valladares, B., Maciver, S. K. y Piñero, J. E. (2009). Cellular and Molecular Effects of Caffeine and Chlorhexidine against *Acanthameba*. En: memories XIII International Meeting of Free Living Amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife. Spain.

- Nieder Korn, J. Y. (2002). The role of innate and adaptative immune responses in *Acanthamoeba keratitis*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **50** (1): 53-59.
- Nieder Korn, J., Ubelaker, J. E., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Mellon, J. A., Silvany, R. E., He, Y., Pidherney, M., Martin, J. H. y Alizadeh, H. (1992). Susceptibility of corneas from various animal species to *in vitro* binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**:104-112.
- Niyyati, M., Morales, L. J., Rezaine, S., Rahimi, F., Mohebbali, M., Maghsood, A. H., Haghi, A. M., Navarro, C. M., Farnia, S., Valladares, B. y Rezaeian, M. (2009). Identification of *Acanthamoeba* genotypes T2, T3, T4, T6 and T11 from clinical and environmental samples in Iran. En: memories XIII International Meeting of Free Living Amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife. Spain.
- Noopur, G. M. S. y Rodhika, T. M. D. (2008). Investigative modalities in infectious keratitis. *Ophthalmol.* **56**: 209-213.
- Omaña, M. M. 1997. Estudio comparativo de 3 cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de Queratitis amibiana en México. Tesis de Maestría en Ciencia. UNAM-FES Cuautitlán. México. 166pp.
- Omaña, M. M., Vanzzini, R. V., Hernández, M. M., Salazar, V. L., y Bonilla, L.P. (2005). First cases of *Acanthamoeba keratitis* in Mexico. XIth International Meeting of the Biology and Pathogenicity of Free Living Amoebae. Ceské Budejovice. Czech Republic. p. 7A.
- Omaña-Molina, M., Navarro-García, F., González-Robles, A., Serrano-Luna, J.J., Campos-Rodríguez, R., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V. y Shibayama, M. (2004). Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea alter *in vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun.* **72**: 3245-51.
- Page F. C. (1988). A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with instructions for culture. *Biological Association, Sci.* Londres. 122 pp.
- Page, F.C. (1976). An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology. Freshwater Biological. Association. Scientific. Londres. 180 pp.
- Panjwani, N., Zhao, Z., Baum, J., Hazlett, L., y Yang, Z. (1997). *Acanthamoeba* bind to rabbit epithelium *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38** (9): 1858-1864.

Park, D. H., Palay, D. A., Sheraz, M. D., Steeling, R. D., Krachmer, J. H., y Holland, E. J. (1997). The role of topical corticosteroids in the management of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. **16** (3): 277-283.

Pearl, M. Visvesvara, G., Martínez, J., Theodore, H., Dagget, P. y Sawyer, K. (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Rev. Inf. Dis.* **12** (3): 490-508.

Pérez, T., Pérez, M., Rodríguez, M. y Moreno, M. (2005). Queratitis en portador de lentes de contacto. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24** (4): 280-282.

Perkovich, T. B., Meisler, M. D., McMahon, T. J. y Rutherford, I. (1991). Adherence of *Acanthamoeba* to soft contact lenses. *Rev. Infect. Dis.* **13** (5): 421-422.

Pidherney, M.S., Alizadeh, H., Stewart, G.L., McCulley, J.P. y Niederkorn, J.Y. (1993). *In vitro* and *in vivo* tumoricidal properties of pathogenic free-living amoeba. *Cancer Lett.* **72** (1-2): 91-98.

Pineda, R., Kocaturk, T. y Bhui, R. D. (2007). Visual outcome and rehabilitation in a case of bilateral *Acanthamoeba* Sclerokeratitis. *Córnea*. **26** (9): 1150-1152.

Pussard, M., y Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida) *Protistol.* **13**: 557-598.

Quijano, B., López, M., Moncada, L. y Moreno, C. (2006). The rabbit as animal model of corneal infection by *Acanthamoeba polyphaga*. *Infection.* **10** (2): 79-84.

Rabinovich, T., Weissman, S. S., Ostler, H. B., Sheppard, J. D. y Teikari, J. (1991). *Acanthamoeba* keratitis: clinical signs and analysis of outcome. *Rev. Infect. Dis.* **13**: s427.

Radford, C. F., Minassian, D. C. y Dart, J. K. (2002). *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: Incidence, outcome and risk factors. *Br. J. Ophthalmol.* **86** (5): 536-542.

Ramachandran, L., Janakiraman, D., Sharma, S. y Rao, G. N. (1997). Effect of time and washing on the adhesion of *Acanthamoeba* to extended wear disposable hydrogel contact lenses. *CLAO J.* **23**: 113-116.

Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V., (1994). Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in México city and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollut.* **74**: 65-87.

Rocha, A. B., Jamerson, M., Cabral, G. A. y Marciano-Cabral. (2009). Interaction between *Acanthamoeba culbertsoni* and host extracellular matrix: analysis of

amoebic adhesion and invasion. En: memories XIII International Meeting of Free Living Amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife. Spain.

Rodríguez, A. I., Castellanos, R. M. A. y Duran, C. J. A. (1998). Queratitis infecciosa. *Medicine*. **7**(102): 4785-4790.

Rodríguez-Zagaroza, S. (1994). Ecology of free-living amoebas. *Crit. Rev. Microbiol.* **20** (3): 225-41.

Rondanelli, E.G. (1987). Infectious Diseases. 1. Amphizoic amoebae Human Pathology. Ed. Piccin Nuova libreria. Padua Italia. 279 pp.

