



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS
EVENTOS TEMPRANOS DE LA INVASIÓN DE
Acanthamoeba castellanii EN UN MODELO
MURINO DE PIEL IRRADIADA CON LUZ UV-B**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

BRENDA MARIANA HERNÁNDEZ JASSO



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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Amibas anfitozoicas	11
2.2 <i>Acanthamoeba</i> spp.	11
2.3 Ciclo de vida	12
2.3.1 Trofozoíto	13
2.3.2 Quiste	14
2.4 Clasificación taxonómica	16
2.5 Importancia ecológica	16
2.6 Importancia médica	17
2.6.1 Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)	17
2.6.2 Queratitis amibiana (QA)	18
2.6.3 Acanthamebosis cutánea	19
2.6.3.1 Cuadro clínico	19
2.6.3.2 Diagnóstico	20
2.6.3.3 Tratamiento	21
2.6.3.4 Pronóstico	21
2.6.3.5 Histopatología	22
2.7 Mecanismos de patogenicidad	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares	27
5. MATERIALES Y MÉTODO	28
5.1 Cultivo amibiano	28
5.2 Reactivación de virulencia	28
5.3 Obtención de suero hiperinmune anti <i>A. castellanii</i>	29
5.4 Modelo murino de irradiación crónica con luz UV-B	30
5.5 Inoculación intradérmica e interacción en lesiones cutáneas	31
5.6 Inmunohistoquímica	33
6. RESULTADOS	34

6.2	Reactivación de virulencia	35
6.3	Obtención de suero hiperinmune anti- <i>A. castellanii</i>	36
6.4	Análisis histológico de piel irradiada con luz UV-B	37
7.	DISCUSIÓN	47
8.	CONCLUSIONES	53
9.	PERSPECTIVAS	54
10.	LITERATURA CITADA	55
11.	ANEXOS	69

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Maritza Aurelia Omaña Molina en el laboratorio de Amibas anfibias, el procesamiento de muestras para la obtención de cortes histológicos se llevó a cabo en el laboratorio de Histología por el Biol. José del Carmen Benítez Flores y la Mtra. María de Rosario González Valle, en la Unidad de Morfofisiología y Función (UMF) dentro de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis Maritza Omaña, académica entregada a su carrera a quien admiro y agradezco por creer en mí y por su apoyo incondicional, tanto personal como académico, en todo momento. Así mismo, a mi asesora María Dolores Hernández por sus consejos, orientación, incondicional disponibilidad, revisión y enriquecimiento del presente trabajo. Es invaluable el conocimiento que me han brindado de manera directa e indirecta, las experiencias y los buenos momentos, muchas gracias Doctora y maestra.

Agradezco al comité evaluador de tesis integrado por el Dr. José Guillermo Ávila Acevedo jefe del laboratorio de Fitoquímica, al Biol. José del Carmen Benítez Flores y la Dra. Isis Gallegos Hernández por tus oportunas observaciones y sugerencias en la realización de este trabajo.

Gracias a cada profesor que me apoyó a lo largo de mi carrera universitaria porque con su desempeño académico supieron infundir en mí la admiración y el respeto a nuestra Universidad.

A mis amigos; Valeria del Carmen Rosas Balderas por ser una verdadera amiga, todos los años que hemos compartido juntas me han demostrado que eres una de las personas más especiales en mi vida, alguien que me quiere de manera incondicional, te quiero muchísimo. Alejandro García Pérez, gracias amigo por todos tus consejos y ayudas.

Y gracias a todos aquellos que forman parte de mi vida y que están a mi lado apoyándome y alentándome, gracias por permitirme aprender más de la vida a su lado

Finalmente, agradezco a la vida por lo hermosa y bondadosa que ha sido conmigo.

DEDICATORIA

Quisiera dedicar este trabajo con todo mi amor y gratitud

A MI MADRE

Guadalupe Jasso Rojas. Por su dedicación, sacrificio y lucha inquebrantable por sacarnos adelante a mi hermana Daniela y a mí. Gracias por apoyarme a pesar de cualquier adversidad que se pudiera presentar. Te dedico mi trabajo y mi título porque sin ti no hubiera llegado a cumplir este logro en mi vida.

A MI PADRE

José Luis Hernández Cruz. Eres quien con esfuerzo me dio lo que no tuvo. Espero poder conseguir la forma más justa de expresar el querer que te tengo. Gracias por darme las fuerzas para triunfar en la vida.

A MI HERMANA

Daniela. Por estar siempre en las buenas y en las malas, con quien he compartido alegrías, risas y tristezas que nunca olvidaré. Gracias por todo, y a pesar de las pocas peleas, somos hermanas y siempre estaremos juntas; no hubiera sido lo mismo recorrer este camino sin ti.

Gracias familia, por ser mi constante motivación; ésta tesis es un logro más que llevo a cabo, y sin lugar a dudas ha sido en gran parte gracias a ustedes.

Los amo.

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie

“Fija tu mundo a una estrella y podrás navegar a través de cualquier tormenta”.

Leonardo Da Vinci

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi.

RESUMEN

Las amibas del género *Acanthamoeba* son protozoos oportunistas, que juegan un papel ecológico importante como organismos de vida libre controlando poblaciones bacterianas. Así mismo, han cobrado importancia médica debido a que bajo ciertas condiciones pueden causar patologías en vagina, próstata, riñón, pulmón, corazón, hígado y bazo, destacando la infección en córnea por el número de casos registrados. No menos importante, es la encefalitis amibiana granulomatosa y la acanthamebosis cutánea pues las amibas son capaces de proliferar e inducir úlceras en personas que han sufrido lesiones cutáneas o quemaduras, así como en personas inmunosuprimidas, con VIH y cáncer, lo que puede constituir el primer foco de infección para posteriormente diseminarse a otros órganos.

Hasta el momento, no se han descrito los mecanismos de patogenicidad de estas amibas en piel, es por ello que en el presente trabajo se describen los eventos morfológicos tempranos de la infección inducida por *Acanthamoeba castellanii* en un modelo murino de piel irradiada con luz UV-B en tres ratones de la cepa SKH-1, en los que se siguieron varios esquemas de interacción con las amibas: **Grupo 1.** Dos ratones presentaron lesiones cutáneas, uno de estos una lesión eritematosa y el otro un carcinoma de células escamosas en las cuales se realizó la interacción de trofozoítos de *A. castellanii* directamente sobre la zona de lesión; así mismo se determinaron cinco zonas de inoculación intradérmica en la parte dorsal. El ratón con la lesión eritematosa se sacrificó a las 48 h post- interacción y el ratón con un carcinoma se mantuvo bajo observación hasta la posible aparición de signos de infección en SNC, lo cual ocurrió a los 18 días post- interacción, por lo que se decidió sacrificar.

