



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INVASIÓN
SISTÉMICA DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO
Acanthamoeba EN EL MODELO MURINO DE
ENCEFALITIS AMIBIANA GRANULOMATOSA
(EAG)”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A:

ISMAEL CASTELAN RAMÍREZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARITZA A. OMAÑA MOLINA**



**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE
MÉXICO, 2017.**



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ismael y Guadalupe por darme la vida y demostrarme día a día su apoyo y amor incondicional. Por sus consejos, valores, regaños y enseñanzas que han hecho que hoy en día sea un hombre de bien. Por el gran ejemplo que me han dado para ser perseverante y constante para lograr mis objetivos. Gracias por la libertad que me han dado y dejarme volar. Son el gran pilar de todo lo que soy. Esto es dedicado especialmente para ustedes ¡LOS AMO!

A mis hermanos Miriam, Paola, Ricardo por el apoyo incondicional en cada uno de mis propósitos para poder salir adelante. Gracias por su amor y paciencia en este largo camino y por preocuparse por su hermano menor, gracias por compartir su vida conmigo. Este triunfo también es de ustedes ¡Bien hecho equipo!

A todos mis sobrinos, especialmente a Abraham, Abril y Paula, por llegar a alegrar mis días y hacerme el tío más afortunado y feliz del mundo. ¡Son lo máximo!

A mis abuelos, tíos y primos que hicieron que este camino fuera más ameno.

A mis amigos biólogos Diana, Elizabeth, Paulina, Rodrigo, Tania y Yessica por acompañarme en los buenos y malos momentos dentro de mi estancia universitaria. Por compartir sus alegrías y tristezas conmigo. Por su apoyo en todo momento. ¡Los quiero! ¡Esto apenas comienza, colegas!

A mis amigos cuatreros Alanna, Carlos, Karen, Stephanie y Toyo porque a pesar del tiempo y la distancia siguen estando presentes en todo momento.

A mi apreciada UNAM que desde la preparatoria me ha llenado de satisfacciones. Gracias por los recursos necesarios para poder cumplir esta meta.

A la Dra. Maritza Omaña, por aceptar ser mi tutora y compartir sus conocimientos conmigo. Por su entera dedicación y apoyo en este trabajo y por adentrarme en este maravilloso mundo de las amibas. Por sus sabios consejos dentro y fuera del aula.

A la Maestra Dolores Hernández por su apoyo en todo momento en el laboratorio y por ayudarme en mejorar este trabajo.

A la Biol. Miriam Romero por su apoyo en el manejo de los ratones, así como sus observaciones en este trabajo.

Al. Dr. Citlaltepelt Salinas por su ayuda en las observaciones histopatológicas y al técnico Patricia Aley por su ayuda en la técnica histológica.

Al Dr. René Méndez y la Maestra Carmen Álvarez por sus atinados comentarios para el mejoramiento del escrito.

Y todos y cada uno de los que en alguna ocasión compartieron gratos momentos conmigo...

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Antecedentes históricos	1
2	GENERALIDADES DE <i>Acanthamoeba</i> spp.....	3
2.1	Ciclo de vida.....	3
2.1.1	Trofozoíto.....	4
2.1.2	Quiste	4
2.2	Sistemática y taxonomía	5
2.3	Distribución.....	7
2.4	Importancia ecológica.....	8
3	IMPORTANCIA MÉDICA	8
3.1	Endosimbiontes	8
3.1.1	Simbiosis <i>Acanthamoeba</i> -virus	9
3.1.2	Simbiosis <i>Acanthamoeba</i> -bacterias	9
3.1.3	Simbiosis <i>Acanthamoeba</i> -hongos	9
3.1.4	Simbiosis <i>Acanthamoeba</i> -protozoos	10
3.2	Queratitis Amibiana	10
3.3	Encefalitis Amibiana Granulomatosa	10
3.3.1	Epidemiología.....	11
3.3.2	Cuadro clínico	12
3.3.3	Factores de riesgo.....	13
3.3.4	Diagnóstico.....	13
3.3.5	Tratamiento.....	15
3.3.6	Prevención.....	15
3.3.7	Mecanismos de patogenicidad.....	16
3.3.8	Modelos experimentales de EAG.....	17

4	ANTECEDENTES DE TRABAJO	19
5	JUSTIFICACIÓN.....	21
6	OBJETIVOS	22
6.1	Objetivo general.....	22
6.2	Objetivos particulares	22
7	MATERIALES Y MÉTODO	23
7.1	Cepas amibianas.....	23
7.2	Reactivación y mantenimiento de la virulencia de las amibas	23
7.3	Axenización de las cepas.....	24
7.4	Inducción de Encefalitis Amibiana Granulomatosa.....	25
7.5	Inmunohistoquímica	25
7.6	Descripción y comparación.....	26
8	RESULTADOS.....	27
8.1	Reactivación de la virulencia de las amibas.....	27
8.2	Inmunohistoquímica	27
9	DISCUSIÓN.....	33
10	CONCLUSIONES.....	38
11	BIBLIOGRAFÍA.....	39

1 INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos que pueden vivir exitosamente en el medio ambiente. De igual manera, cuatro géneros de ellas son llamadas amibas anfizoicas (ambos lados), debido a su capacidad de infectar al hombre actuando como endoparásitos oportunistas (Page, 1976a). Las especies reportadas con mayor importancia clínica dentro del grupo de las AVL son: *Naegleria fowleri*, agente causal de la Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP), *Balamuthia mandrillaris* y varias especies del género *Acanthamoeba* causantes de Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG), además el género *Acanthamoeba* es capaz de producir infecciones en órganos como riñón, pulmón, corazón, hígado, bazo, piel y ojos, entre las que destacan la Queratitis Amibiana (QA) y la Acanthamebiasis cutánea (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Schuster y Visvesvara, 2004a). Así mismo, recientemente se reportó un caso de Encefalitis Amibiana en el que *Sappinia pedata* fue el agente etiológico de esta patología (Gelman *et al.*, 2001).

Aunque el estudio de todas las amibas anfizoicas es de vital importancia, este trabajo sólo se enfoca en un par de especies del género *Acanthamoeba*; ya que estos protozoos son los que se reportan con mayor incidencia en provocar diversas patología en el humano, siendo *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba castellanii*, las especies más frecuentemente asociadas de casos clínicos.

1.1 Antecedentes históricos

Hasta mediados del siglo XX, las AVL eran consideradas inocuas para el ser humano y sólo comensales para algunos mamíferos; únicamente se tenía registro de *Entamoeba histolytica* como parásitos de humanos. Sin embargo, Derrick en 1948 reportó un caso mortal ocasionado por una infección amibiana diseminada de un soldado japonés, dicha infección se atribuyó al parásito *Iodamoeba bütschlii* (parásito comensal de intestino humano); a este parásito, Kernoham y colaboradores, en 1960 también le atribuyó la muerte de una niña estadounidense de 6 años de edad que presentaba un granuloma cerebral. Tiempo después, dicho parásito fue tipificado correctamente, atribuyendo estas muertes al género *Acanthamoeba* (Martínez y Visvesvara, 1997).

Este género fue observado por primera vez por Castellani en 1930 en un cultivo de *Cryptococcus parrosesus*, y nombrado de dicha manera por Volkonsky en 1931, basándose en la presencia de doble pared en el quiste. Las observaciones de Castellani pasaron desapercibidas hasta que en 1959 Culbertson y colaboradores en una de sus

pruebas de seguridad de la vacuna del polio, observaron la presencia de organismos ameboideos en cultivos celulares de riñón que producían efecto citopático. Con el contenido de dichos cultivos, inocularon a ratones y monos los cuales murieron días posteriores a la inoculación intranasal e intracraneal. Se demostró la presencia de amibas en los cortes histológicos de cerebro, además se demostró su potencial patogénico ya que destruyeron la mucosa nasal, las venas pulmonares, simultáneamente migraron hacia el torrente sanguíneo, invadiendo el riñón, corazón y bazo.

En el sur de Australia, Fowler y Carter en 1965, reportaron cuatro casos de infección en humanos por AVL, en un principio estas amibas fueron identificadas como *Acanthamoeba* spp., sin embargo, tiempo después se tipificaron como amibas del género *Naegleria* que provocaban MAP.

A partir de los años 70's, los diagnósticos fueron más certeros en enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC). En 1971, Kenney reportó una infección cerebral relacionada con el género *Acanthamoeba*; en 1972, Jager y Stamm reportaron un granuloma cerebral en un paciente con linfoma de Hodgkin; en 1973, Robert y Rorke reportan también un caso clínico de un paciente masculino de 58 años de edad que presentó granulomas en el cerebro. En 1980 Martínez, designó esta infección como EAG, para distinguir a las infecciones del SNC causadas por el género *Acanthamoeba* de las causadas por *Neagleria fowleri*.

En 1974 Nagington y colaboradores, reportan los dos primeros casos de QA en U.K. y en el mundo, el primero correspondió a un paciente de 32 años de edad que presentó una ulceración corneal, con mal pronóstico ya que el paciente perdió la vista. El agente causal fue *Acanthamoeba polyphaga*. El segundo caso correspondió a un agricultor con síntomas similares, sin embargo, después de un año se tuvo que extraer quirúrgicamente el ojo, del cual se aisló *Acanthamoeba castellanii*. En 1975, Jones y colaboradores, reportaron otros dos casos de QA causados por *Acanthamoeba polyphaga* en Texas, Estados Unidos. Así mismo en 1979, Gullett y colaboradores reportaron un caso de infección granulomatosa diseminada, con lesiones en piel y la encefalitis focal debido a *Acanthamoeba astronyxis*.

2 GENERALIDADES DE *Acanthamoeba* spp.

2.1 Ciclo de vida

Las amibas del género *Acanthamoeba* son microorganismos aerobios, lo que les permite completar su ciclo biológico en el medio ambiente, alternándose en dos estadios: la forma activa que se alimenta y reproduce por fisión binaria (mitosis), llamada “trofozoíto” y una forma inactiva de resistencia, llamada “quiste” (Gallegos-Neyra, *et al.*, 2014; Cabello-Vílchez, 2015). Bajo condiciones adecuadas, *Acanthamoeba*, puede producir infecciones en el hombre y aunque la forma infectante es el trofozoíto, ambas formas pueden penetrar en el hospedador humano. Según la vía de entrada puede causar diferentes patologías: por vía ocular produce queratitis amibiana, por vía inhalatoria causa neumonía o EAG, o bien por vía cutánea produce acanthamebiasis cutánea. Además de estas vías de entrada puede existir una diseminación hematogena de este protozoo (Figura 1). En el único caso en el que la diseminación hematogena no ha sido descrita es en la QA (Magnet, 2014).

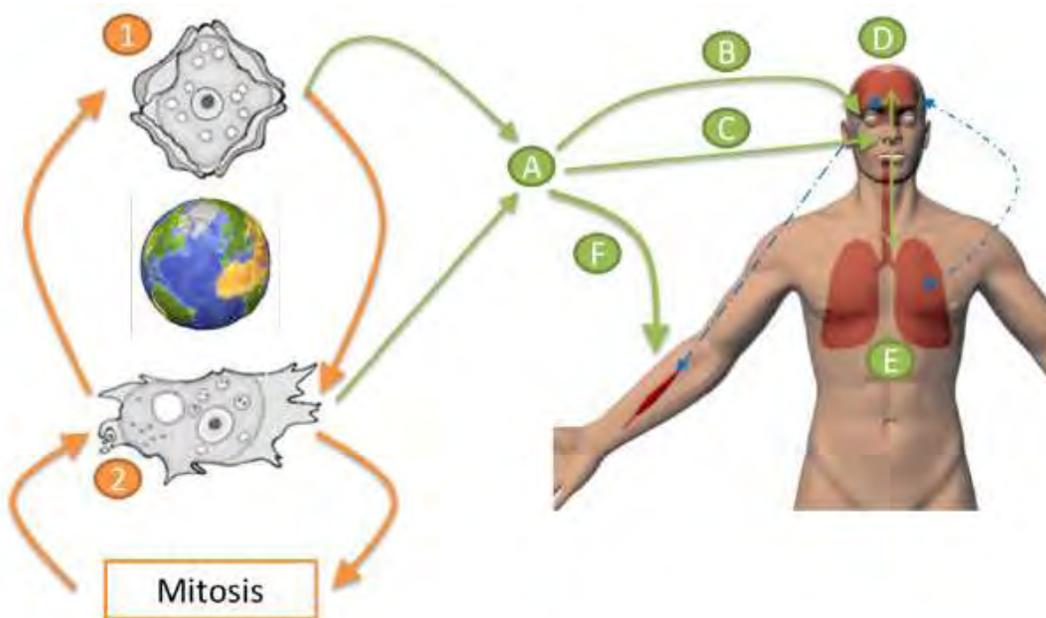


Figura 1. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp: 1: Quiste; 2: Trofozoíto; A: Entrada en el hombre como quiste o trofozoíto; B: Infección ocular: QA C: Inhalación D: EAG E: Neumonía; F: Penetración por piel: Acanthamebiasis cutánea. Las flechas discontinuas representan la posible diseminación hematogena entre los distintos órganos infectados (Magnet, 2014).

2.1.1 Trofozoíto

La morfología del trofozoíto varía en tamaño de 25 a 40 μm según la especie. El citoplasma es finamente granular y contiene numerosas mitocondrias, un complejo de Golgi, ribosomas, microtúbulos y vacuolas alimenticias. Sin embargo, se caracteriza por tener una vacuola contráctil, un solo núcleo y un gran nucléolo central, además de dos tipos de pseudópodos: uno hialino y de gran amplitud llamado lobópodo y otro caracterizado por la emisión de finas proyecciones a lo largo del cuerpo ameboideo, llamados acantópodos (Acantho=espinas) (Figura 2) de los cuales deriva el nombre del género. La función de estos pseudópodos no sólo es la locomoción con movimientos unidireccionales con una velocidad de 0.3-0.4 $\mu\text{m/s}$ sino también la captación de alimentos y adherencia a las superficies (Bowers y Korn, 1968; Marciano-Cabral y Cabral 2003; Trabelsi, *et al.*, 2012; Visvesvara, 2013).