Sawyer, T. K. y Griffin, J. L. (1975). A proposed new family, Acanthamoebidae. fam. (order Amoebidae), for certain cyst-forming filose amoebae. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **94**: 93-98.

Schaumberg, D. A., Snow, K. K. y Dana, M. R. (1998). The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis Where do we stand?. *Cornea*. **17** (1):3-10.

Schuster, F.L. y Visvesvara, G. S. (2004). Free-Living amoebae as opportunistic pathogens of humans and animals. *J. Parasitol.* **34** (9): 1001,1027.

Serrano, L. J., Cervantes, S. I., Calderon, J., Navarro, G. F., Tsutsumi, V. y Shibayama, M. (2005). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiol.* **52**: 16-23.

Sharma, S., Garg, P. y Rao, G. N. (2000). Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* **84**: 1103-1108.

Simmons, P. A., Tomlinson, A. y Seal, D. V. (1998). The role of *Pseudomonas* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **75**: 860-866.

Solarte., Y. Peña, M. y Madera., C. 2006. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colombia Médica*. **37** (1): 74-82.

Ster-Green, J. K., Bailey, T. M., Brandt, F. H., Carr, J. H., Bond, W. W. y Visvesvara, G. S. (1987). *Acanthamoeba* keratitis in soft contact wearers. *J. Am. Med. Assoc.* **258**: 57-60.

Szenási, S., Endo, T., Yagita, K. y Nagy, E. (1998). Isolation, identification and increasing importance of free-living amoebae causing human disease. *J. Med. Microbiol.* **47**: 5-16.

Taenaka, N., Fukuda, M., Hibino, T., Kato, Y., Arimura, E., Ishii, Y. y Shimomura, Y. (2007). Surgical therapies for *Acanthamoeba* keratitis by phototherapeutic keratectomy and deep lamellar keratoplasty. *Cornea*. **26** (7): 876.

Thebpatiphat, N., Hammersmith, K. M., Rocha, F. N., Rapuano, C. J., Ayres, B. D., Leibson, P.R., Eagle, A. C. y Cohen, E. J. (2007). *Acanthamoeba* keratitis a parasite on the rise. *Cornea*. **26** (6): 701-706.

Tu, E. Y., Joslin, C. E., Nijm, L. M., Feder, R. S., Jain, S. y Shoff, M. E. (2009). Polymicrobial keratitis: *Acanthamoeba* and infectious crystalline keratopathy. *J. Ophthalmol.* **148** (1):13-19.

Van Hamme, C., Dumont, M. y Lachapele, M. J. (2001). Cutaneous acanthamebiasis in a lung transplant patient. *Ann. Dermatol. Venereol.* **128**: 1237-1240.

Van Klink, F., Alizadeh, H., He, Y., Mellon, J. A., Silvany, R. E., McCuller, J. P., Niederkorn, J.Y. (1993). The role of contact lenses, trauma and Langerhans cell in a chine hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**: 1937-44.

Van Klink, F., Taylor, W. M., Alizadeh, H., Jager, M. J., Van Roijen, N. y Niederkorn, J. Y. (1996). The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vsi. Sci.* **37**: 1271-1281.

Vemuganti, G. K., Sharma, S., Athmanathan, S. y Garg, P. (2000). Keratocyte loss in *Acanthamoeba* keratitis: phagocytosis, necrosis o apoptosis?. *Indian. J. Ophthalmol.* **48**: 291-294.

Visvesvara, G. S., Sher, J. H. y Kozlowski, P. B. (1991). Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **115**: 21-25.

Visvesvara, G. S., y Shuster, F. L.(1993). *Balamuthia mandrillaris*, N. G. sp., agent of amebic meningoencephalitis in human and other animals. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40** (4): 504-514.

Visvesvara, G. S. y Stehr-Green, J. K. (1990). Epidemiology of free-living ameba infections. *J. Protozool.* **37** (4): 255-335.

Visvesvara, G. S., Martínez, A. J. Shuster, F. L., Leitch, G. J., Wallace, S. V., Sawyer, T. K. y Anderson, M. (1990). Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in human and animals. *J. Clin. Microbiol.* **28** (12): 2750-56.

- Visvesvara, G. S., Moura, H. y Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Immunol. Med. Microbiol.* **50** (1):1-26.
- Vural, A., Polat, Z. A., Topalkara, A., Toker, M. I., Erdogan, H., Arici, M. K. y Cetin, A. (2007). The effect of propolis in experimental *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens.* **33** (6): 329-331.
- Wong, V.W., Chi, S.C. y Lam, D.S. (2007). Good visual outcome after prompt treatment of *Acanthamoeba* keratitis associated with overnight orthokeratology lens wear. *Ophthalmol.* **33** (6): 329-31.
- Yang, Y. F., Matheson, M., Dart, J. L. y Cree, I. A. (2001). Persistence of *Acanthamoeba* antigen following *Acanthamoeba* keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* **85**: 277-280.
- Yang, Z., Cao, Z. y Panjwani, N. (1997). Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: Carbohydrate-mediated host parasite interactions. *Infect. Immun.* **65** (2): 439-450.
- Yeung, E. Y., Huang, S. C. y Tsai, R. J. (2002). *Acanthamoeba* keratitis presenting as dendritic keratitis in a soft contact lens wearer. *Chang. Gung. Med.* **25** (3): 201-206.
- Yu-Guang, H. J., Niederkorn, J. P., McCulley., Stewart, D. R., Silvary, R. y Daugherty, J. (1990). *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**: 2235-2240.
- Zanetti, S., Fioro, P. L., Pinna, A., Usai, S., Carta, F. y Fadda, G. (1995). Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to contact lens disinfecting solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (7): 1596-8.