Grupo 2. Uno de los ratones no mostró lesión cutánea aparente y en éste se realizó la inoculación intradérmica de *A. castellanii* en cinco zonas preestablecidas del dorso y fue sacrificado 24 h post- inoculación.

Grupo control. La zona ventral (no irradiada) de cada ratón se consideró como control, se marcaron cinco puntos donde se inoculó la misma cantidad de trofozoítos.

Posterior al sacrificio se cortaron secciones de piel, quedando en el centro el sitio de inoculación o zona de lesión. Se procesaron por la técnica histológica

convencional y se obtuvieron cortes de 3 - 5 μm , los cuales fueron procesados mediante inmunohistoquímica, utilizando suero hiperinmune de conejo anti-*A. castellanii*. Algunas laminillas fueron procesadas mediante la técnica convencional de hematoxilina-eosina.

En la zona de la lesión eritematosa del ratón sacrificado a las 48 h post- interacción se localizaron trofozoítos en óptimas condiciones a lo largo de la dermis, adosados a adipocitos y adheridos a las fibras de colágena y los espacios interfibrilares. En zonas inoculadas intradérmicamente, se localizaron trofozoítos invadiendo dermis y migrando hacia la hipodermis, adosados a adipocitos y adheridos a tejido conjuntivo, así como rodeando y cercanos a vasos sanguíneos tanto en hipodermis como en músculo.

En zonas cercanas al carcinoma del ratón sacrificado 18 días post- interacción se localizaron varios trofozoítos en óptimas condiciones y de manera constante penetrando y migrando en epidermis, dermis e hipodermis a través de las uniones celulares, del mismo modo, como lo hacen en córnea humana y córnea de hámster; los trofozoítos se adhirieron, migraron y penetraron a través de las uniones celulares interaccionando con componentes dérmicos tales como quistes pilosos y adipocitos y rodeando vasos sanguíneos, lo que sugiere su diseminación por vía hematológica pues se localizaron trofozoítos en bazo, hígado y cerebro sin la presencia de infiltrado inflamatorio aparente.

En el grupo 2 se observaron menor cantidad de trofozoítos por campo de observación en el microscopio en comparación con el grupo 1, sin embargo, se ubicaron cerca de adipocitos, glándulas sebáceas y quistes pilosos. Cabe destacar, que no se observa un daño aparente en el tejido o citólisis en el tejido en ambos grupos, sin embargo se observa actividad colagenolítica cercana a los trofozoítos.

Las muestras control mostraron capas celulares homogéneas, sin actividad colagenolítica y sin presencia de trofozoítos.

Con ello se concluye que las amibas invaden principalmente dermis e hipodermis en ambos grupos experimentales, mostrando actividad colagenolítica. Así mismo, *A. castellanii* puede invadir áreas de piel expuestas o dañadas por la luz UV-B e invadir desde este foco primario, vía hematológica el SNC causando encefalitis amibiana granulomatosa.

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, que habitan ambientes como el suelo, agua y aire, utilizando este último como medio de dispersión (Schuster, 2002), entre ellos hay varias especies del género *Acanthamoeba* y sólo una especie de cada género: *Balamuthia* (*B. mandrillaris*), *Naegleria* (*N.fowleri*) y *Sappinia* (*S. pedata*) causan infecciones (Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara, *et al.*, 2007), razón por la cual son conocidos como microorganismos anfizoicos, debido a que tienen la capacidad de existir en el medio ambiente como organismos de vida libre o como parásitos oportunistas. Dentro de este grupo, varias especies del género *Acanthamoeba*; *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes* y *A. hatchetti*; la mayoría ubicadas molecularmente en el grupo T4, son agentes etiológicos de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), queratitis amibiana (QA) y acanthamebosis cutánea (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Koshy *et al.*, 2009). No se cuenta con datos epidemiológicos certeros sobre la incidencia de estas patologías. Así mismo, su diagnóstico por lo general no se lleva a cabo tempranamente, aunado a que no existe un tratamiento de elección 100% efectivo que ofrecer a los pacientes afectados (Schuster y Visvesvara, *op. cit.*).

La EAG es una infección subaguda o crónica que cursa con necrosis y lesiones inflamatorias, cuya vía de entrada puede ser hematológica o a través de las vías respiratorias, afectando principalmente a personas inmunocomprometidas (Martínez, 1991). Cabe destacar, que recientemente se han reportado 15 casos de EAG en personas inmunocompetentes, con esclerosis múltiple (Massilamany *et al.*, 2014; Libbey *et al.*, 2014), así como casos asociados con trasplantes de órganos (Barsoum, 2004; Visvesvara, 2015; Kandukuri *et al.*, 2015; Winsent *et al.*, 2017; Bronfield *et al.*, 2017). No menos importante, es la QA; infección corneal dolorosa, de difícil resolución, que se presenta por lo general en personas aparentemente sanas y en usuarios de lentes de contacto (Omaña-Molina *et al.*, 2010), su curso es crónico y se caracteriza por una necrosis progresiva del epitelio corneal y destrucción de la lamela estromal que puede causar la pérdida del ojo (Martínez y Visvesvara, 1997).

En la piel, las amibas también pueden proliferar e inducir úlceras en personas que han sufrido lesiones cutáneas. Los factores de riesgo para la infección cutánea por *Acanthamoeba* incluyen áreas traumatizadas, como cicatrices quirúrgicas, lesiones cutáneas ocasionadas por el virus de varicela-zóster, mordeduras (Gullet *et al.*, 1979) y traumatismos mecánicos (Walia *et al.*, 2007), así como quemaduras (Rivera *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 1995; Van-Hamme *et al.*, 2001). Son más susceptibles a presentar lesiones cutáneas ocasionadas por estos protozoos, personas inmunosuprimidas, que cursan VIH y cáncer, lo que puede constituir el primer foco de la infección, para posteriormente diseminarse a otros órganos (Friedland *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1993; Murakawa *et al.*, 1995; Marciano-Cabral y Cabral, *op. cit.*). Sin embargo, también se argumenta que las lesiones en piel podrían ser la fase terminal de la invasión amibiana (Pathiel *et al.*, 2004).

Hasta el momento, no se cuenta con datos epidemiológicos certeros sobre la incidencia de estas patologías. Así mismo, su diagnóstico por lo general no se lleva a cabo tempranamente, y no existe un tratamiento de elección 100% efectivo que ofrecer a los pacientes afectados (Schuster y Visvesvara, *op. cit.*).

Balamuthia mandrillaris es otra especie del grupo de amibas anfizoicas relacionada con infecciones en piel, en la que se ha reportado que posiblemente los factores ambientales sean predisponentes y generen diferencias en la presentación clínica de la infección (el polvo ambiental, luz UV-B), así como actividades relacionadas con la jardinería/suelo (Cabello-Vílchez, 2016). Lo cual hasta el momento no se ha reportado en *Acanthamoeba*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Amibas anfizoicas

Las amibas anfizoicas son microorganismos eucariotas aerobios ampliamente distribuidos en la naturaleza y el ambiente humano, que como se ha mencionado, viven en el medio ambiente como organismos de vida libre y bajo ciertas circunstancias son capaces de provocar infecciones agudas, subagudas y crónicas en el ser humano y diversos animales (Visvesvara, 2010; Visvesvara y Maguire, 2006).