En su fase de vida libre se alimenta por fagocitosis de bacterias, algas, levaduras e inclusive de otros protozoos, aunque también pueden alimentarse por medio de la captación de nutrientes disueltos en el ambiente, a través del proceso de pinocitosis (Castrillon y Orozco, 2013).

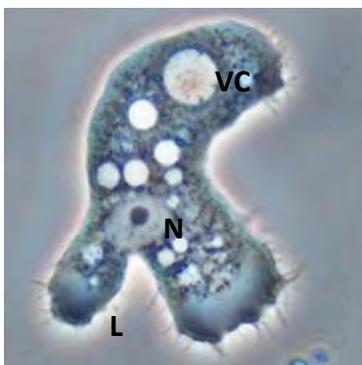


Figura 2. Morfología del trofozoíto de *Acanthamoeba* sp: N. Núcleo; VC. Vacuola contráctil; L. Lobópodo

2.1.2 Quiste

La formación del quiste se induce bajo condiciones ambientales adversas, tales como escases de alimento, desecación y cambios en la temperatura y pH (Chagla y Griffiths, 1974; Bonilla, *et al.*, 1999;). Son resistentes a biocidas, cloración y antibióticos (De Jonckheere y Van de Voorde, 1976; Khunkitti *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*,

2001), sobreviven a bajas temperaturas (0-2°C) y resisten la desecación durante más de 20 años (Brown y Cursons, 1977; Visvesvara *et al.*, 2011).

Los quistes se conforman de una doble pared y varían en tamaño de 10 a 29 µm. La pared externa, el exoquiste, se encuentra corrugado con pliegues y ondulaciones, mientras que la pared interna, el endoquiste, puede ser poligonal, oval, estrellada o esférica (Figura 3). Los poros u ostiolas donde se juntan el exoquiste y el endoquiste están cubiertos por opérculos convexo-cóncavos que, cuando las condiciones ambientales son favorables, se abren para el desenquistamiento. Los quistes también son uninucleados y poseen un nucléolo en posición central (Page, 1967; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Visvesvara *et al.*, 2011; Trabelsi *et al.*, 2012; Cabello-Vílchez, 2015).

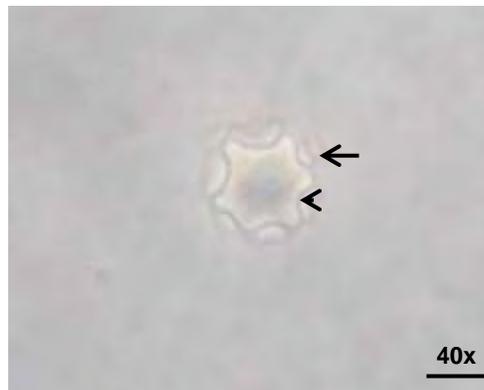


Figura 3. Morfología del quiste. Se observa la doble pared. Endoquiste (cabeza de flecha). EX. Exoquiste de forma estrellada (flecha)

2.2 Sistemática y taxonomía

Durante muchos años la clasificación de las amibas se basó exclusivamente en la observación de caracteres morfológicos, tales como: forma del pseudópodo, tipo de movimiento ameboideo, estructura nuclear, morfología y tamaño del quiste (Griffiths *et al.*, 1978; Gallegos-Neyra *et al.*, 2014). Con estos criterios, se clasificó al género *Acanthamoeba* dentro del Subphylum Sarcodina y la clase Lobosea (Tabla 1A) (Page, 1976b; Martínez y Visvesvara, 1997).

A través de la morfología quística, las especies del género *Acanthamoeba* se organizaron en 3 grupos (Page, 1967; Pussard y Pons, 1977; Trabelsi *et al.*, 2012; Castrillon y Orozco, 2013; Visvesvara, 2013), los cuales se describen a continuación:

1. **Grupo 1:** Incluye a especies caracterizadas por quistes con tamaño mayor a 18 μm ; el endoquiste es de forma estrellada y el exoquiste puede ser liso o rugoso (*A. astronixys*, *A. comandoni*, *A. tubiashi* y *A. echinulata*).
2. **Grupo 2:** Se incluye en este grupo el mayor número de especies de importancia médica con quistes que miden 18 μm o menos; el exoquiste es rugoso, mientras que el endoquiste puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado (*A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. hatchetti*, *A. griffini*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. mauritaniensis*, *A. triangularis*, *A. paradivionensis* y *A. lugdunensis*).
3. **Grupo 3:** Cuenta con un quiste de 18 μm o menos, sin embargo, a diferencia del grupo dos, el exoquiste es delgado y ondulado mientras que el endoquiste es generalmente redondeado (*A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis* y *A. pustulosa*).

No obstante, la clasificación de *Acanthamoeba* basada en características morfológicas ha resultado poco fiable debido a que la morfología de las especies puede cambiar de acuerdo las condiciones de cultivo, es por ello que recientemente la Sociedad Internacional de Protistología abandonó los viejos sistemas de jerarquización y los reemplazó en una nueva clasificación basada en enfoques morfológicos modernos, así como vías bioquímicas y filogenética molecular. A pesar de ello la clasificación por morfología sigue siendo útil para la determinación taxonómica (Castrillon y Orozco, 2013; Visvesvara, 2013).

Hoy en día, el género *Acanthamoeba* se encuentra dentro del Subphylum Lobosa el cual se caracteriza por una locomoción no eruptiva gracias a sus lobópodos (Tabla 1B) (Cavalier-Smith *et al.*, 2016).

Así mismo, se ha empleado una clasificación basada en el análisis de secuencias del gen 18S ARNr para separar las cepas de *Acanthamoeba*. En la actualidad, dicho género está clasificado en 20 genotipos basados en el gen de la subunidad pequeña ribosomal del gen ARN (SSU rDNA o 18S rDNA) que los agrupa en genotipos T1- T20. Cabe resaltar que cada genotipo exhibe 5% o más divergencia de secuencia entre cada linaje (Nuprasert *et al.*, 2010; Siddiqui y Khan, 2012; Castrillón y Orozco, 2013).

Tabla 1. Clasificación taxonómica. A: Clasificación antigua basada únicamente en caracteres morfológicos (Tomado de Page, 1976b). **B:** Clasificación actual basada en caracteres morfológicos y pruebas moleculares (Tomado de Cavalier-Smith *et al.*, 2016).

Reino: Protista (Haeckel, 1860)
 Subreino: Protozoa (Goldfuss, 1818)
 Phylum: Sarcomastigophora (Honigberb y Balamuth, 1963)
 Subphylum: Sarcodina (Schmarda, 1871)
 Superclase: Rhizopodea (Von Siebold, 1845)
 Clase: Lobosea (Carpenter, 1861)
 Subclase: Gymnamoebae (Haeckel, 1862)
 Orden: Amoebida (Kent, 1880)
 Suborden: Acanthapodina (Page, 1976)
 Familia: Acanthamoebidae (Sawyer y Griffin, 1975)
A Género: *Acanthamoeba* (Volkonsky, 1931)

Dominio: Eukarya
 Reino: Protista (Haeckel, 1860)
 Phylum: Amoebozoa (Lühe, 1913)
 Subphylum: Lobosa (Carpenter, 1861, em. Cavalier-Smith, 2009)
 Superclase: Glycopoda (Cavalier-Smith, 2009)
 Clase: Discosea (Cavalier-Smith, 2004)
 Orden: Centramoebida (Rogerson y Patterson, 2002)
 Familia: Acanthamoebidae (Sawyer y Griffin, 1975)
B Género: *Acanthamoeba* (Volkonsky, 1931)

2.3 Distribución

Las especies del género *Acanthamoeba* han sido aisladas de diversos ambientes naturales tales como: agua de mar, sedimentos oceánicos, arena de playa, suelo, lagos de agua dulce y salada, aguas termales, casquetes polares e inclusive del aire. También se han encontrado en estanques de aguas, aguas residuales, acuarios, agua mineral embotellada, botellas de agua destilada, torres de plantas de energías nuclear y eléctrica, bañeras de hidromasaje, conductos de ventilación, humidificadores, aparatos de aire acondicionado, verduras. Así mismo de peces de agua dulce, reptiles, perros, monos, pájaros y en animales muertos. También se han aislado de hospitales, material quirúrgico, piscinas fisioterapéuticas, unidades dentales y de diálisis, lentes de contacto, frotis faríngeos, tejidos pulmonares, lesiones de piel, heces humanas, biopsias de córnea, injertos mandibulares,

líquido cefalorraquídeo y en necropsias de cerebro (Schuster y Visvesvara, 2004a; Visvesvara *et al.*, 2007; Siddiqui y Khan, 2012; Magnet, 2014).

2.4 Importancia ecológica

En el suelo juegan un papel importante dentro del ciclo de nutrientes: los consumidores primarios (bacterias) descomponen directamente materiales orgánicos, pero son ineficaces en la liberación de los minerales de su propia masa. Los descomponedores secundarios, como las AVL, consumen a los descomponedores primarios y estimulan el crecimiento en la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, lo que produce una mayor producción de biomasa vegetal (Sinclair *et al.*, 1981; Fenchel, 1987; Tyndall *et al.*, 1989).

Así mismo la supervivencia de estas amibas en presencia de bacterias está determinada por el tipo y densidad de bacterias, así, bajas densidades de bacterias gram negativas (*Escherichia coli*), parecen favorecer su supervivencia mientras que altas densidades de bacterias inhiben su crecimiento como es el caso de *Pseudomonas* (Wang y Ahearn, 1997).

3 IMPORTANCIA MÉDICA

Las amibas del género *Acanthamoeba* son capaces de producir infecciones sistémicas en diferentes órganos del ser humano, sin embargo, las enfermedades con mayor relevancia clínica son: la QA, la EAG y la acanthamebiasis cutánea o difusa. Aunque estas infecciones no representan un problema de salud pública, sí son de importancia clínica ya que generalmente no son consideradas en los diagnósticos diferenciales iniciales y los tratamientos para erradicarlas no han resultado ser efectivos en la mayoría de los casos (Martínez y Visvesvara, 1997). Además, se ha reportado que establecen relaciones simbióticas con otros microorganismos, actuando como un vector (“Caballo de Troya”) (Magnet, 2014).

3.1 Endosimbiontes

Existen numerosas evidencias de la interacción de *Acanthamoeba* con otros agentes microscópicos como virus, bacterias, hongos e incluso protozoos. Esta interacción puede ser simplemente simbiótica o llevar a cabo la destrucción de *Acanthamoeba* o del otro organismo (Magnet, 2014).

3.1.1 Simbiosis *Acanthamoeba*-virus

Se ha descrito que los trofozoitos de *Acanthamoeba* spp. actúan como reservorio y vector de Adenovirus, Mimivirus y Enterovirus. Los adenovirus (400nm), responsables de infecciones entéricas, respiratorias y oculares en el ser humano, han sido encontrados en el citoplasma de los trofozoitos (Schied y Schwarzenberger, 2012). Así mismo, se reporta que el quiste es resistente a los virus, sin embargo, los Mimivirus pueden encontrarse en el citoplasma del trofozito e inhibir el enquistamiento de este. Aunque estos virus no son agentes causales de enfermedades en el humano, se sospecha que pueden actuar como posibles co-agentes en las infecciones por *Acanthamoeba* (Khan, 2009a; Rodrigues *et al.*, 2016).

El enterovirus Coxsackie, agente causal de meningitis, miocarditis y otras infecciones en el hombre, es capaz de sobrevivir en el interior de *Acanthamoeba* tanto en su forma quística como de trofozoito. Cuando *Acanthamoeba* entra en contacto con los macrófagos humanos, puede liberar a estos virus favoreciendo así su transmisión (Mattana *et al.*, 2006).

3.1.2 Simbiosis *Acanthamoeba*-bacterias

Aunque las AVL son uno de los principales organismos reguladores de poblaciones de bacterias, se ha reportado que no todas las bacterias pueden ser ingeridas y digeridas por estos protozoos, algunas escapan de la ingestión por un gran número de razones, incluido su tamaño celular. Algunas son ingeridas, pero han desarrollado estrategias para evadir la digestión e incluso multiplicarse dentro de los protozoos (presencia de toxinas, pigmentos tóxicos, u otras estrategias propias de la pared bacteriana) los ejemplos más claros son *Legionella pneumophila*, causante de la enfermedad del legionario o neumonía y *Staphylococcus aureus* causante de un gran número de enfermedades (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Huws *et al.*, 2008).

3.1.3 Simbiosis *Acanthamoeba*-hongos

Steenbergen y colaboradores en el 2001 demostraron la supervivencia y reproducción de *Cryptococcus neoformans*, causante de neumonías y meningitis, en el interior de *Acanthamoeba*, sugiriendo que las características que contribuyen a la virulencia del hongo en mamíferos, son las mismas que ayudan a la supervivencia dentro de la amiba. Se ha reportado que los hongos causantes de enfermedades en humanos; *Blastomyces*

dermatitidis, *Sporothrix schenckii*, e *Histoplasma capsulatum* provocan la muerte de las amibas, favoreciendo el crecimiento de los hongos (Steenbergen, *et al.*, 2004).

3.1.4 Simbiosis *Acanthamoeba*-protozoos

Se ha descrito, en ensayos *in vitro*, la capacidad del trofozoíto de *Acanthamoeba* de fagocitar hasta 6 ooquistes de *Cryptosporidium* y de eliminarlos lentamente al medio. Aunque no hay evidencias de que este fenómeno se produzca en la naturaleza, las amibas podrían desempeñar un papel importante en la trasmisión de la criptosporidiosis (Gómez-Couso *et al.*, 2007).