2.2 *Acanthamoeba* spp.

Dentro del grupo de amibas anfizoicas, destacan las del género *Acanthamoeba*, ya que son agentes etiológicos de diversas patologías, resaltando las que se producen en SNC, ojo y piel.

El término *Acanthamoeba* deriva de "acanto" término griego que significa "espina" para indicar la presencia de finas proyecciones en la superficie de estos protozoos, conocidas como acantópodos (Siddiqui y Khan, 2012).

Acanthamoeba fue descrita por primera vez por Castellani en 1930, cuando reportó la presencia de amibas en un cultivo de *Criptococcus pararoseus* (Castellani, 1930), las cuales fueron ignoradas por ser consideradas sólo como organismos contaminantes durante las siguientes tres décadas. No fue sino hasta que, en 1958, Culbertson reportó su potencial patogénico al demostrar un efecto citopático en cultivos de células de riñón de mono (Culbertson *et al.*, 1958). Jager y Stamm observaron en 1972 el primer caso comprobado de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) en humanos (Jager y Stamm, 1972), mientras que el primer caso de queratitis por *Acanthamoeba* se notificó en 1974 (Nagington *et al.*, 1974).

2.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de las especies de *Acanthamoeba* involucra dos estadios: una forma activa denominada trofozoíto y una forma latente conocida como quiste (Figura 1). El trofozoíto varía en tamaño de 25 a 40 μm y se alimenta de bacterias, algas y levaduras a través de fagocitosis, aunque también puede vivir en forma axénica por medio de la captación de nutrientes disueltos en el ambiente, a través de pinocitosis (Marciano- Cabral y Cabral, *op. cit.*; Castrillon y Orozco, 2013).

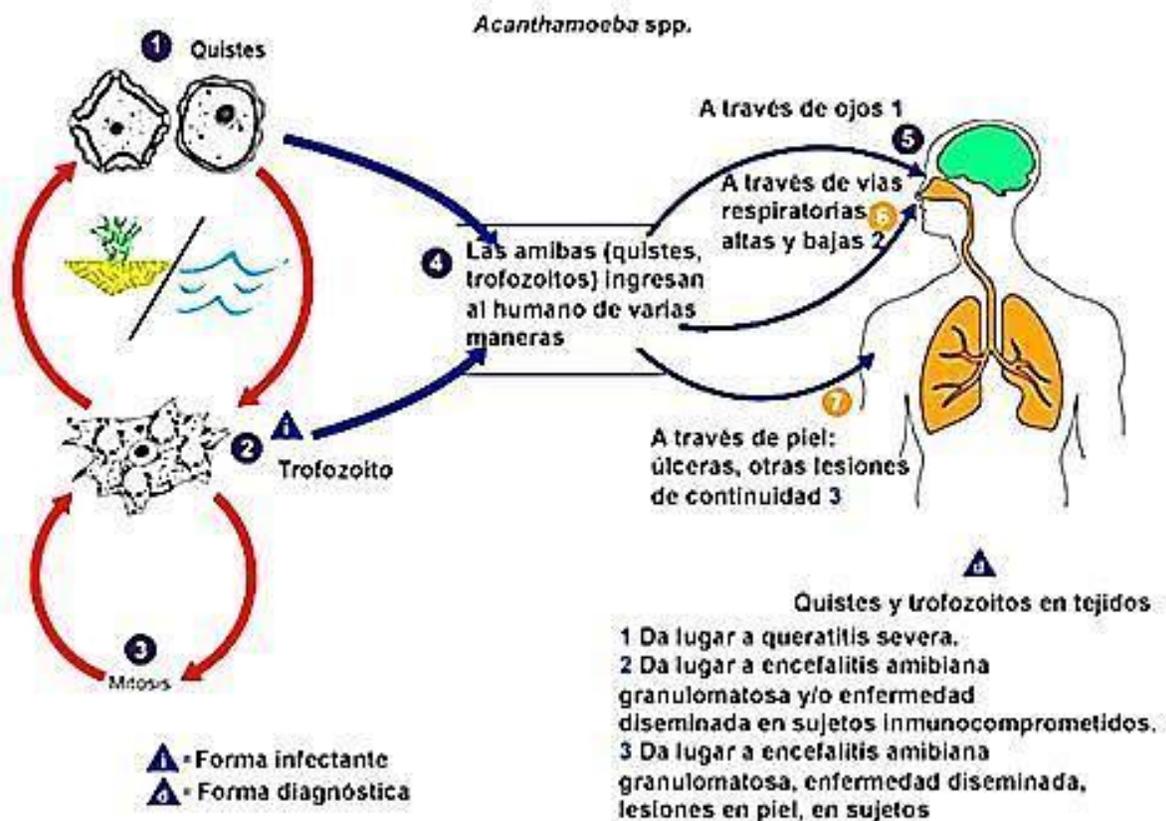


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Acanthamoeba*. *Acanthamoeba* tiene dos etapas; quistes 1 y trofozoítos 2 en su ciclo de vida. Los trofozoítos se replican por mitosis (la membrana nuclear no permanece intacta) 3. Los trofozoítos son las formas infecciosas, aunque tanto los quistes como los trofozoítos pueden ingresar al cuerpo 4 a través de diversas maneras, a través del ojo 5, los conductos nasales al tracto respiratorio inferior 6 o piel ulcerada o rota 7. Cuando *Acanthamoeba* spp. entra al ojo, puede causar queratitis severa en individuos sanos, particularmente en usuarios de lentes de contacto 1. Cuando ingresa al sistema respiratorio o a través de la piel, puede invadir el

sistema nervioso central por diseminación hematogena causando encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) o enfermedad diseminada **2**, o lesiones cutáneas **3** en individuos con sistemas inmunes comprometidos (Versión en español de CDC (Centers for Disease Control and Prevention) por Gómez- Marín, 2010).

2.3.1 Trofozoíto

En preparaciones frescas, los trofozoítos de las diferentes especies de *Acanthamoeba* muestran una morfología irregular, resaltando la emisión de los característicos acantópodos alrededor del cuerpo ameboideo. El tamaño de los trofozoítos varía acorde a cada especie, con promedios de 20 a 40 μm en términos generales; 21 a 45 μm para *A. castellanii*; 25 a 60 μm para *A. astronyxes*, y 14 a 41 μm para *A. polyphaga*. El citoplasma es abundante, con aspecto granular y vacuolar; además tienen un núcleo claro, central y esférico con un prominente y denso nucléolo redondeado (Oddó, 2006) (Figura 2).