3.2 Queratitis Amibiana

Corresponde a un proceso inflamatorio crónico activo producido por diferentes especies del género *Acanthamoeba*, que afecta a la córnea (Oddó, 2006). Se caracteriza por ser dolorosa e invalidante. El cuadro clínico en sus inicios se caracteriza por que el paciente sufre enrojecimiento, lagrimeo, fotofobia y dolor de diversa intensidad, así como visión borrosa. Al progresar la enfermedad, puede observarse ulceración, infiltrados anulares, placas endoteliales y uveítis anterior, con o sin hipopión (presencia de pus en la cámara anterior del ojo), y más infrecuentemente, edema corneal. Si el curso se agrava, pueden producirse abscesos, escleritis, glaucoma, catarata e infección microbiana secundaria (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Cabello-Vílchez, 2015).

La QA ha comenzado a constituir una infección importante, especialmente en individuos inmunocompetentes que usan lentes de contacto, particularmente blandos. Sin embargo, también está asociado con traumas corneales (Oddó, 2006; Visvesvara, 2007).

Es una enfermedad difícil de tratar y de diagnosticar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de la queratitis herpética, fúngica o micobacteriana, lo que ocasiona que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen muchos meses (Cabello-Vílchez, 2015).

3.3 Encefalitis Amibiana Granulomatosa

La EAG es una enfermedad causada por la invasión de *Acanthamoeba* spp. al SNC; corresponde a una encefalitis focal o difusa necrosante y hemorrágica aguda, subaguda o crónica y con signos de irritación meníngea, la cual se manifiesta entre 7 a 120 días después

de su invasión. Estos protozoos afectan, naturalmente, a pacientes debilitados, desnutridos, diversos tipos de inmunocomprometidos y niños pequeños. Algunos pacientes tienen, simultáneamente, lesiones cutáneas ulceradas (*Acanthamebiasis cutánea*) o infecciones diseminadas en otros órganos (invasiones sistémicas) (Oddó, 2006).

3.3.1 Epidemiología

Aunque las infecciones producidas por amibas de este género se consideran raras, se han reportado en todo el mundo, la mayor parte de los reportes proceden de países desarrollados como Australia, Estados Unidos, Gran Bretaña, Nueva Zelanda y en menor número de la India, países de África, Perú y México (Bonilla, *et al.*, 2004). Esto se puede deber a que en los países desarrollados se toma en consideración a las amibas en los diagnósticos presuntivos, más que por una elevada incidencia que pueda haber en éstos (John, 1993).

Las cifras mundiales de la prevalencia de las patologías causadas por las amibas del género *Acanthamoeba* no son exactas y no están actualizadas; desde su descubrimiento hasta el año 2000, se habían reportado más de 3000 casos de QA y aproximadamente 200 casos de EAG, 3 de los cuales han sido diagnosticados en México, sin embargo, debido a problemas de identificación, es muy probable que la infección se encuentre subdiagnosticada (Schuster y Visvesara, 2004; Trabelsi, *et al.*, 2012).

De acuerdo con cifras tomadas de la Dirección General de Información en Salud, desde 1998 hasta 2014 en México se han registrado aproximadamente 100 muertes por Encefalitis no específicas y aproximadamente 40 muertes por Encefalitis Aguda Diseminada. Los agentes causales no son especificados debido a que no fueron diagnosticados correctamente y en ninguno de los casos se realizó autopsia. Sin embargo, cabe resaltar que las estadísticas de mortalidad por Encefalitis viral, bacteriana y micótica son claras y específicas para cada una de las enfermedades.

Del total de especies descritas para el género *Acanthamoeba*, sólo cinco han sido asociadas a infecciones sistémicas en el hombre: *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. hatchetti* y *A. healyi* (Schuster y Visvesvara, 2004b) y la mayoría de las infecciones en humanos debido a *Acanthamoeba* se han asociado con los aislados del genotipo T4. Por ejemplo, más del 90% de los casos de QA se han relacionado con este genotipo. Del mismo modo, T4 ha sido el principal genotipo asociado con las infecciones cutáneas y del SNC como EAG. En la actualidad, no está claro por qué los aislados T4 son

más abundantes en las infecciones humanas, pero es probablemente debido a su mayor virulencia y propiedades que mejoran su transmisibilidad, así como su susceptibilidad reducida a los agentes quimioterapéuticos (Siddiqui y Khan, 2012)

3.3.2 Cuadro clínico

Las manifestaciones clínicas dependen del espacio que ocupa una lesión, con los consiguientes signos de aumento de la presión intracraneana y en algunos casos parálisis del tercer y sexto nervio craneal. Los síntomas más comunes son anormalidades del estado mental, letargo, cefalea, hemiparesias y coma. La fiebre está presente en cerca de la mitad de los casos y, en un menor grado, náuseas, vómitos, anorexia, ataxia, y afasia. (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Oddó, 2006; Visvesvara, 2013). Los pacientes presentan lesiones hemorrágicas necrosantes o lesiones cerebrales vistas por medio de neuroimágenes (Figura 4) (Kulsoom *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que en ocasiones hay aparición de úlceras en la piel producidas por *Acanthamoeba* que, de acuerdo con algunos autores, puede ser una manifestación de una infección por dicho protozoo en otro órgano que se ha diseminado por vía hematogena o bien, puede ser el primer foco de la infección y de ahí diseminar a otros órganos. (Friedland *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1993; Murakawa *et al.*, 1995; Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Así, la Acanthamebiasis cutánea se caracteriza por la aparición de úlceras en la piel o nódulos eritematosos. En los primeros estadios de la infección aparecen pápulas con secreción purulenta que desemboca en úlceras endurecidas que no cicatrizan (Marciano-Cabral y Cabral, 2003, Paltiel *et al.*, 2004).

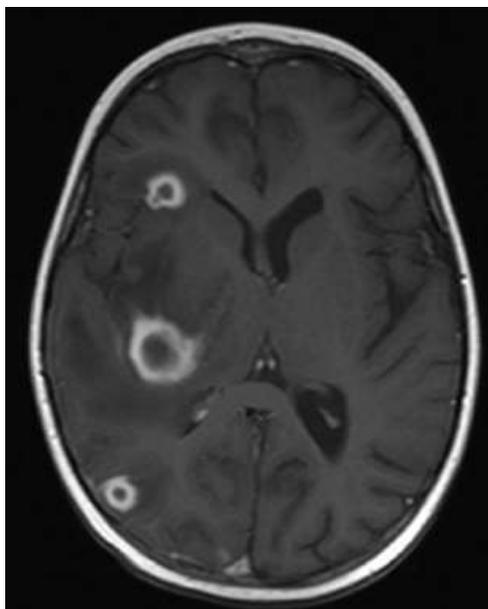


Figura 4. Neuroimagen de un paciente con EAG. Se observan lesiones multifocales (Maritschnegg *et al.*, 2011).

3.3.3 Factores de riesgo

La EAG se ha diagnosticado en niños y adultos sanos, sin embargo, no sólo existen factores que predisponen a la infección tales como el alcoholismo, drogadicción, tratamiento con esteroides, quimioterapia antitumoral, radioterapia o trasplante de órganos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003) sino también es asociada con personas que ya tienen enfermedades subyacentes como tumores malignos, lupus eritematoso sistémico, fallas renales, cirrosis, tuberculosis, úlceras de piel, Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA), enfermedad de Hodking, diabetes, pneumonitis (Jager y Stamm, 1972; Martinez, 1982; Harwood *et al.*, 1988; Feingold *et al.*, 1998, Koide *et al.*, 1998; Visvesvara, 2013).

3.3.4 Diagnóstico

En pacientes con signos clínicos en el SNC, el diagnóstico de acanthamebiasis puede incluir microscopía directa de preparaciones en fresco del líquido cefalorraquídeo (LCR) o frotis teñidos de éste. Sin embargo, la punción lumbar puede contraindicarse debido a la presión intracraneal, por lo cual la obtención del LCR resulta imposible (Callicott, 1968; Lalitha *et al.*, 1985; Ma *et al.*, 2003). Así mismo, se han llevado a cabo tomografías computarizadas y resonancias magnéticas, no obstante, se ha demostrado que mientras

unos pacientes pueden tener lesiones, en otras tantas personas, dichas lesiones no son visibles, por lo cual el diagnóstico no es preciso (Kidney y Kim, 1998; Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

El cultivo *in vitro* de *Acanthamoeba* aislada de tejido cerebral, LCR o de lesiones cutáneas en placas de agar NNE enriquecido con *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* puede ser de gran ayuda. (Martínez y Visvesvara, 1991). Así mismos tejidos infectados teñidos con diferentes colorantes, al igual que las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa pueden ayudar para distinguir trofozoítos y quistes (Martínez y Visvesvara, 1997; Teknos *et al.*, 2000; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Bloch y Schuster, 2005).

Las técnicas moleculares como el PCR y PCR en tiempo real también han sido utilizadas para identificar a estas amibas en LCR, cerebro, piel y tejido corneal (Bloch y Schuster, 2005).

Sin embargo, a pesar de contar con diversas técnicas diagnósticas, la mayoría de las veces, la identificación se realiza *post-mortem*, no solo porque las enfermedades por *Acanthamoeba* pueden confundirse con infecciones víricas, micóticas o bacterianas, sino también porque no son conocidas por los médicos tratantes (Visvesvara, 2013).

3.3.4.1 Histopatología de las infecciones por *Acanthamoeba*

Las características patológicas que se obtienen de la observación de secciones del SNC después de la autopsia son: edemas, necrosis hemorrágicas e inflamación graves (Figura 5). Lesiones multifocales están presentes en el cerebro medio, tallo del cerebro, cuerpo calloso y cerebelo. Exudados crónicos inflamatorios son observados en la corteza cerebral y se compone principalmente de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, además de numerosos trofozoitos dentro del tejido. Personas inmunodeficientes no desarrollan granulomas en el cerebro, aunque es muy común verlos en personas inmunocompetentes, lo cual se puede interpretar como el deterioro del sistema inmune. Además, se ha reportado su presencia en tejidos subcutáneos y piel, hígado, pulmones, riñones, glándulas suprarrenales, páncreas, próstata, ganglios linfáticos y miometrio, lo que sugiere una diseminación hematógena pre-mortem de trofozoítos y quistes. (Martínez y Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Khan, 2009a; Visvesvara, 2013).

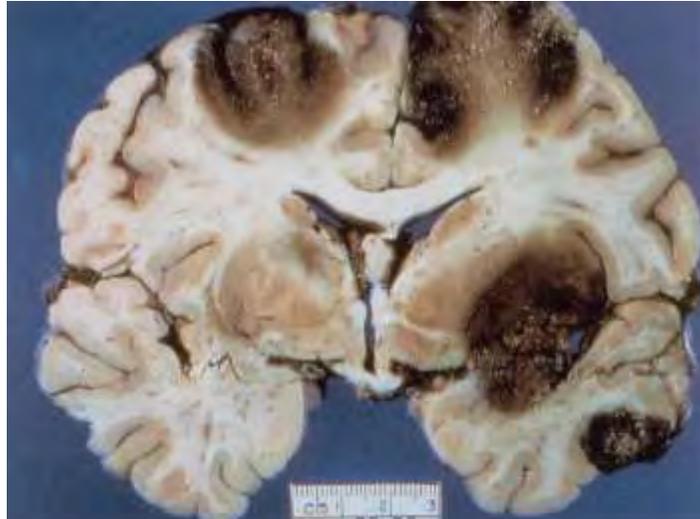


Figura 5. Histopatología de cerebro. Sección coronal de los hemisferios cerebrales con necrosis cortical y subcortical de un caso humano mortal de EAG (Marciano-Cabral y Cabral, 2003)

3.3.5 Tratamiento

Se han utilizado varios agentes terapéuticos en pacientes diagnosticados con alguna infección por *Acanthamoeba*: Antibióticos: Cotrimoxazol (Trimetiprima/Suldametoxazol), sulfadiazina, levofloxacino y azitromicina. Antimicóticos: Ketoconazol, fluconazol, flucitosina e itraconazol. Antimicobacterianos: Clorhexidina, rifampicina y anfotericina B. Antiprotozoarios: Pentamidina, miltefosina y metronidazol. Se han reportado casos donde la combinación de varios medicamentos tuvo un resultado positivo (Tabla 2). Sin embargo, el diagnóstico tardío, los efectos adversos de la terapia antimicrobiana y los problemas inherentes al huésped inmunocomprometido, hacen un mal pronóstico para los pacientes (Visvesvara *et al.*, 2007).

3.3.6 Prevención

Las amibas anfizoicas se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del planeta, así que es factible entrar en contacto con ellas en cualquier tipo de medio, a pesar de este riesgo, no hay métodos definidos para la prevención de la EAG causada por estas amibas (Visvesvara, 2013).

Tabla 2. Tratamiento de pacientes que sobrevivieron a infecciones por *Acanthamoeba* spp.

P: Paciente **AN:** Antecedente. **E:** Edad (Años) **T:** Tratamiento. **R:** Referencia.