Los acantópodos permiten que el trofozoíto se adhiera a las superficies y eventualmente fagocite otros microorganismos: bacterias, algas, levaduras o pequeñas partículas orgánicas, así como células de los tejidos blanco. La reproducción es por fisión binaria. Contiene una o más vacuolas contráctiles prominentes que permiten la expulsión de agua para la regulación osmótica. Contienen vacuolas digestivas y una gran cantidad de gránulos que contienen glucógeno (Siddiqui y Khan, *op. cit.*).

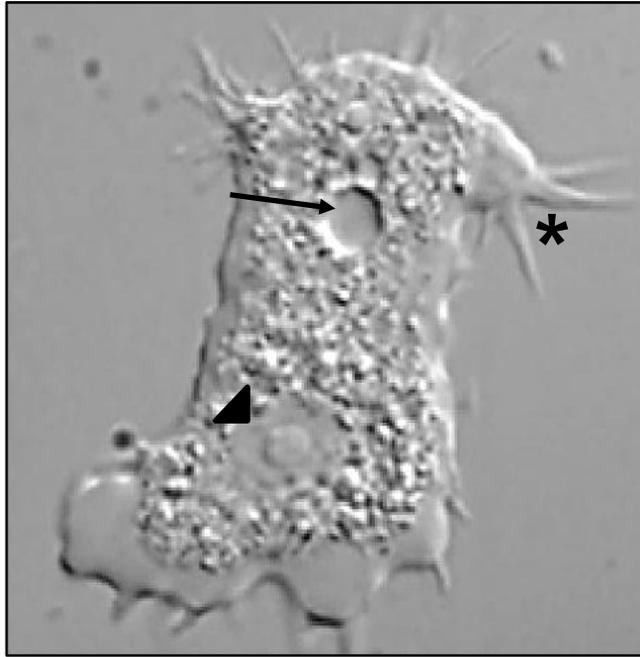


Figura 2. Microfotografía de trofozoíto de *Acanthamoeba castellanii*, con sus característicos acantópodos (*) en forma de espinas. Núcleo (cabeza de flecha) y vacuola contráctil (flecha) son prominentes (Kong, 2009).

2.3.2 Quiste

Cuando las condiciones del medio ambiente no son favorables para su desarrollo, los trofozoítos, bajan su metabolismo, se redondean formando un “quiste”, el cual en su forma madura está conformado de una doble pared (endo y ectoquiste) (Khan, 2006) (Figura 3).

Los quistes son esféricos (8 - 29 μm); la pared externa puede ser lisa o rugosa (cuenta con proteínas y lípidos) y la interna poligonal, estelar o globular (con carbohidratos, entre ellos celulosa, lo que confiere alta resistencia). El ecto y endoquiste pueden unirse en ciertas zonas llamadas opérculos (de baja resistencia a fármacos), sellados por ostiolos. Cuando las condiciones son de nuevo favorables, los trofozoítos emergen a través de los opérculos, dejando el quiste vacío (Page, 1988; Trabelsi *et al.*, 2012).

Se ha observado recientemente que *Acanthamoeba* spp., puede sufrir una rápida diferenciación, particularmente ante propilenglicol y soluciones oftálmicas que lo

contienen, transformándose en unas estructuras de bajo metabolismo, conocidas como "seudoquistes", "cuerpos refráctiles", "cuerpos redondos", no móviles, que constituyen un riesgo adicional de infección. Estos pseudoquistes presentan una única capa, y revierten más fácilmente a la forma de trofozoíto cuando las condiciones ambientales son adecuadas para su desarrollo (Kliescikova *et al.*, 2011; Ahearn *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2013).

La morfología quística permite distinguir al género *Acanthamoeba* del resto de las amibas; además sus quistes resisten a condiciones adversas del medio ambiente entre ellos: escases de alimento y cambios en la temperatura y pH (Chagla y Griffiths, 1974; Bonilla, *et al.*, 1999;). Se ha probado que resisten la desecación y bajas temperaturas (4 °C) por más de 20 años (Brown *et al.*, 1978; Visvesvara *et al.*, *op. cit.*), cloración e incluso una amplia variedad de agentes antimicrobianos (De Jonckheere y Van de Voorde, 1976; Khunkitti *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001).

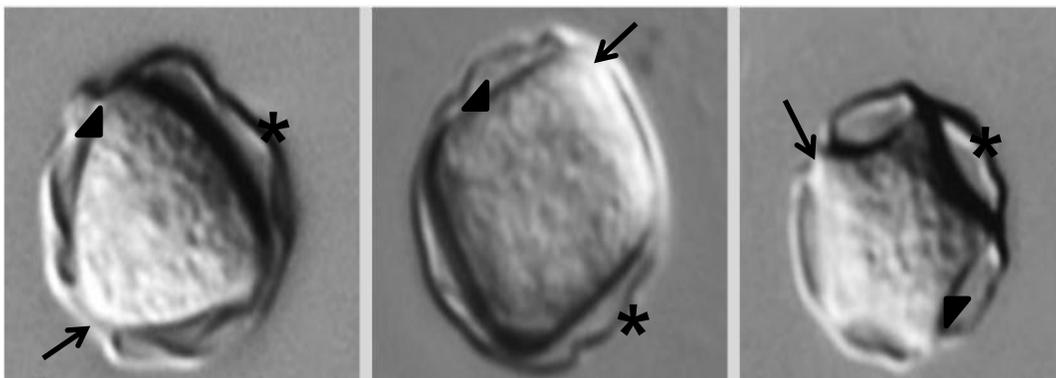


Figura 3. Morfología de quistes de *Acanthamoeba*, se observa el ecto y endo quiste separados entre sí y unidos en ciertas zonas llamadas opérculos (flechas). El arreglo del exo (*) y endoquiste (cabeza de flecha) puede conformar diferentes números de brazos (Kong, *op cit.*).

2.4 Clasificación taxonómica

Se han identificado más de 24 especies de *Acanthamoeba* acorde a criterios morfológicos. De éstas, las especies más comúnmente asociadas con infecciones humanas son *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. astronyxix*, *A. divionensis* y *A. polyphaga* (Khan, *op. cit.*). Estas especies se clasificaron inicialmente en tres grupos según la morfología y tamaño del quiste, sin embargo, actualmente se recomienda la identificación molecular, la cual las organiza en genotipos y no en especies, a través de un análisis de secuencias de la subunidad 18S del ARN ribosomal; con esta técnica se han conformado 20 genotipos; denominados T1 hasta T20 (Corsaro *et al.*, 2015). Los casos clínicos se relacionan en mayor grado con el genotipo T4 (Siddiqui y Khan, *op. cit.*; Trabelsi *et al.*, *op. cit.*).