P	AN	T	R
1	Trasplante de pulmón	Anfolericina B, pentamidina, flucitosina, clorhexidina/ ketaconazol (crema), azitromicina e itraconazol	Oliva <i>et al.</i> , 1999
2	SIDA	Sulfadiazina y fluconazol	Sejio <i>et al.</i> , 2000
3	Inmunocompetente	Cotrimoxazol, ketaconazol y rifampicina	Singhal <i>et al.</i> , 2001
4	SIDA	Pentamidina, levofloxacino, flucitosina, anfolericina B, rifampicina e itroconazol	Rivera y Padhya, 2002
5	Diabetes	Fluconazol, rifampicina, metronidazol y sulfadiazina	Petry <i>et al.</i> , 2006
6	Trasplante de hígado, tuberculosis y diabetes	Cotrimoxazol y rifampicina	Fung <i>et al.</i> , 2008
7	Inmunocompetente	Cotrimoxazol, ketaconazol y rifampicina	Saxena <i>et al.</i> , 2009
8	Leucemia Linfoblástica Aguda	Cotrimoxazol, fluconazol, pentamidina y miltefosina	Maritschnegg <i>et al.</i> , 2011
9	Inmunocompetente	Cotrimoxazol, fluconazol y rifampicina	Khanna <i>et al.</i> , 2014

3.3.7 Mecanismos de patogenicidad

Varias líneas de evidencia sugieren que las amibas invaden los pulmones/piel y obtienen acceso al espacio intravascular, seguido por una diseminación hematológica, lo que lleva a las interacciones con otros órganos y la barrera hematoencefálica y finalmente la invasión del sistema nervioso central (CNS) para inducir la enfermedad (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007). Tras la adquisición del agente infeccioso, hay factores directos y factores indirectos que juegan papeles importantes en la invasión de amibas (Figura 6) (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Khan, 2006, 2009a; Siddiqui y Khan, 2012). El primer paso es la adhesión a las células mediante la producción de la proteína de unión a

manosa y la proteína de unión a laminina (Siddiqui y Khan, 2012). Dicha adhesión da lugar a pasos secundarios como la fagocitosis y la producción de compuestos que tienen como resultado la activación de la apoptosis (Sissons *et al.*, 2005). Así mismo, la producción de fosfolipasas (Victoria y Korn, 1975; Cursons *et al.*, 1978) y de proteasas las cuales se pensaban que también participaban en la destrucción celular (Khan, 2006), sin embargo, se ha sugerido que las proteasas ayudan a la separación celular mas no a la destrucción (Omaña-Molina *et al.*, 2013). Aunque se ha reportado la participación de otras enzimas, aún no se saben con exactitud sus mecanismos de acción (Siddiqui, 2012). Otros factores no dependientes de *Acanthamoeba* son de gran ayuda como la ubicuidad, ya que entre mayor sea esta, mayor será la probabilidad de infectarse (Khan, 2006), es así como las biopelículas, encontradas en diferentes dispositivos y equipos médicos, se convierten en un lugar idóneo para el crecimiento de *Acanthamoeba* (Zegans *et al.*, 2002).

La virulencia de las cepas puede verse influenciada por la tolerancia a temperaturas altas, alta osmolaridad (Walochnick *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002) y a un rango de pH entre 4-12 (Khan, 2006). *Acanthamoeba* puede continuar su invasión al hospedero debido a la resistencia a la acción de fármacos (Turner *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001) aunado a factores del huésped como enfermedades primarias (Khan, 2006).

3.3.8 Modelos experimentales de EAG

Para llevar a cabo estudios *in vivo* se han utilizado ratones, monos (Culbertson *et al.*, 1959) y langostas (Khan, 2009b) sin embargo, los ratones son ampliamente usados en el estudio de EAG, ya que se ha mostrado que cuando se inocula en ratón, las amibas invaden el SNC, pero también pulmones, riñones, corazón y causan cambios significativos en esos órganos (Khan, 2009a).

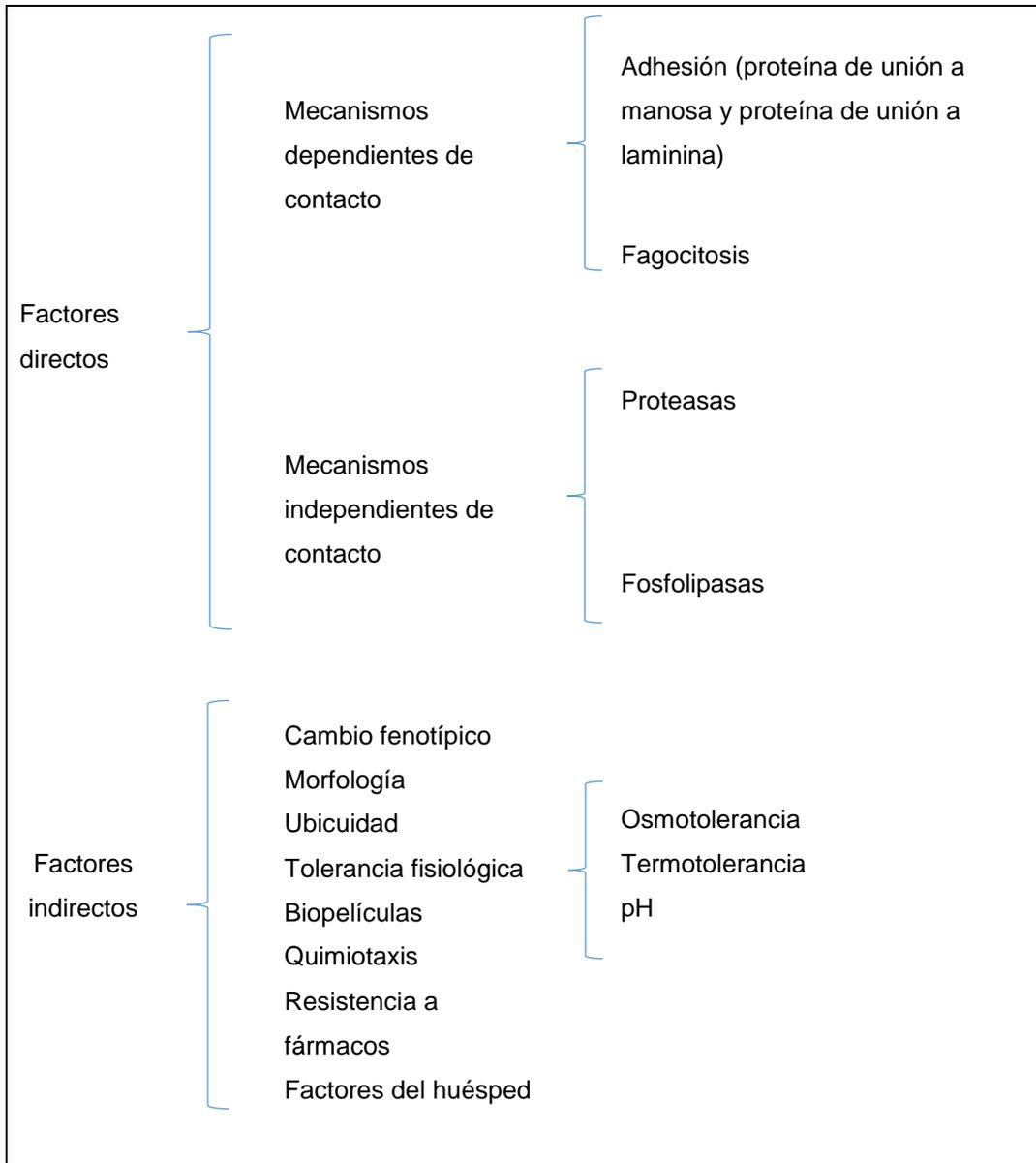


Figura 6. Factores directos e indirectos de la patogénesis de *Acanthamoeba* (Khan, 2006).

4 ANTECEDENTES DE TRABAJO

Desde su descubrimiento, se han realizado diferentes investigaciones para demostrar el potencial patógeno de *Acanthamoeba*, llevando a cabo el modelo experimental propuesto por Culbertson *et al.*, 1959. A pesar de ello, pocas son las publicaciones en dónde describen los procesos histopatológicos que provoca este género y, estos trabajos, son enfocados principalmente al SNC y meato nasal, además son realizados en periodos prolongados de tiempo, 5-24 días (Martínez *et al.*, 1975) hasta 6 meses (Culbertson 1966).

Se cuenta con dos publicaciones en las que se describe la invasión sistémica de *Acanthamoeba*. La primera, realizada por Górnik y Kuzna-Grygiel (2005) en la cual se infectó intranasalmente a ratones de dos semanas de edad con 6 diferentes cepas a determinados tiempos (3-14 días), reportando que una de ellas fue la más virulenta recuperándose de todos los órganos en estudio (cerebro, pulmón, hígado, riñón, corazón y bazo) sin embargo, otra cepa fue la más virulenta, ya que las afecciones provocadas por dicha cepa fueron muy graves. En los pulmones se localizaron amibas en los alveolos, en espacios perivasculares y en las paredes y luz de los bronquios y bronquiolos. Así mismo se observó daños en la pared vascular y extravascular en el parénquima y la luz alveolar, además hiperplasia epitelial en los bronquios y bronquiolos. Focos necróticos, inmensos abscesos y espesamiento de las paredes alveolares fueron muy notorios.

Además, en hígado se observaron amplias zonas necróticas con infiltraciones inflamatorias, así como en riñón específicamente en los túbulos renales y en las cápsulas de Bowman, además de zonas hemorrágicas e inflamación en la parte cortical y por último en el bazo se describió una hiperplasia de la pulpa blanca alrededor de las arteriolas.

En la segunda publicación (Alves *et al.*, 2016) evaluaron dos vías de inoculación, una intracraneal y otra intraperitoneal con 1×10^4 trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*. En los ratones con la primera vía de inoculación se recuperó la cepa del cerebro y fueron positivos a la histopatología, por otro lado, ratones con inoculación vía intraperitoneal se recuperó la cepa de bazo e hígado y la histopatología fue positiva para bazo, hígado, pulmón y cerebro.

Es importante mencionar que se han realizado diversos trabajos en tiempos tempranos de interacción enfocados en el modelo *in vitro* de QA con grandes aportaciones: Se han realizado interacciones de trofozoítos con córnea de hámster Dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*) (Omaña-Molina *et al.*, 2004; Omaña-Molina *et al.*, 2013) en córnea humana (Omaña-Molina *et al.*, 2010) y en cultivos MDCK (González-Robles *et al.*, 2006;

Omaña-Molina *et al.*, 2013) en dichos trabajos se describe mecanismos de patogenicidad similares. Omaña-Molina y colaboradores en 2013, describen la invasión de trofozoítos de *Acanthamoeba* la cual inicia con la adherencia al epitelio, seguida de la migración hacia las uniones celulares y penetración hacia capas profundas, fagocitando y alterando su arquitectura, lo que sugiere mecanismos dependientes de contacto que la facilitan. A pesar de estos avances, se desconocen los procesos que se llevan a cabo al inicio de la infección.

5 JUSTIFICACIÓN

Las patologías provocadas por amibas del género *Acanthamoeba* se diagnostican por estudios post-mortem en la mayoría de los casos ya que se confunden con otras patologías, debido al desconocimiento y poca difusión de dichas enfermedades. Por ello para prevenir y controlar las patologías es importante conocer: los aspectos biológicos de las amibas del género, las vías de invasión, los mecanismos de evasión de la respuesta inmune y la comprensión y conocimiento de los mecanismos de patogenicidad que llevan a cabo las amibas de este género durante la invasión al huésped, lo cual permitirá, entre otros aspectos, la búsqueda de estrategias que conlleven a un diagnóstico oportuno de la infección, lo que favorecerá también la evaluación y posterior implementación de esquemas terapéuticos de elección que finalmente ofrezcan un mejor pronóstico a los pacientes que padezcan esta infección.

Son pocos los trabajos enfocados a describir la histopatología que causa el género *Acanthamoeba* y, así mismo, dichos trabajos son enfocados principalmente en SNC y meato nasal y en tiempos prolongados. Además, sólo uno de los dos trabajos enfocados en invasión sistémica, describe la histopatología ya que el otro sólo muestra la presencia de la amiba en los diferentes órganos

Aunque los trabajos realizados *in vitro* dan importantes aportaciones a los mecanismos de patogenicidad, estos son enfocados en el modelo de QA y no pueden reflejar totalmente los eventos *in vivo* en el modelo de EAG. Es por ello que, con el fin de demostrar dicha invasión, se trabajó con ratones BALB/c para comparar la invasión sistemática de *A. culbertsoni* y *A. castellanii* y los cambios histológicos que se llevan a cabo en tiempos tempranos de interacción en diferentes órganos.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Comparar la invasión sistémica de *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba castellanii* en pulmón, hígado, riñón y bazo en ratones BALB/c inoculados vía intranasal.

6.2 Objetivos particulares

- Reactivar la virulencia de las cepas en estudio.
- Determinar a través de la técnica inmunohistoquímica la invasión sistémica de *Acanthamoeba culbertsoni*. en tiempos tempranos de interacción de 24, 48, 72 y 96 h en el modelo murino.
- Determinar a través de la técnica inmunohistoquímica la invasión sistémica de *Acanthamoeba castellanii* en tiempos tempranos de interacción de 24, 48, 72 y 96 h en el modelo murino.

7 MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Cepas amibianas

Se trabajó con dos cepas aisladas de casos clínicos. La primera corresponde a *Acanthamoeba culbertsoni* la cual fue aislada en España de un caso clínico de QA que involucró invasión a humor acuoso (Arnalich-Montiel *et al.*, 2012); cabe mencionar que no es habitual que las especies del género *Acanthamoeba* invadan más allá de la córnea. La segunda corresponde a la especie *Acanthamoeba castellanii*, aislada del lente de contacto de un paciente del Hospital Asociación para evitar la ceguera en México “Dr. Luis Sánchez Bulnes” (Salazar, 2007). Dichas cepas se encontraban en el laboratorio 3 del edificio A-4 de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala en el cultivo axénico de bactocasitona al 2% enriquecido con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina y estreptomicina) al 1% a temperatura óptima de crecimiento de 30°C. Los cultivos se sembraron cada semana para evitar el enquistamiento ya que los ensayos se realizaron con trofozoítos obtenidos en la fase exponencial de crecimiento.

7.2 Reactivación y mantenimiento de la virulencia de las amibas

Con el propósito de reactivar la virulencia de las cepas en estudio se llevó a cabo la metodología propuesta por Culbertson (1959). Se utilizaron 10 ratones machos de tres semanas de edad recién destetados de la cepa BALB/c (5 ratones para cada cepa) obtenidos del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Se realizó una inoculación intranasal (los ratones se encontraban previamente anestesiados con pentobarbital sódico) de 1×10^6 trofozoítos/20 μ l de medio limpio bactocasitona (sin suero fetal bovino ni antibiótico) (Figura 7) a partir de una caja de cultivo que se colocó sobre una capa de hielo por 5 minutos para favorecer el desprendimiento de las amibas. Posteriormente las amibas se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min para concentrarlas.

A los ratones inoculados se les dio seguimiento durante los siguientes 21 días, registrando presencia de sudoración, movilidad lenta, reflejos y respiración agitada, Si la muerte ocurría antes de dicho tiempo se extraían los órganos: cerebro, pulmón, hígado y riñón, los cuales eran inmediatamente colocados en cajas con medio agar no nutritivo NNE enriquecido con *Enterobacter aerogenes* (Figura 8), e incubados a una temperatura de 30°C con el fin de

recuperar las amibas. Si los ratones sobrevivían a ese tiempo eran sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico (200mg/kg) y procesados de la misma manera.

Las placas se revisaron diariamente por 7 días con un microscopio óptico invertido hasta recuperar las amibas y su posterior axenización; este procedimiento se llevó a cabo en dos ocasiones más (John y Howard, 1993) para asegurar una alta virulencia en las cepas. El cuidado y el sacrificio de los ratones, se hizo de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999.



Figura 7. Inoculación intranasal. Con ayuda de una micropipeta, se le colocó a cada ratón 1×10^6 trofozoítos de la cepa en estudio.

7.3 Axenización de las cepas

Una vez recuperadas las cepas en estudio, fue necesario para llevar a cabo futuros ensayos, contar con un cultivo de amibas libre de bacterias. Por lo que se cortaba una pequeña parte del agar donde había crecimiento amibiano para posteriormente colocarlo en un tubo con medio bactocasitona al 2% enriquecido con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina y estreptomycin) al 1% (Figura 8) a la temperatura de 30°C (temperatura óptima de crecimiento determinada previamente). Todo el procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar para asegurar la esterilización.



Figura 8. Medios de cultivo. Se observan los dos tipos de cultivos usados para el crecimiento de las amibas. Lado izquierdo medio agar no nutritivo NNE (Monoxénico). Lado derecho medio bactocasitona (Axénico).

7.4 Inducción de Encefalitis Amibiana Granulomatosa

Una vez reactivada la virulencia de las cepas en estudio, se realizaron los ensayos de inducción de la EAG. Se utilizaron en total dos grupos de 20 ratones machos de tres semanas de edad recién destetados de la cepa BALB/c obtenidos del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Se realizó una inoculación intranasal de 1×10^6 trofozoitos (Culbertson, 1959) utilizando 20 ratones para cada cepa. Los ratones fueron sacrificados en grupos de 5 en diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h) post-inoculación. Se fijaron por perfusión con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.2 (Figura 9). Los órganos (pulmón, hígado, riñón y bazo) fueron removidos y se mantuvieron en el fijador por 24 h. Posteriormente se lavaron con solución buffer PBS y se incluyeron en parafina y obtener cortes histológicos de 4 μ m de grosor en el micrótomo.

7.5 Inmunohistoquímica

Los cortes obtenidos fueron desparafinados a 70°C por una hora y rehidratados (Xilol-Alcohol 100-70%), A continuación, se hizo la recuperación antigénica por medio de digestión enzimática con proteinasa K 0.1mg/ml en buffer TBST con CaCl_2 al 1% durante 15 min. La peroxidasa endógena fue bloqueada con H_2O_2 al 3% por 15 min. Se realizó un

lavado con TBST y agua destilada para posteriormente incubar por dos horas con suero fetal bovino al 5%. Después, se incubaron toda la noche con sueros hiperinmune de conejo (anticuerpo primario) anti-*A. culbertsoni* (1:400) (previamente obtenido en el laboratorio) y anti-*A. castellanii* (1:1000). Al día siguiente las muestras se lavaron con TBST y fueron incubadas con el anticuerpo secundario (HRP-Rabbit MACH 2 Polymer Biocare Medical. USA). La actividad de la peroxidasa fue revelada con diaminobenzidina-H₂O₂. Se tiñeron las muestras con hematoxilina de Harris y se deshidrataron con alcoholes de manera ascendente (70-100%) para su montaje con resina sintética. Los ratones controles se procesaron de la misma manera sólo que sin el anticuerpo primario (Cárdenas, 2016). Así mismo algunas laminillas fueron procesados mediante la técnica tradicional de hematoxilina-eosina.



Figura 9. Fijación de órganos. Por medio de la técnica de perfusión con paraformaldehído se detuvo la destrucción celular y se obtuvo pulmón, hígado, riñón y bazo.

7.6 Descripción y comparación

Las laminillas procesadas se observaron en un microscopio óptico. Se buscó la presencia de trofozoítos o quistes en los diferentes órganos, cambios histopatológicos, así como células inflamatorias.

8 RESULTADOS

8.1 Reactivación de la virulencia de las amibas

Se realizaron un total de 3 pases seriados en los ratones con ambas cepas de *Acanthamoeba*. Se observó una diferencia entre la virulencia de las cepas, ya que la mitad de los ratones infectados con *Acanthamoeba culbertsoni* murió, mientras que los ratones infectados con la cepa de *Acanthamoeba castellanii* sobrevivieron los 21 días (Tabla 3). Así mismo, para la recuperación de las amibas también hubo diferencias ya que, en los tres pases, de los ratones infectados con *A. culbertsoni* sólo se recuperó la cepa de cerebro y pulmón, mientras que de los infectados con *A. castellanii* se recuperó de cerebro, pulmón, hígado y riñón (Tabla 4), por lo cual *A. castellanii* se consideró más invasiva.

Tabla 3. Supervivencia de ratones. Porcentaje de los animales que sobrevivieron después de los 21 días de observación.

Cepa amibiana	Porcentaje de supervivencia
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	50%
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	100%

Tabla 4. Recuperación amibiana. Se muestra de que órganos se recuperaron las distintas cepas (/ Presencia. X Ausencia)

Cepa amibiana	Órgano			
	Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	/	/	X	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	/	/	/	/

8.2 Inmunohistoquímica

Inmediatamente de ser removidos los órganos de los ratones, se realizó un análisis macroscópico en el cual no se observaron cambios morfológicos o patológicos como edemas, necrosis o hemorragias (Figura 10).

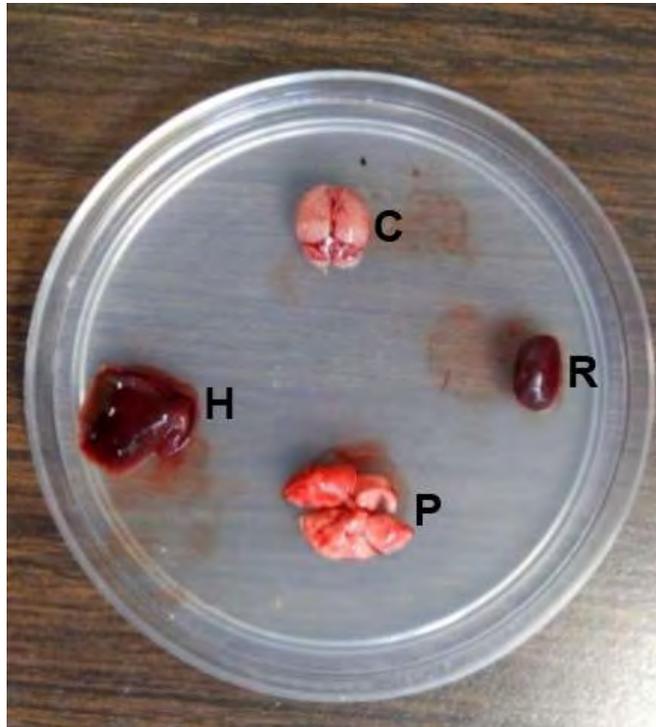


Figura 10. Órganos extraídos del ratón recién sacrificado. No se observan cambios morfológicos macroscópicos. **C.** Cerebro. **R.** Riñón. **P.** Pulmón. **H.** Hígado.

En el análisis histopatológico se observó que trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* migraron a pulmón, bazo, riñón e hígado en diferentes tiempos. Por otro lado, no se observó la presencia de trofozoítos o quistes de *Acanthamoeba culbertsoni* en ninguno de los órganos en estudio.

En el espacio alveolar del pulmón, se pudo observar la presencia de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* 24 horas post-inoculación, algunos de los cuales estaban rodeados de macrófagos alveolares (Figura 11). En el mismo tiempo evaluado fue posible observar trofozoítos y quistes en el bazo, sin embargo, sin evidencia de inflamación (Figura 12).

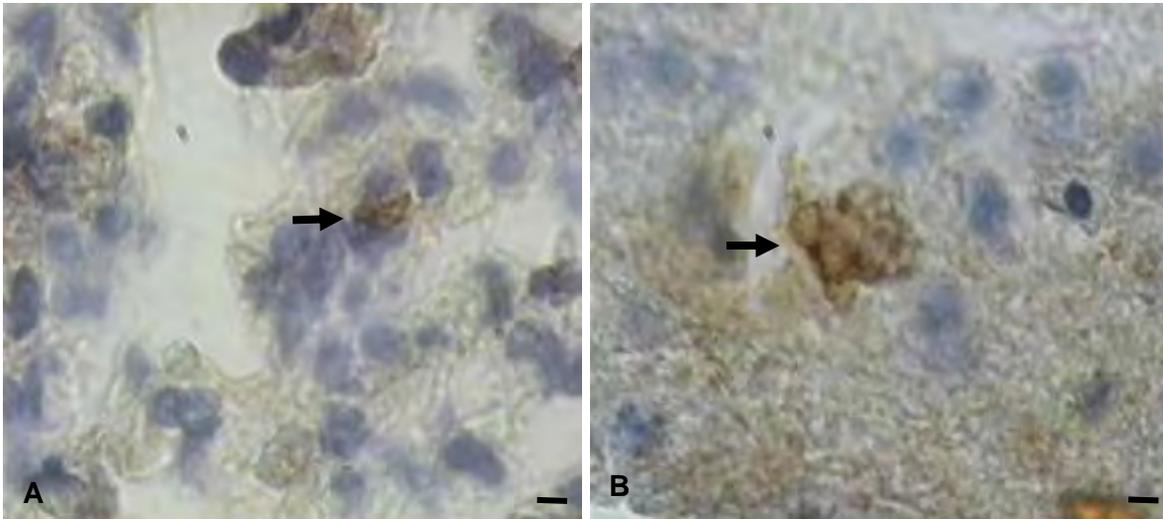


Figura 11. Fotomicrografía de pulmón. Microscopía de luz. Se muestra la presencia de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* en el tejido alveolar con infiltrado inflamatorio alrededor, conformado principalmente por macrófagos a las 24 horas post-inoculación intranasal **A. 40X B. 100X**

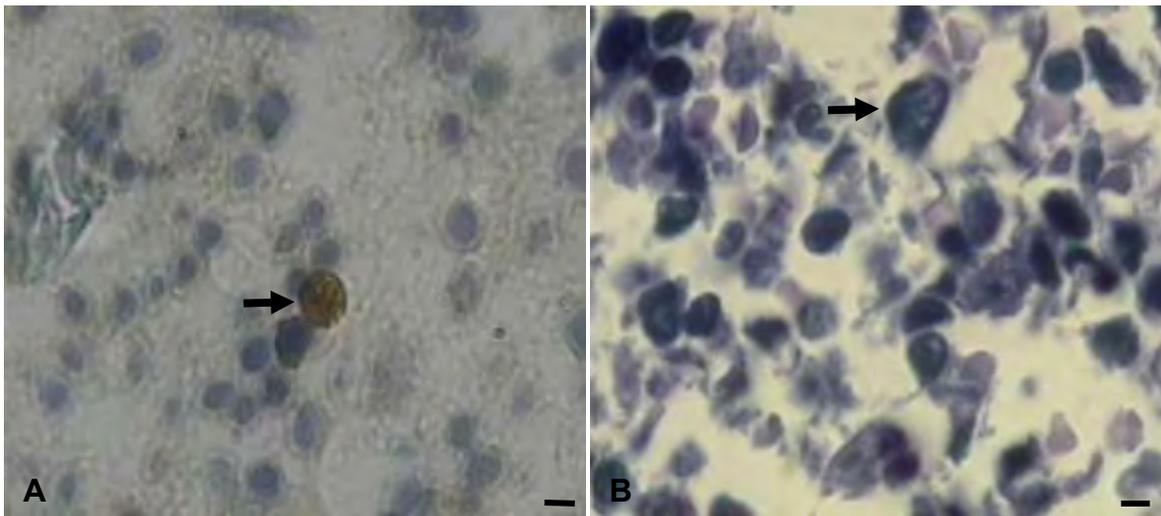


Figura 12. Fotomicrografía de bazo. Microscopía de luz. A. 100X. Inmunohistoquímica. Se muestra la localización de la forma quística de *Acanthamoeba castellanii* sin infiltrado inflamatorio 24 horas post-inoculación intranasal. **B. 100X.** Tinción Hematoxilina-Eosina. Se muestra la presencia de un trofozoíto de *Acanthamoeba castellanii* 24 horas post-inoculación intranasal.

Del mismo modo, a las 72 horas en el riñón fueron inmunolocalizados trofozoítos de *A. castellanii*, los cuales se encontraban penetrando e invadiendo el tejido renal a través de los túbulos renales. Se pudo observar de manera clara que los trofozoítos migraban a través de las uniones celulares, así evitando la destrucción tisular (Figura 13).

Por último, también se observaron trofozoítos unidos a hepatocitos en el espacio de Disse, así como al endotelio sinusoidal hepático a las 72 horas post-inoculación (Figura 14).