2.5 Importancia ecológica

El género *Acanthamoeba* tiene un hábitat muy amplio y diverso, aislándose de: suelos húmedos, agua dulce o salobre, vegetales en descomposición y del aire que utilizan como medio de dispersión. Estos protozoos en su fase de trofozoíto se alimentan selectivamente de bacterias y materia orgánica, actuando como pequeños depredadores controlando más del 50% de las poblaciones bacterianas, cumpliendo así un papel importante dentro del ciclo de nutrientes; consumiendo a los descomponedores primarios y estimulando 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; Tyndall *et al.*, 1989). En estado quístico, pueden ser fácilmente diseminados hacia el medio ambiente por acción del viento, con lo que se explica su gran distribución en los diferentes hábitats que le ofrece la naturaleza (De Jonckheere, 1979; Rivera, 1988, John, 1993).

Es un género frecuentemente aislado del suelo (Rodríguez-Zaragoza, 1994), llegando a sobrevivir en hábitats acuáticos (Arias-Fernández *et al.*, 1989; Sawyer, 1990; Sawyer *et al.*, 1992).

La ubicuidad de estos organismos en la tierra y la superficie de zonas acuáticas sugiere que la mayoría de los seres humanos estamos expuestos a estos patógenos, aún más en casos de enfermedades leves o subclínicas en piel y vías respiratorias que no son diagnosticadas (Kingston *et al.*, 1969; Casemore, 1977; Barbeau y Buhler, 2001).

2.6 Importancia médica

Las enfermedades causadas por estos protozoos, si bien no constituyen un problema de salud pública, si representan un problema para las personas que las padecen; por su dificultad en el diagnóstico y tratamiento poco exitoso, haciéndolas relevantes clínicamente. Así mismo, a pesar de la baja morbilidad, la EAG por ejemplo se caracteriza por una tasa de mortalidad relativamente alta, lo que constituye un gran desafío clínico para el establecimiento de un diagnóstico y una terapia eficientes. (Visvesvara, *et al.*, 2007; Diaz, 2017).

Es importante resaltar que *Acanthamoeba* spp., son reservorios de algunas bacterias patógenas para el ser humano, como *Legionella pneumophila*, (Rowbotham, 1980), *Escherichia coli* O157 (Barker *et al.*, 1999), *Coxiella burnetii* (La Scola y Raoult, 2001), *Pseudomonas aeruginosa* (Michel *et al.*, 1995); *Vibrio cholerae* (Thom *et al.*, 1992), *Helicobacter pylori* (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002), *Simkania negevensis* (Kahane *et al.*, 2001), *Listeria monocytogenes* (Ly y Muller, 1990) y *Mycobacterium avium* (Krishna-Prasad y Gupta, 1978; Steinert *et al.*, 1998).

2.6.1 Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)

Hasta la fecha, se han reportado más de 150 casos de EAG causados por *Acanthamoeba*, entre ellos, 11 casos de huéspedes inmunocompetentes (Reddy, *et al.* 2011) y el resto en pacientes inmunocomprometidos, incluidos pacientes con síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Visvesvara *op. cit.*). El diagnóstico oportuno de esta patología es muy importante, aunque puede ser difícil debido a síntomas no específicos (Król-Turmińska y Olender, 2017).

La vía de entrada de este protozoo es a través de las vías respiratorias o lesiones cutáneas contaminadas con tierra. No se ha informado de una asociación entre el

contacto con el agua y la infección, aunque no se descarta como posible ruta de infección. Después de la exposición primaria, la amiba invade el torrente sanguíneo y se disemina de manera hematogena al cerebro. Durante la infección los trofozoítos pueden migrar por vía hematogena invadiendo otros órganos fuera del SNC, como la piel, pulmones, riñones, senos paranasales, o incluso los huesos (Selby *et al.*, 1998; Jung, *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2008; Breland y Beckmann, 2016).

Además de la generación de manifestaciones clínicas en seres humanos, se ha reportado la EAG por *Acanthamoeba* en animales; por ejemplo, se han publicado cuatro casos en caballos, ovejas y bovinos (Dwivedi y Singh 1965; Fuentealba *et al.* 1992) así también, han sido aisladas de animales incluyendo especies de peces, anfibios, reptiles y mamíferos. Lo anterior demuestra que el diagnóstico de este género a nivel veterinario también debe ser considerado (Chamorro *et al.*, 1988; Dyková *et al.*, 1999; Madrigal Sesma, 1988; Walochnik *et al.*, 1999; Kinde *et al.*, 2007).

2.6.2 Queratitis amibiana (QA)

La queratitis por *Acanthamoeba* (QA) es una patología ocular de curso crónico y de difícil resolución, comúnmente asociada al uso de lentes de contacto, corresponde a un proceso inflamatorio crónico activo, caracterizado por presentar una necrosis progresiva del epitelio corneal y destrucción de la lamela estromal (Niederkon *et al.*, 1992).

Esta infección es frecuentemente mal diagnosticada, confundiendo con una queratitis herpética o micótica. Hasta el momento, no existe un tratamiento farmacológico de elección que resuelva favorablemente esta patología.

Comúnmente sólo un ojo es el afectado, sin embargo, se han reportado casos de queratitis bilateral (Visvesvara *et al.*, 2007).

Los principales factores de riesgo asociados con QA incluyen el uso de soluciones de lentes de contacto contaminadas, así como el uso de lentes de contacto durante períodos prolongados, soluciones multipropósitos para lentes, la ducha mientras se usan lentes de contacto y la mala higiene de las lentes de contacto (Parmar *et al.*, 2006).

El número de personas afectadas está aumentando en todo el mundo, lo que se correlaciona con el creciente número de usuarios de lentes de contacto (Page y William, 2013). Aunque hasta el momento no se cuenta con datos epidemiológicos certeros, en 2006 se habían reportado más de 6000 casos, lo que la convierte en la patología provocada por amibas anfitrónicas con más casos reportados.

Entre las especies que han sido implicadas como agentes etiológicos de QA, destaca: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. culbertsoni* y *A. hatchetti* (Visvesvara, *op. cit.*).

2.6.3 Acanthamebosis cutánea

La acanthamebosis cutánea se considera una infección oportunista poco frecuente, particularmente en pacientes inmunocomprometidos con VIH, con o sin afectación del SNC, aunque se han reportado unos cuantos casos en personas inmunocompetentes (Galarza, *et al.*, 2009; Martínez, *et al.*, 2010).

La acanthamebosis cutánea es a menudo un reflejo de una enfermedad diseminada, es una infección cada vez más reconocida desde la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y el uso de fármacos inmunosupresores (Paltiel *et al.*, *op. cit.*). El primer caso de infección cutánea por *Acanthamoeba*, se reportó en un paciente con SIDA (González, *et al.*, 1986).

Los factores de riesgo incluyen áreas traumatizadas, como cicatrices quirúrgicas, lesiones virales, picaduras y traumatismos mecánicos (Torno, *et al.* 2000; Walia, *et al.*, *op. cit.*; Ríos, *et al.*, 2012).