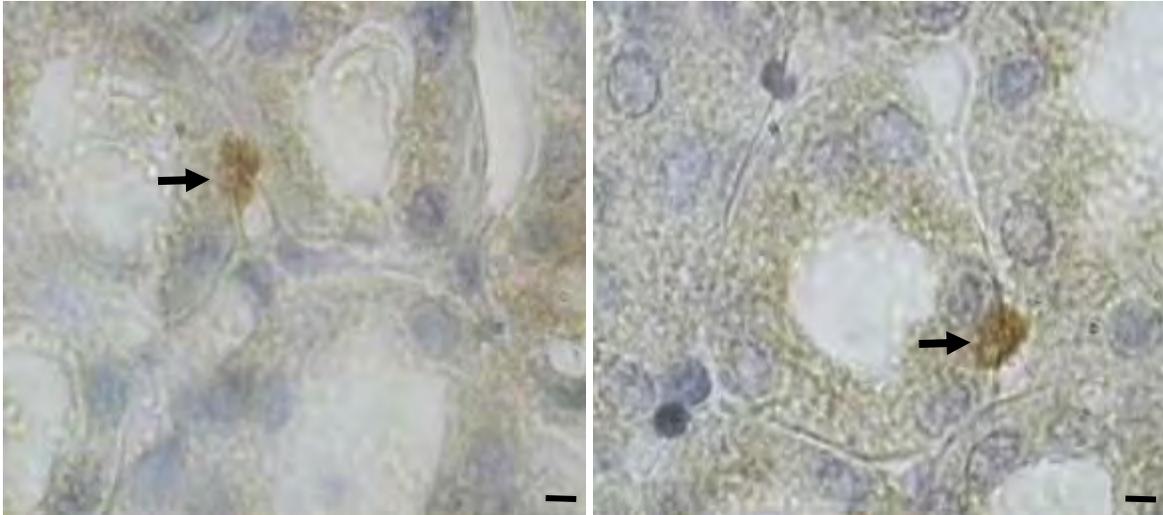


Figura 13. Fotomicrografía de riñón. Microscopía de luz. 100x. Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* invadiendo el tejido renal y migrando a través de las uniones celulares de los túbulos renales, evitando así la destrucción tisular a las 72 horas post-inoculación intranasal.

Es importante mencionar que a pesar de que no se encontraron trofozoítos o quistes de la cepa de *Acanthamoeba culbertsoni* en ningún órgano, sí se observó marcaje de macrófagos en el bazo a las 72 horas y a las 96 horas se observó hiperplasia de la pulpa blanca del mismo órgano (Figura 15).

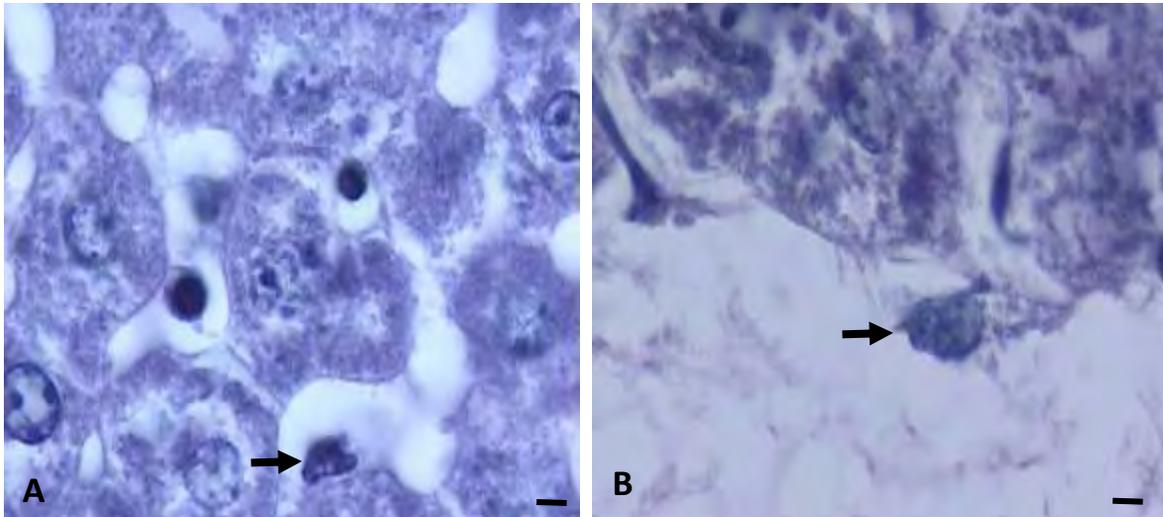


Figura 14. Fotomicrografía de hígado. Microscopía de luz. 100x. Tinción de hematoxilina-eosina. **A.** Se muestra la presencia de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* adheridos a hepatocitos en el espacio de Disse. **B.** Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* en el endotelio sinusoidal hepático.

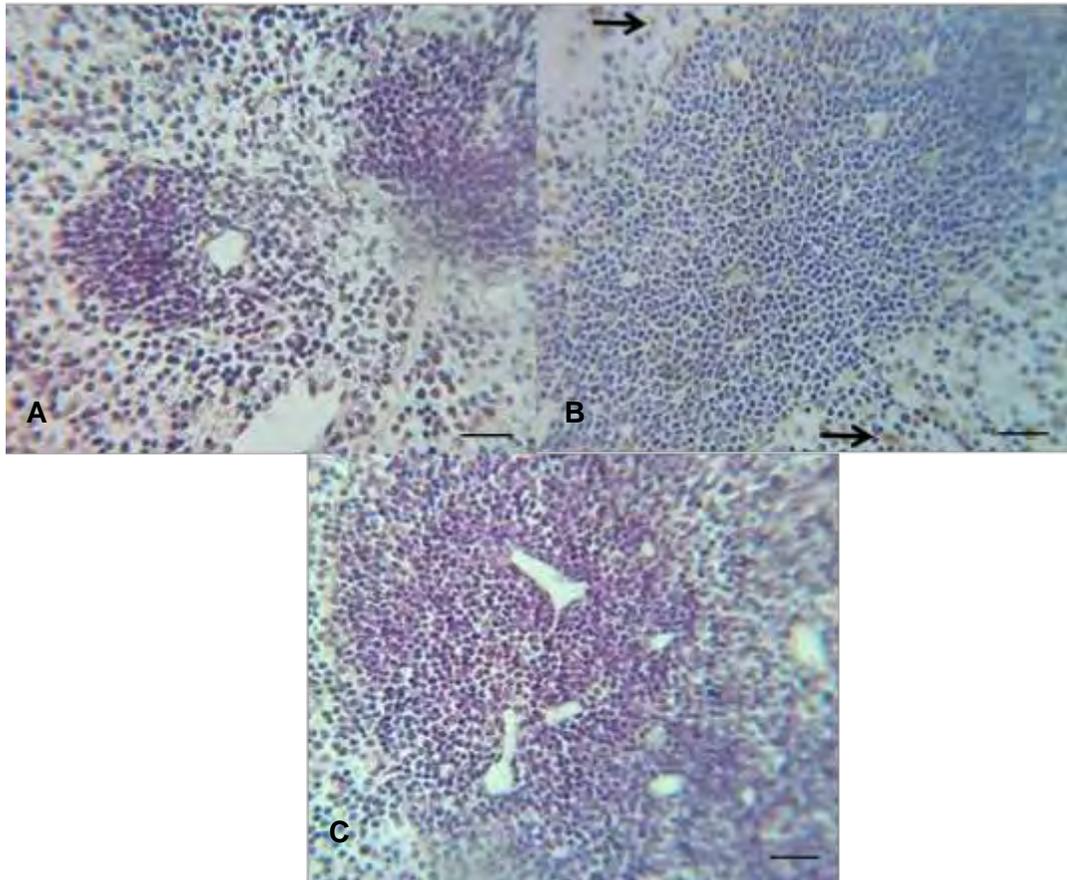


Figura 15. Fotomicrografía de bazo. Microscopía de luz. 100 x. **A.** Bazo de ratón control. **B.** Bazo de ratón a las 72 horas post-inoculación intranasal de *Acanthamoeba culbertsoni*. Se observa una mayor proliferación de las células que conforman la pulpa blanca, además de marcaje por inmunohistoquímica. **C.** Hiperplasia de pulpa blanca de bazo en ratones inoculados con *A. culbertsoni* a las 96 horas post-inoculación.

9 DISCUSIÓN

En este trabajo se describen los momentos tempranos de la invasión de dos especies de amibas anfizoicas en diferentes órganos, si bien la capacidad de invasión de amibas de interés clínico como *Acanthamoeba* y *Naegleria* a diferentes órganos ya había sido descrita, sin embargo, los ensayos corresponden a tiempos post inoculación más largos.

Este trabajo es el primero en describir la invasión de amibas del género *Acanthamoeba* por vía hematógena a órganos en tiempos tempranos de interacción. El cual se realizó con cepas de las especies *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba culbertsoni*. Mismas que pertenecen a diferentes grupos (grupo II y grupo III, respectivamente) considerando criterios morfológicos y se sabe que en ambos grupos están reportadas especies de importancia médica (Pussard y Pons, 1977). Lo anterior es reforzado con el genotipo de las cepas aisladas, ya que ambas pertenecen al genotipo T4, el cual está relacionado con enfermedades en humanos como: Encefalitis Amibiana Granulomatosa y Queratitis Amibiana (Siddiqui, 2012). Aunque *A. culbertsoni* fue aislada de un caso de queratitis con invasión extracorneal y *A. castellanii* de un lente de contacto, las cepas fueron utilizadas en el modelo de EAG, debido a que pertenecen al genotipo T4 y en el laboratorio se comprobó su virulencia y capacidad invasiva en el modelo murino de EAG (Salazar, 2007; Cárdenas, 2016).

Desde el momento en que las cepas se aislaron de casos clínicos fueron consideradas patógenas, las cuales se mantuvieron por un tiempo prolongado en cultivos axénicos, por lo cual fue necesario reactivar su virulencia. Lo anterior se sustentó en los reportes en los que se documenta la disminución de la virulencia de diferentes cepas una vez que son cultivadas en medios axénicos, sin importar si han sido aisladas del medio ambiente o de casos clínicos (De Jonckheere, 1979; John y Howard, 1993; Salazar, 2007; Castro, 2012). Im y colaboradores en 1999 demostraron que cepas de *Acanthamoeba* mantenidas en cultivo desde su aislamiento presentaron menor virulencia con respecto a cepas aisladas del cerebro de ratón post inoculación intranasal. Demostraron también el aumento de la virulencia de cepas amibianas que fueron inoculadas y recuperadas por lo menos 2 veces en ratón, reportando la muerte temprana en animales de experimentación, así como un mayor efecto citopático en cultivos primarios. En este estudio, al llevar a cabo la reactivación de la virulencia fue posible observar que *Acanthamoeba culbertsoni* fue más virulenta debido a que mató a la mitad de los organismos, no obstante, sólo se recuperó de cerebro y pulmón. Por el contrario, *Acanthamoeba castellanii* a pesar de ser menos virulenta, fue

más invasiva, ya que los trofozoítos migraron hacia los diferentes órganos evaluados desde los tiempos tempranos de interacción. Es importante enfatizar que los ensayos fueron corroborados por triplicado. Lo anterior coincide con lo reportado por Kasprzak *et al.* en 1974, quienes mencionan que después de varios pases por ratones, trofozoítos de amibas del género *Acanthamoeba* muestran tropismo por los mismos órganos. Lo que sugiere que la mayoría de las amibas tienen tropismo al cerebro independientemente de la forma de inoculación: A través de la inoculación intranasal, las amibas pueden llegar vía hematogena o directamente por el neuroepitelio olfatorio (Khan, 2006; Cárdenas, 2016) o de manera inmediata por inoculación intracraneal (Alves *et al.*, 2016). Sin embargo, en una inoculación intraperitoneal, más lejana al cerebro, también se ha reportado recuperación de cerebro, pero no de otros órganos cercanos a la inoculación (Alves *et al.*, 2016). Lo que sugiere que dicho tropismo depende de la cepa y no de la forma de inoculación.

Hasta el momento se desconoce la descripción histopatológica de la invasión sistémica de *Acanthamoeba* spp., sobre todo, en estadios tempranos de la infección. En este trabajo se describe por primera vez el proceso de invasión fuera del SNC, en donde se reporta la presencia de trofozoítos de *A. castellanii* en pulmón, bazo, riñón e hígado, sin embargo, en casi todos (exceptuando pulmón) no hay presencia de inflamación. Górnik, y Kuzna-Grygiel en el 2005, sugirieron que la falta de una respuesta inflamatoria puede deberse a que se necesita un nivel mucho más alto de antígeno para activar el reconocimiento del parásito por el sistema inmune. Así mismo, reportaron focos necróticos en pulmones, hígado y túbulo renales y zonas hemorrágicas en riñones en ratones de 2 semanas de edad, caso contrario a los resultados del presente trabajo, debido a que los trofozoítos de *Acanthamoeba* estuvieron mayor tiempo en el organismo y probablemente la virulencia de las cepas era mayor, además de que los ratones eran más jóvenes y, por ende, su sistema inmune innato no estaba del todo desarrollado.

De acuerdo con Rucka (1974) y Górnik y Kuzna-Grygiel (2005) la magnitud del daño en los órganos depende de la virulencia de cada cepa, sin embargo Gieryng y colaboradores en 1993 argumentan que esto se da por la duración de la infección. Así mismo Baig en 2015 menciona: "El daño cerebral extenso es causado sustancialmente por la respuesta inmune del huésped en lugar de la amiba". Por lo cual se podría pensar que los cambios histológicos son una combinación de los tres factores. En este trabajo se podría pensar que las amibas utilizadas no tenía una virulencia elevada para causar daño evidente y los ratones tenían un sistema inmune óptimo, sin embargo no se descarta la idea de que si el tiempo

transcurrido post-inoculación hubiera sido mayor, los cambios histológicos hubieran sido evidentes.

Llama la atención que no se observan cambios en la arquitectura de los órganos evaluados y al menos por microscopía de luz no se registró fagocitosis como la reportada por Omaña-Molina *et al.*, 2013. En este sentido, los trofozoítos observados en el riñón a las 72 horas, refuerzan esta idea, ya que se encontraban migrando a través de las uniones celular sin causar destrucción tisular.

Es aceptado que la ruta de invasión de las amibas del género *Acanthamoeba* hacia los órganos después de la inoculación intranasal es por vía hematológica (Martínez, 1991). Sin embargo, dicha invasión sistémica se puede explicar por varias razones: La primera es por llegada directa de los trofozoítos a los alveolos pulmonares, en donde se lleva a cabo la hematosis. La segunda puede ser por el daño y penetración de los trofozoítos en el meato nasal e ingresar a algún capilar y la tercera es la llegada al SNC a través del neuroepitelio olfatorio y en el daño tisular que provoca, hasta llegar a un vaso sanguíneo y comenzar con ello la invasión sistémica. En este caso es difícil aseverar con exactitud la vía de diseminación de los trofozoítos, a pesar de ello, la presencia de los trofozoítos en alveolos sugiere que esta fue la ruta de diseminación hacia otros órganos.

La ausencia de trofozoítos de *A. culbertsoni* en los diferentes órganos se puede deber, como menciona Kasprzak *et al.* (1974) a que aquellas cepas que tienen neurotropismo, no son capaces de producir daños en algún otro órgano y viceversa. Por los resultados y, apoyado por el trabajo de Cárdenas (2016) en donde encontró daño por trofozoítos en el Sistema Nervioso Central usando la misma especie; *A. culbertsoni*, se podría inferir que esta cepa a pesar de aislarse también de pulmón de ratón, no produjo ningún daño en alveolos o alguna otra estructura pulmonar debido a que tienen neurotropismo y por ende no invadieron a ningún otro órgano. Ya que en aquellos ratones inoculados intranasalmente con esta cepa y que no murieron, al analizar los órganos extraídos, tampoco había evidencia de su migración.

Es importante subrayar que el bazo, órgano linfático dividido en pulpa roja y pulpa blanca, en donde la primera ocupa más de la mitad del volumen del órgano y es el sitio en donde se destruyen los eritrocitos, la pulpa blanca contiene macrófagos y linfocitos B y T que participan en el reconocimiento de microorganismos y proteínas extrañas como parte de la respuesta inmune primaria (Vargas *et al.*, 2013). Por tanto al detectar a las amibas en este órgano, es probable que se estimulará la proliferación de estas células significativamente hasta llegar a la hiperplasia de la pulpa blanca a las 96 h post-inoculación, lo que

corresponde con lo reportado con Górnik y Kuzna-Grygiel (2005) en dónde también reportan hiperplasia de pulpa blanca del bazo a las 72 horas post-inoculación.

Así mismo, la presencia en el bazo de macrófagos marcados inmunohistoquímicamente a las 72 h, sugiere que éstos habrían sido activados y se encontraban fagocitando amibas que habrían migrando por vía hematogena. Lo anterior se apoya con lo reportado por Ferrante y Abell (1986) y Stewart *et al.*, (1992) en dónde en trabajos *in vitro* demuestran que la presencia de neutrófilos y/o macrófagos coinciden con la presencia de trofozoítos muertos de *Acanthamoeba*, lo que se sugiere que los macrófagos son atraídos por el antígeno del parásito. Por otro lado, Kremer *et al.* 1994, y Niederkorn *et al.*, 1999 observaron que, en el curso de la queratitis experimental en animales, los macrófagos juegan el papel más importante como la primera línea de defensa.

Así mismo Van Klink y colaboradores en 1996 no sólo mencionan que los macrófagos son la primera línea de defensa en la QA, sino que sugieren que son un limitante importante para que el parásito no se propague e invada hacia otras zonas. De acuerdo con nuestros resultados *A. castellanii* invadió todos los órganos en estudio sin presencia de inflamación, por lo cual se puede interpretar la ausencia o bajo número de trofozoítos. Por otro lado, la hiperplasia de la pulpa blanca de bazo en la invasión de *A. culbertsoni* podría ser respuesta al antígeno del parásito que contrarrestó la propagación e invasión.

El modelo utilizado en este trabajo en tiempos tempranos de interacción nos da evidencia de que las amibas invaden otros órganos de modo semejante que como lo hacen en córnea humana (Omaña-Molina *et al.*, 2010) y en córnea de hámster (Omaña-Molina *et al.*, 2013), mostrando una migración/penetración de las capas tisulares más profundas tal como se puede observar en el riñón. Apoyado con la descripción de la forma de invasión de los trofozoítos en córnea (Omaña-Molina *et al.*, 2010; Omaña-Molina *et al.*, 2013) y lo sugerido por estos últimos, se podría pensar que en este proceso las fosfolipasas, las cuales ayudan a la destrucción celular (Victoria y Korn, 1975), aún no son evidentes debido a que en este proceso las proteasas están siendo producidas para que haya separación celular y una penetración más rápida.

Así mismo May y John en 1982 realizaron un trabajo en donde describen la invasión en tiempos tempranos con la amiba *Naegleria fowleri*, en donde demuestran la capacidad invasiva desde el primer día post-inoculación intravenosa en ratones de 13 a 18 gramos de peso, ya que llegó a cerebro, pulmón, hígado y riñón, condición que coincide con la especie *A. castellanii* usada en este trabajo, además mencionan que en la mayoría de los casos la amiba se recuperó de cerebro en comparación de otros órganos, esto nos da pauta para

reafirmar la idea del tropismo hacia ciertos órganos. En los cortes histológicos se pudo observar amibas en sinusoides hepáticos (1-5 días), capilares de glomérulos renales (5 días) y aunque en el bazo no se recuperó la amiba, en las pruebas histológicas si fue capaz de ser observada en capilares de un ratón sacrificado al tercer día, es importante mencionar que no se observó evidente inflamación, así como daño citopático evidente. Dichos resultados resultan semejantes a lo encontrado en este trabajo, lo cual también nos puede dar idea que los mecanismos de invasión en tiempos tempranos son similares entre los diferentes géneros.

10 CONCLUSIONES

- Este trabajo es el primer realizado que describe los eventos tempranos de invasión de amibas del género *Acanthamoeba* a diferentes órganos.
- Los trofozoítos de las especies en estudio se comportan de manera diferente en la invasión, ya que presentan tropismo hacia diferentes órganos.
- A través del modelo murino de EAG, fue posible demostrar que trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, causantes de Queratitis amibiana y Encefalitis Amibiana Granulomatosa, pueden invadir en tiempos tempranos a través de la invasión sistémica, órganos como pulmón, hígado, riñón y bazo.
- Los trofozoítos de *Acanthamoeba culbertsoni* sólo invadieron pulmón.
- Los eventos morfológicos en órganos en tiempos tempranos sugieren que después de la inoculación intranasal los trofozoítos continúan la invasión separando y levantando las células más superficiales, posteriormente migrando y penetrando entre las uniones celulares sin causar efecto citolítico en las células aledañas.
- La forma de invasión a los diferentes órganos es similar a la descrita anteriormente para tejido corneal.
- Este trabajo apoya a los trabajos previos en donde en etapas tempranas de infección la respuesta inflamatoria es pobre o nula.
- El diagnóstico de alguna infección por *Acanthamoeba* no sólo es tardío, sino que sólo se enfoca en estudios del Sistema Nervioso Central, por lo cual después de comprobar la invasión temprana a otros órganos, se deben hacer estudios más completos en los pacientes afectados.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Alves, D. S., Moraes, A. S., Alves, L. M., Gurgel-Gonçalves, R., Lino Junior, R. S., Cuba-Cuba C. A. y Vinaud, M. C. 2016. Experimental infection of T4 *Acanthamoeba* genotype determines the pathogenic potential. *Parasitol Res* 115(9):3435-3440.
- Arnalich-Montiel, F., Martín-Navarro, C. M., Alió, J. L., López-Vélez, R., Martínez-Carretero, E., Valladares, B., Piñero, J. E. y Lorenzo-Morales, J. 2012 Successful monitoring and treatment of intraocular dissemination of *Acanthamoeba*. *Arch Ophthalmol* 130:1474-1475
- Baig, A. M. 2015. Pathogenesis of amoebic encephalitis: are the amoebae being credited to an “inside job” done by the host immune response? *Acta trop*, 148:72-76.
- Bloch, K. C. y Schuster, F. L. 2005. Inability to make a premortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal granulomatous amoebic encephalitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(6):3003-3006.
- Bonilla, H. F., Whitehurst, A. y Kauffman, C. A. 1999. *Acanthamoeba* sinusitis and disseminated infection in a patient with AIDS. *Infect. Med.* 16:397-400.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R. y Eslava, C. 2004. La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. En: Rosas, I., Cravioto, A. y Ezcurra E. (Eds.). *Microbiología ambiental*. Instituto Nacional de Ecología, UNAM. México. Pp. 67-81.
- Bowers, B. y Korn, E. D. 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J. Cell. Biol.* 41:786-805.
- Cabello-Vílchez, A. M. 2015. *Acanthamoeba* spp. an opportunistic agent human infections. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener*. 4:11-32.
- Callicott, J. H. 1968. Amebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the *Hartmannella (Acanthamoeba)-Naegleria* group. *Am. J. Clin. Pathol.* 49:84-91.
- Cárdenas, L. U. A. 2016. Encefalitis Amibiana Granulomatosa en modelo murino: Descripción inmunohistoquímica de las etapas tempranas de la infección provocada por *Acanthamoeba culbertsoni*. *Tesis de Licenciatura (Biólogo)*. FES Iztacala. UNAM. México. Pp 45.
- Castellani, A. 1930. An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note. *J. Trop. Med. Hyg.* 33:160.
- Castrillon, J. C. y Orozco, L. P. 2013. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Rev. Chilena Infectol.* 30(2):147-155.

- Castro, M. A. 2012. *Aislamiento e identificación de amebas patógenas del género Acanthamoeba en piscinas termales de Tecozautla, Estado de Hidalgo*. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. Pp. 61.
- Cavalier-Smith, T., Chao, E. E. y Lewis, R. 2016. 187-gene phylogeny of protozoan phylum Amoebozoa reveals a new class (Cutosea) of deep-branching, ultrastructurally unique, enveloped marine Lobosa and clarifies amoeba evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 99:275-296.
- Chagla, A. H. y Griffiths, A. J. 1974. Growth and encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* 85:139-145.
- Culbertson, C. G., Ensminger, P. W. y Overton, W. M. 1966. *Hartmannella (Acanthamoeba)*. Experimental chronic, granulomatous brain infections produced by new isolates of low virulence. *Am J Clin Pathol* 46(3):305-314
- Culbertson, C. G., Smith, J. W., Cohen, I y Minner, J. R. 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.* 35:185-197.
- Cursons, R. T. M., Brown, T. J. y Keys E. A. 1978. Virulence of pathogenic free-living amoebae. *J. Parasitol.* 64: 744-745.
- De Jonckheere J. 1979. Differences in virulence of *Naegleria fowleri*. *Pathol. Biol.* 27:453-458.
- De Jonckheere, J. y Von de Voorde, H. 1976. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(2)294-297.
- Derrick, E. H. 1948. A fatal case of generalized amoebiasis due to a protozoon closely resembling, Eif not identical with *Iodamoeba bütschlii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 42(8):191-198.
- Dirección General en Información en Salud. 2014. *Base de datos sobre defunciones*. Recuperado el 11 de agosto de 2016, de http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/basesdedatos/std_defunciones.html
- Feingold, J. M., Abraham, J., Bilgrami, S., Ngo, N., Visvesara, G. S., Edwards, R. L. y Tutschka, P. J. 1998. *Acanthamoeba* meningoencephalitis following autologous peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 22(3):297-300.
- Ferrante, A. y Abell, T. J. 1986. Conditioned médium from stimulated mononuclear leukocytes augments human neutrophil-mediated killing of a virulent *Acanthamoeba* sp. *Infect Immun.* 51:607-617.

- Fowler, M. y Carter, R. F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Brit. Med. J.* 5464(2):740-742.
- Frenchel, T. 1987. *Ecology of protozoa: The biology of free-living phagotropic protist*. Springer Verlag. Wisconsin. Pp. 197.
- Friedland, L. R., Raphael, S. A., Deutsch, E. S., Johal, J., Martyn, L. J., Visvesvara, G. S. y Lischner, H. W. 1992. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 11(5): 404-407.
- Fung, K. T., Dhillon, A. P., McLaughlin, J. E., Lucas, S. B., Davidson, B., Rolles, K., Patch, D. y Burroughs, A. K. 2008. Cure of *Acanthamoeba* cerebral abscess in a liver transplant patient. *Liver transplantation*. 14:308-312.
- Gallegos-Neyra, E. M., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. y Mayén-Estrada, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Rev. Mex. Biodiv.* 85:10-25.
- Gelman, B. B., Rauf, S. J., Nader, R., Popov, V., Borkowsk, J., Chaljub, G., Nauta, H. W. y Visvesvara, G. S. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinea diploidea*. *JAMA*. 285(19):2450-2451.
- Gieryng, H., Gieryng, R. y Pirog, Z. 1993. Zmiany histologiczne w płucach myszy wywołane doświadczalnym zarażaniem pełzakami z grupy „limax”. *Wiad Parazytol*, 39:367-372.
- Gomez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E. y Ares-Mazas, E. 2007. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.* 100(5): 1151-1154.
- González-Robles, A., Castañón, G., Cristóbal-Ramos, A. R., Lázaro-Haller, A., Omaña-Molina, M., Bonilla, P. y Martínez-Palomo, A. 2006. *Acanthamoeba castellanii*: Structural basis of the cytopathic mechanism. *Experimental parasitology*. 114:133-140.
- Górnik, K. y Kuzna-Grygiel, W. 2005. Histological studies of selected organs of mice experimentally with *Acanthamoeba* spp. *Folia Morphol* 64(3):161-167.
- Griffiths, A. J., Curnick, L., Unitt, M. D. y Wilcox, S. L. 1978. The use of physiological characterizations in the classifications of five species of *Acanthamoeba*. *Journal of General Microbiology*. 107:211-215.
- Gullett, J., Mills, J., Hadley, K., Podemski, B., Pitts, L. y Gelber, R. 1979. Disseminated granulomatous acanthamoeba infection presenting as an unusual skin lesion. *Am. J. Med.* 67:891-896.