2.6.3.1 Cuadro clínico

Las lesiones cutáneas características incluyen: nódulos, pústulas, pápulas y ulceraciones de la piel que contienen trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba*. Los sitios afectados con mayor frecuencia son la cara, el tronco y las extremidades (Walia *et al.*, *op. cit.*). Estas lesiones cutáneas primarias pueden preceder por semanas o meses al cuadro neurológico semejando una leishmaniosis cutánea (Torres, *et al.*, 2005).

Las lesiones cutáneas están presentes en el 90% de los pacientes con acanthamebiasis diseminada, por lo que es el signo más común de esta

enfermedad. Las lesiones cutáneas primarias son polimórficas y se describen comúnmente como nódulos intradérmicos (Hunt *et al.*, *op. cit.*) o subcutáneos (Slater *et al.*, 1994; Chandrasekar *et al.*, 2007), eritematosos violáceos (Sissons *et al.*, 1995; Casper *et al.*, 1999; Rosenberg y Morgan, 2001), que varían de unos pocos milímetros a varios centímetros de diámetro. Además, se han descrito pápulas (Deluol *et al.*, 1996; Dunand *et al.*, 1997), pústulas (Murakawa *et al.*, *op. cit.*), celulitis (Van-Hamme *et al.*, *op. cit.*) y abscesos intramusculares (Migueles y Kumar, 1998). Las lesiones pueden ser pruriginosas, sensibles o no sensibles, y generalmente evolucionan a través de un curso de aumento de tamaño, supuración y ulceración. Se puede desarrollar una escara necrótica y luego desprenderse, lo que profundiza la úlcera (Schwarzwald *et al.*, 2003). El diagnóstico diferencial de las lesiones cutáneas nodulares y ulcerativas es amplio e incluye infecciones fúngicas o micobacterianas profundas, pioderma gangrenoso y vasculitis (Paltiel *et al.*, *op. cit.*). Los síntomas a menudo incluyen fiebre (Tan *et al.*, *op. cit.*) congestión / secreción nasal (Rivera y Padhya, 2002) epistaxis y tos. Los pacientes con compromiso presunto o confirmado del SNC desarrollaron dolores de cabeza (May *et al.*, 1992) fiebre, estado mental alterado, hemiparesia, letargo, espasticidad, y convulsiones (Wiley *et al.*, 1987).

2.6.3.2 Diagnóstico

Esta infección cutánea es una enfermedad que raras veces es diagnosticada y tratada en etapas tempranas, sin embargo, su diagnosis puede brindar una oportunidad para el diagnóstico temprano de la infección del SNC (Pritzker *et al.*, 2004).

El diagnóstico diferencial de las lesiones cutáneas nodulares y ulcerativas es amplio e incluye infecciones fúngicas o micobacterianas profundas, pioderma gangrenoso y vasculitis (Paltiel *et al.*, *op. cit.*), incluye la observación de trofozoítos y/o quistes en cortes histológicos, tinción de frotis, ensayos de inmunofluorescencia, cultivo en placas de agar sin nutrientes sembradas con bacterias como fuente de alimento o cultivo de tejidos. Más recientemente, se han utilizado ensayos de PCR que apoyan el diagnóstico certero (Trabelsi, *et al.*, *op. cit.*).

2.6.3.3 Tratamiento

El tratamiento de la acanthamebosis cutánea, sin afectación del SNC, incluye aplicaciones tópicas de gluconato de clorhexidina y crema de ketoconazol, además de isetionato de pentamidina, ketoconazol, sulfadiazina, flucitosina, fluconazol o itraconazol que tienen resultados terapéuticos exitosos (Trabelsi, *et al.*, *op. cit.*).

La recuperación de los pacientes no sólo depende del tratamiento, sino de su estado inmunitario, la virulencia de la cepa amibiana, de un rápido diagnóstico y de un tratamiento adecuado y oportuno (Peralta y Ayala, 2009).

2.6.3.4 Pronóstico

El pronóstico de la acanthamebosis cutánea es sombrío, con una tasa de mortalidad de al menos 75% en pacientes sin afectación del SNC y 100% en pacientes con afectación (Paltiel *et al.*, *op. cit.*). De los casos registrados, el lapso de tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad hasta la muerte, osciló de 9 semanas a 2 años (promedio, 7.5 meses). El desarrollo de síntomas del SNC en pacientes VIH positivos con acanthamebosis cutánea provocó la muerte de todos los pacientes en periodos de días o semanas después de la aparición de los síntomas (Martínez, 1982; Im y Kim, 1998).

Además de los pacientes con VIH / SIDA, se ha descrito acanthamebosis cutánea no asociada con VIH, en pacientes inmunosuprimidos de 7 a 61 años (media, 35 años) (Oliva *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2002).

Se ha reportado que posiblemente los factores ambientales como el polvo ambiental, luz UV-B, así como actividades relacionadas con la jardinería/suelo sean predisponentes y generen diferencias en la presentación clínica de infecciones en piel por *Balamuthia mandrillaris*, otra especie del grupo de amibas anfitoicas relacionada con infecciones en piel (Cabello-Vílchez, *op. cit.*). Lo cual hasta el momento no se ha reportado en *Acanthamoeba*.

2.6.3.5 Histopatología

Son escasos los reportes que incluyen una descripción histopatológica de infecciones en piel y en general de las patologías que provoca *Acanthamoeba*. Pathiel *et al.*, en 2004, describieron el caso de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) con lesiones cutáneas diseminadas y en el que se realizó un diagnóstico de acanthamebosis cutánea basándose en los resultados de una biopsia de piel. Se observó un infiltrado inflamatorio de linfocitos inmersos en la dermis profunda, en tejido conectivo y subcutáneo, así como neutrófilos, células plasmáticas y eosinófilos. Se observaron áreas difusas de colágeno y necrosis grasa en todas las áreas de inflamación. Numerosos trofozoítos de *Acanthamoeba* se dispersaron por todo el infiltrado inflamatorio.

Otras características histopatológicas descritas incluyen leucocitoclastia (Helton *et al.*, 1993; Deluol *et al.*, *op. cit.*) o necrosis (Sissons *et al.*, 2006; Casper *et al.*, *op. cit.*), vasculitis, paniculitis, (Anderlini *et al.*, 1994; Murakawa *et al.*, *op. cit.*; Rosenberg y Morgan, *op. cit.*) e inflamación aguda y / o crónica (González *et al.*, *op. cit.*; Friedland *et al.*, *op. cit.*; Tan *et al.*, *op. cit.*; Migueles y Kumar, *op. cit.*; Schwarzwald *et al.*, *op. cit.*; Kutner *et al.*, 2018). Así también, las características histopatológicas incluyen reacción granulomatosa, los cuales presentan un infiltrado de abundantes linfocitos y células plasmáticas. Las células gigantes multinucleadas pueden estar presentes dentro y fuera de los granulomas (Vargas *et al.*, 2005).

En lo que se refiere a la descripción experimental de la invasión en SNC, Górnik y Kuźna-Grygiel en 2005, reportaron hallazgos histopatológicos de la invasión de seis cepas de *Acanthamoeba* en diferentes órganos en el modelo murino de EAG, a través de inoculación intranasal de 1×10^4 trofozoítos. Dependiendo de la presencia de signos clínicos de infección (movilidad limitada, abatimiento, seguimiento de la cola o emaciación), los animales se sacrificaron entre los días 3 y 14 post-inoculación. Posteriormente, fragmentos de cerebro, pulmones, hígado, riñones y corazón se procesaron para su estudio histopatológico. En una evaluación macroscópica, los hemisferios cerebrales de todos los animales inoculados demostraron edema y congestión, así mismo presentaron destrucción de los surcos y congestión meníngea en toda la superficie de los hemisferios cerebrales. En las

preparaciones histológicas se detectó la presencia de amibas en los alvéolos pulmonares, en espacios perivasculares, en paredes y luz de los bronquios y bronquiolos. Los investigadores determinaron que las lesiones dependen de las cepas en estudio y no de la duración de la infección.

Así mismo, Alves *et al.*, en 2016; utilizando dos cepas de *Acanthamoeba* del grupo T4 (aislados clínicos y ambientales), describieron y compararon dos rutas de infección experimental; intracerebral (IC) e intraperitoneal (IP) en ratones sanos suizos. En ambas rutas de infección se inocularon 1×10^4 trofozoítos. Los ratones fueron observados por 21 días y se sacrificaron; se extrajo el cerebro de los ratones infectados vía IC; así como el cerebro, hígado, riñón y pulmón de los ratones inoculados vía IP. No se determinaron diferencias significativas entre las dos rutas de infección experimental, ya que se observaron trofozoítos y quistes en el examen histopatológico de los tejidos cerebrales extraídos de los animales de ambos grupos, así como en órganos de aquellos inoculados vía IP. Se recuperaron las amibas en todos los ratones sin importar la ruta de invasión. En 2017, Omaña-Molina *et al.*, describieron los eventos tempranos de la invasión de dos cepas de *Acanthamoeba* ubicadas dentro del grupo T4 y morfológicamente como *A. castellanii* y *A. culbertsoni*, ambas aisladas de casos clínicos de infección corneal. Se inocularon dos grupos de ratones machos BALB/c de tres semanas de edad vía intranasal con 1×10^6 trofozoítos. Se sacrificaron mediante perfusión a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación. Los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos mostraron la presencia de los trofozoítos invadiendo y penetrando distintos epitelios: olfatorio, respiratorio, el espacio alveolar, así como el túbulo renal; lo cual asemeja el proceso de invasión de las amibas descrito previamente para el tejido corneal (Omaña-Molina *et al.*, 2004). Los datos sugieren que después de que los trofozoítos invadieron el epitelio nasal, continuaron su invasión levantando y separando la capa más superficial de células, posteriormente migraron y penetraron a través de las uniones celulares y posterior fagocitosis de células blanco.

Así mismo, se han descrito eventos morfológicos similares sugiriendo la participación de mecanismos de patogenicidad dependientes de contacto durante la invasión de las amibas en diferentes tejidos blanco, a través de interacciones de trofozoítos con córnea de hámster Dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*) (Omaña-

Molina *et al.*, *op. cit.*; Omaña-Molina *et al.*, 2013) en córnea humana (Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*) y en cultivos MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells) (González-Robles *et al.*, 2006; Omaña-Molina *et al.*, 2013).

2.7 Mecanismos de patogenicidad

Gran parte del daño causado por los trofozoítos de *Acanthamoeba* en el curso de infecciones corneales o cerebrales es probablemente el resultado de mecanismos dependientes e independientes de contacto (Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*).

Iniciando con la adherencia, se ha demostrado que la proteína de unión a manosa (MBP- Mannose binding protein), de 130 kDa se expresa en la superficie de *Acanthamoeba*, y es parte del proceso inicial de invasión (Garate *et al.* 2004; Clarke y Niederkorn, 2006; Garate *et al.*, 2006), seguida por la migración e invasión a través de las uniones celulares por efecto mecánico y/o enzimático, comenzando a invadir las capas más profundas y eventualmente fagocitando células recién desprendidas, causando un efecto citopático sólo en las células cercanas a los trofozoítos. Confirmando así la idea de que los mecanismos de patogenicidad dependientes de contacto son de gran importancia durante la invasión de las amibas del género *Acanthamoeba*, sin importar el sitio blanco (Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*). Entre los mecanismos dependientes de contacto resalta la emisión de amebostomas (estructuras fagocíticas) con las que ingieren células epiteliales desprendidas y la producción de diferentes proteasas para digerir la matriz extracelular del tejido blanco (Omaña- Molina, *et al.*, *op. cit.*; Visvesvara, *op. cit.*).

Así mismo, los mecanismos independientes de contacto, incluyen la producción de serina, cisteína proteinasas y metaloproteiniasas que inducen la degradación de las proteínas de unión ZO-1 y ocludina, colágeno tipo I, III, IV, elastina, fibronectina (componente principal de la matriz extracelular), IgG, IgA, Hb, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana basal (Clarke y Niederkorn, *op. cit.*). Otros factores que pueden contribuir con la patogénesis de *Acanthamoeba* incluyen las ecto-ATPasas (Chusattayanond *et al.*, 2010) y la activación de caspasa-3 (Khan y Siddiqui, 2009; Duggal *et al.*, 2017). Se ha reportado también, la participación de enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran elastasas, fosfolipasas, glucosidasas y metaloproteasas. Si bien se sugiere que estas participan en la

destrucción celular (Khan, *op. cit.*), no ha sido confirmada su participación en modelos experimentales (Marciano- Cabral y Cabral, *op. cit.*; Siddiqui, 2012). Sin embargo, los resultados mostrados durante la interacción de trofozoítos de diferentes especies de *Acanthamoeba* con la córnea de hámster, córnea humana, células epiteliales y modelos experimentales *in vivo*, ha sugerido que las proteasas participan en la separación celular mas no en la destrucción del tejido blanco (Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*).

3. JUSTIFICACIÓN

La acanthamebosis cutánea, es una infección cada vez más reconocida desde la aparición del SIDA y el uso de fármacos inmunosupresores, relacionada también con lesiones cutáneas y quemaduras. La patología augura un mal pronóstico y es fatal si la infección afecta al sistema nervioso central (SNC) (Lorenzo- Morales *et al.*, 2013). A pesar de ello, hasta el momento, se desconocen los eventos tempranos que se llevan a cabo durante la invasión de las amibas en la piel, así mismo se desconoce si factores medioambientales como la luz UV favorezcan la invasión de las amibas en este sitio. Es por ello que el presente trabajo se enfoca en el estudio de los eventos morfológicos que lleva a cabo *A. castellanii* durante la invasión en piel previamente sometida a irradiación crónica con luz UV-B.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Describir morfológicamente los eventos tempranos de la invasión de *A. castellanii* en un modelo murino de piel irradiada con luz UV-B.