- Harwood, C. R., Rich, G. E., McAleer, R. y Cherian, G. 1988. Isolation of *Acanthamoeba* from a cerebral abscess. *Med J Aust* 148(1):47-49.
- Huws, S. A., Morley, R. J., Jones, M. V., Brown, M. R. W., Smith, A. W. 2008. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. *FEMS Microbiol. Lett.* 282:258-265.
- Jager, B. V. y Stamm, W. P. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *The Lancet* 7791(2):1343-1345.
- John, D. T. 1993. Opportunistically Pathogenic Free-living Amoebae. En: Kreter, J. P. y Baker, J. R. (Eds.). *Parasitic. Protozoa*. California: Academic Press. 2(3):143-246.
- John, D. T. y Howard, M. J. 1993. Virulence of *Naegleria fowleri* affected by axenic cultivation and passage in mice. *Folia Parasitologica*. 40:187-191.
- Jones, D. B., Visvesvara, G. S. y Robinson, N. M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 95(2):221-232
- Im, K., Shin, H., Seo, D. W., Jeon, S., Kim, T. 1999. Pathogenicity of Korean isolates of *Acanthamoeba* by observing the experimental infection and zymodemes of five isoenzymes. *The Korean Journal of Parasitology*. 37(2):85-92.
- Kasprzak, W., Mazur, T. y Rucka, A. 1974. Studies of some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland. *Ann. Soc. belge Med. trop.* 54(4-5):351-357.
- Kenney, M. 1971. The Micro-Kolmer complement fixation test in routine screening for soil ameba infection. *Health. Lab. Sci.* 8(1):5-10.
- Kernoham, J. W., Magath, T. B. y Schloss, G. T. 1960. Granuloma of brain probably due to *Endolimax williamsi* (*Iodamoeba bütschlii*). *Arch. Pathol.* 70:576-580.
- Khan, N. A. 2001. Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol.* 43:391-395.
- Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *Microbiol. Rev.* 30:564-595.
- Khan, N. A. 2009a. *Acanthamoeba. Biology and pathogenesis*. Academic Press. Norfolk, UK. Pp. 290.
- Khan, N. A. 2009b. Novel *in vitro* and *in vivo* models to study central nervous system infections due to *Acanthamoeba* spp. *Experimental parasitology*. 126:69-72.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L. y Paget, T. A. 2002. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol* 45:197-202.

- Khanna, V., Shastri, B. A., Anusha, G., Mukhopadhyay, C. y Khanna, R. 2014. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in immunocompetent: A case report and review of literature. *Tropical parasitology*. 4(2):115-118.
- Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J. R., y Russell, A. D. 1998. *Acanthamoeba castellanii*: Growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* 36(1):43-48.
- Kidney, D. D. y Kim, S. H. 1998. CNS infections with free-living amebas: neuroimaging findings. *Am. J. Roentgenol.* 171:809-812.
- Koide, J., Okusawa, E., Ito, T., Mori, S., Takeuchi, T., Itoyama, S. y Abe, T. 1998. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 17(4):329-332.
- Kremer, I., Cohen, E. J., Eagle, R. C., Udell, I. y Laibson, P. R. 1994. Histopathologic evaluation of stromal inflammation in *Acanthamoeba* keratitis. *CLAO J.* 20:45-48.
- Kulsoom, H., Baig, A. M., Siddiqui, R. y Khan, N. A. 2014. Combined drug therapy in the management of granulomatous amoebic encephalitis due to *Acanthamoeba* spp. And *Balamuthia mandrillaris*. *Experimental parasitology.* 145:115-120.
- Lalitha, M. K., Anandi, V., Srivastava, A., Thomas, K., Cherian, A. M. y Chandi, S. M. 1985. Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 21:666-667.
- Lloyd, D., Turner, N. A., Khunkitti, W., Hann, A. C., Furr, J. R., y Russell, A. D. 2001. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: Development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48(1):11-16.
- Ma, P., Visvesvara, G. S., Martinez, A. J., Theodore, F. H., Daggett, P. M. y Sawyer, T. K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev. Infect. Dis.* 12:490-513.
- Magnet, D. A. 2014. Epidemiología y diagnóstico de amebas de vida libre implicadas en salud humana. *Tesis de Doctorado*. Universidad Complutense de Madrid. España. Pp. 184.
- Marciano-Cabral, F. y Cabral G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 16(2):273-307.
- Maritschnegg, P., Sovinz, P., Lackner, H., Benesch, M., Nebl, A., Schwinger, W., Walochnik, J. y Urban, C. 2011. Granulomatous amoebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen. *J Clin Microbiol.* 49:446-448.
- Martínez, A. J. 1980. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection. *Neurology.* 30(6):567-574.

- Martínez, A. J. 1982. Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report. *J Neuropathol Exp Neurol* 41(5):548-557.
- Martínez, A. J. 1991. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis.* 13(5):399-402.
- Martínez, A. J., Markowitz, S. M. y Duma, R. J. 1975. Experimental pneumonitis and encephalitis caused by *Acanthamoeba* in mice: Pathogenesis and ultrastructural features. *The journal of Infectious Diseases* 131(6):692-699.
- Martínez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1991. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxida*. *Clin. Lab Med.* 11:861-872.
- Martínez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1997. Free Living, amphizoic and opportunistic Amebas. *Brain Pathol.* 7:583-598.
- Mattana, A., Serra, C., Mariotti, E., Delogu, G., Fiori, P. L. y Cappuccinelli, P. 2006. *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of Coxsackie b3 viruses. *Eukaryot Cell.* 5(4):665-671.
- May, R. G. y John, D. T. 1982. Intravenous infection of mice with *Naegleria fowleri*. *Folia Parasitologica (Phara)* 29:201-210.
- Murakawa, G. J., McCalmont, T., Altman, J., Telang, G. H., Hoffman, M. D., Kantor, G. R. y Berger, T. G. 1995. Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. *Arch Dermatol* 131(11):1291-1296.
- Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. R. y Steele, A. D. 1974. Amoebic infection of the eye. *The Lancet* 7896(304):1537-1540.
- Nieder Korn, J. Y., Alizadeh, H., Leher, H. y McCulley, J. P. 1999. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Springer Semin Immunopathol.* 21:147-160.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Diario Oficial de la Federación.* 22 de agosto de 2001.
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L. y Jongwutiwes, S. 2010. Identification of a novel t17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 48:4636-4640.
- Oddó, B. D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Rev. Chil. Infect.* 23(3):200-214.
- Oliva, S., Jantz, M., Tiernan, R., Cook, D. L. y Judson, M. A. 1999. Successful treatment of widely disseminated acanthamoebiasis. *South. Med. J.* 92:55-57.

- Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L. I., Cristóbal-Ramos, A. R., González-Lázaro, M., Salinas-Moreno, E., Méndez-Cruz, R., Sánchez-Cornejo, M., De la Torre-González, E. y Martínez-Palomo, A. 2010. *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of interaction with cornea human. *Experimental parasitology* 126:73-78.
- Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L. I., Lorenzo-Morales, J., Cristóbal-Ramos, A. R., Hernández-Ramírez, V. I., Talamás-Rohana, P., Méndez, C. A. R. y Martínez-Palomo, A. 2013. Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: Observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. *BioMed. Research International*. 2013:1-13.
- Omaña-Molina, M., Navarro-García, F., González-Robles, A., Serrano-Luna, J. J., Campos-Rodríguez, R., Martínez-Palomo, A., Tsutusmi, V. y Shibayama, M. 2004. Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after *In vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun* 72(6):3245-3251.
- Page, F. C. 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.* 14:709-724.
- Page, F. C. 1976a. *An illustrated key to freshwater and soil Amoebae with notes on cultivation and Ecology*. Freshwater Biol. Assoc. Ambleside. Cumbria. England. Pp. 155.
- Page, F. C. 1976b. Some comparative notes on the occurrence of *Gimnamoebia* (Protozoa: Sarcodina) in British and American habitats. *Transactions of the American Microscopical Society*. 95:385-394.
- Paltiel, M., Powell, E., Lynch, J., Baranowski, B. y Martins, C. 2004. Disseminated cutaneous acanthamebiasis: a case report and review of the literature. *Cutis*. 73(4):241-248.
- Petry, F., Torzewski, M., Bohl, J., Wilhelm-Schwenkmezger, T., Scheid, P., Walochnik, J., Michel, R., Zöller, L., Werhahn, K. J., Bhakdi, S. y Lackner, K. J. 2006. Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 44(5):1903-1904.
- Pussard, M. y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 13(4):557-598.
- Ramos, R. H. G. y Domingo, M. J. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Ciencia veterinaria*. 6:347-377.

- Rivera, M. A., y Padhya, T. A. 2002. *Acanthamoeba*: a rare primary cause of rhinosinusitis. *Laryngoscope* 112:1201–1203.
- Robert, V. B., y Rorke, L. B. 1973. Primary amebic encephalitis, probably from *Acanthamoeba*. *Ann. Intern. Med.* 79(2):174-179.
- Rodrigues, R. A. L., Abrahao, J. S., Drumond, B. P y Kroon, E. G. 2016. Giants among larges: how impacts giant virus entry into amoebae. *Current Opinion in Microbiology.* 31:88-93.
- Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L. y Campos-Rodríguez, R. 2004. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol. Res.* 94:31-36.
- Rucka, A. 1974. Obraz zmian histopatologicznych mozgowia i płuc myszy zarażonych patogennymi pełzakami wolnożyjącymi. *Wiad Parazytol*, 20:247-250.
- Salazar, V. L. I. 2007. Interacción de *Acanthamoeba* spp. con células MDCK, lentes de contacto y córneas de Hamster. *Tesis de Licenciatura* (Biólogo). FES Iztacala, UNAM. México. Pp. 89.
- Saxena, A., Mittal, S., Burman, P. Y Garg, P. 2009. *Acanthamoeba* meningitis with successful outcome. *Indian J Pediatr.* 76(10):1063-1064.
- Scheid, P. y Schwarzenberger, R. 2012. *Acanthamoeba* spp. as vehicle and reservoir of adenovirus. *Parasitol. Res.* 111(1):479-485.
- Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004a. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology.* 34:1001-1027.
- Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004b. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology.* 126:91-120.
- Seijo, M. M., González-Mediero, G., Santiago, P., Rodríguez, D. L., Diz, J., Conde, C. y Visvesvara, G. S. 2000. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 38:3892–3895.
- Siddiqui, R. y Khan, N. A. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and vectors.* 5(6):1-13.
- Sinclair, J. L., McClellan, J. F. y Coleman D. C. 1981. Nitrogen mineralization by *Acanthamoeba polyphaga* in grazed *Pseudomonas paucimobilis* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:667-671.

- Singhal, T., Banjpai, A., Kalra, V., Kabra, S. K., Samantaray, J. C., Satphaty, G. y Gupta, A. K. 2001. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobial. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 20(6):623-627.
- Sissons, J., Kim, K. S., Stins, M., Jayasekera, S., Alsam, S. y Khan, N. A. 2005. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinasedependent mechanism. *Infect Immun*. 73:2704-2708.
- Steenbergen, J. N., Nosanchuck, J. D., Malliaris, S. D. y Casadevall. 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* y *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and immunity*. 72(6):3478-3488.
- Steenbergen, J. N., Shuman, H. A. y Casadevall, A. 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 98(26):15245-15250.
- Stewart, G. L., Kim, I., Shupe, K., Alizadeh, H., Silvany, R., McCulley, J. P. y Niederkorn, J. Y. 1992. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. *J Parasitol*. 78:849-855.
- Tan, B., Weldon-Linne, C. M., Rhone, D. P., Penning, C. L. y Visvesvara, G. S. 1993. *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 117(10):1043-1046.
- Teknos, T. N., Poulin, M. D., Laruentano, A. M. y Li, K. K. 2000. *Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis, and treatment. *Am. J. Rhinol*. 14:387-391.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol*. 60(6):399-405.
- Turner, N. A., Harris, J., Russell, A. D. y Lloyd, D. 2000. Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol*. 89(5):751-759.
- Tyndall, R. L., Ironside, K. S., Metler, E. L., Tan, E. L., Hazen, T. C. y Fliermans, C. B. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Applied and environmental Microbiology*. 55:722-732.
- Van Klink, F., Taylor, W. M., Alizadeh, H., Jager, M. J., Van Rooijen, N. y Niederkorn, J. Y. 1996. The role of Macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 37(7):1271-1281.

- Vargas, V. P., Hurtado, M. R. y Villalobos, A. J. A. 2013. Esplenomegalia. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 56(2):37-45.
- Victoria, E. J. y Korn, E. D. 1975. Enzymes of phospholipid metabolism in the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Lipid. Res.* 16:54-60.
- Visvesvara, G. S., Moura, H. y Schuster, F. L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthis mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50(1):1-26.
- Visvesvara, G. S., Roy, S. L. Maguire, J. H. 2011. Pathogenic and opportunistic Free-Living Amebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia pedata*. En: Guerrant, R. L., Walker, D. H. y Weller, P. F. (Eds.). *Tropical infectious Diseases: Principles, pathogens and practice*. Hardcover. Pp. 707-713.
- Visvesvara, G. S. 2013 Infections with free-living amoebae. *Handb Clin Neurol.* 114:153-168.
- Volkonsky, M. 1931. *Hartmanella castellanii* Douglas, et classification des hartmannelles. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 72:317-339.
- Wang, X. y Ahearn, D. G. 1997. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr Microbiol.* 34(4):212-215.
- Walochnik, J., Obwaller, A. y Aspöck, H. 2000 Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4408-4413.
- Zegans, M. E., Becker, H.I., Budzik, J. y O'Toole, G. 2002. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol.* 21:415-420.