4.2 Objetivos particulares

- Reactivar la virulencia de la cepa *A. castellanii*.
- Interaccionar trofozoítos de *A. castellanii* sobre lesiones cutáneas en un modelo murino con irradiación crónica con luz UV-B
- Inocular intradérmicamente la cepa en estudio en un modelo murino con irradiación crónica con luz UV-B
- Obtener cortes histológicos de la piel del modelo murino.
- Obtener suero hiperinmune anti *A. castellanii* en conejo.
- Describir mediante secciones histológicas teñidas con H&E e inmunohistoquímica los posibles mecanismos de patogenicidad de *A. castellanii* en piel dañada o lesionada del modelo murino.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Cultivo amibiano

Se trabajó con una cepa de *A. castellanii* (aislada de un caso clínico de QA diagnosticado en el Hospital Asociación para evitar la ceguera en México “Dr. Luis Sánchez Bulnes”), la cual se mantuvo en cultivo axénico Peptona Levadura Glucosa (PYG) a una temperatura óptima de crecimiento de 30°C. Los ensayos se realizaron con trofozoítos obtenidos en la fase exponencial de crecimiento. Todos los ensayos se llevaron a cabo con cultivos amibianos cosechados en su fase exponencial de crecimiento (crecidos en botellas de cultivo de 75 cm²) con 100% de trofozoítos viables (evaluado con la prueba de exclusión de azul tripano), los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar para mantener la esterilidad.

5.2 Reactivación de virulencia

La reactivación de la virulencia de la cepa en estudio se llevó a cabo en un grupo de 5 ratones BALB/c machos de tres semanas de edad. Se favoreció el desprendimiento amibiano colocando las botellas de cultivo de 75 cm² en hielo frappe durante 7 minutos, y dando ligeros golpes en el costado de la misma. Dentro de la campana de flujo laminar se decantó el contenido de la botella en un tubo cónico de 50 ml y se determinó la cantidad de trofozoítos contenidos en el mismo, colocando 10 µl de medio en cada cuadrante de la cámara de Neubauer. Se realizó un conteo amibiano en el microscopio y se determinó el volumen final necesario para ajustar 1×10^6 trofozoítos/ 20 µl de medio de cultivo fresco una vez centrifugadas (2,500 rpm/ 10 min).

Los ratones fueron anestesiados ligeramente e inoculados vía intranasal, acorde a lo establecido por Culbertson *et al.*, (1959). Los ratones fueron alimentados *ad libitum* y monitoreados diariamente, recibiendo cuidados convencionales. Si los ratones no morían después de 21 días, eran sacrificados. El cerebro, hígado, riñón y pulmón fueron colocados en placas de agar con medio no nutritivo NNE enriquecido con *E. aerogenes* inactivada por calor, con el fin de recuperar las amibas. Los cultivos se monitorearon diariamente al microscopio invertido.

Para llevar a cabo la reaxenización de las amibas, se seleccionó una zona de

crecimiento amibiano (de aprox. 1 cm²) en estado trófico, se transfirió a un tubo con medio PYG y se incubó a 30°C manteniendo los tubos inclinados y sin agitación con el fin de que las amibas se adhirieran a su superficie. Las amibas fueron utilizadas en ensayos posteriores: inoculación intradérmica, interacción sobre lesiones y para la obtención de suero hiperinmune anti *A. castellanii*.

5.3 Obtención de suero hiperinmune anti *A. castellanii*

Para la obtención del suero hiperinmune anti *A. castellanii* se requirió un extracto total amibiano, para lo cual las amibas se cosecharon de la misma manera que como se describió con anterioridad en el apartado de reactivación de la virulencia, pero posterior a la centrifugación del concentrado amibiano se realizaron dos lavados con PBS frío, se centrifugó nuevamente y se decantó la solución. Después se adicionó un “cocktel” inhibidor de proteasas (conformado por Leupeptina (0.5 µg/ml), N- etilmaleimida (NEM) (3 mM), Aprotidina (0.5 µg/ml) y Benzamidina (1 mM) en la pastilla obtenida. Finalmente, el paquete celular se sometió a cinco ciclos de congelación y descongelación para promover su lisis. El extracto amibiano se distribuyó en alícuotas de 200 µl, se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. El resto del extracto se mantuvo en congelación a -70°C para seguir el esquema de inmunización.

El extracto amibiano se ajustó a 2 mg/ml y con éste se inició el esquema de inmunización convencional en un conejo Nueva Zelanda macho adulto; se aplicaron cuatro dosis espaciadas, 15 días cada una, las dos primeras se aplicaron vía subcutánea con adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund, respectivamente; las dosis restantes se aplicaron vía intramuscular diluidas en suero fisiológico. Al finalizar, se realizó un sangrado mediante punción cardíaca y la sangre se centrifugó a 2,500 rpm/ 10 min para separar el suero, y se mantuvo en congelación hasta su uso. Posteriormente, se realizó una inmunocitoquímica para conocer la dilución óptima de anticuerpos anti- *A. castellanii* que permitiera inmunolocalizar amibas y quistes en los tejidos.

5.4 Modelo murino de irradiación crónica con luz UV-B

El esquema de irradiación crónica con luz UV-B corrió a cargo del laboratorio de Fitoquímica ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) y se llevó a cabo en el Bioterio de la FES Iztacala, en donde tres ratones hembras SKH-1 (Figura 4) de 6 a 8 semanas de edad, una vez que llegaron al laboratorio, se aclimataron al menos una semana antes de realizar los experimentos.



Figura 4. Ratón SKH-1. El cual tiene como características: ausencia de pelo, albino y son más susceptible a daños traumáticos en la piel debido a la falta de pelo.

Durante todo el estudio, los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* (Purina Chow 5001), con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, a una temperatura de 23 a 25 °C y a una humedad relativa del 45-55%.

Al momento de la irradiación, los animales en experimentación se colocaron en cajas de acrílico especiales, a 15 cm de distancia de la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C) (Figura 5). La energía de irradiación a esta distancia es de 6.0 mJ/cm² (intensidad de campo 130 watt/m²) calculada con un radiómetro (Spectroline DM-300HA), las lámparas fueron sistemáticamente alternadas para compensar o minimizar cambios en el flujo de las mismas. Se implementó un esquema de irradiación crónica en el que los animales estuvieron expuestos a la luz UV-B 45s cada tercer día durante 32 semanas (García-Bores, 2010).

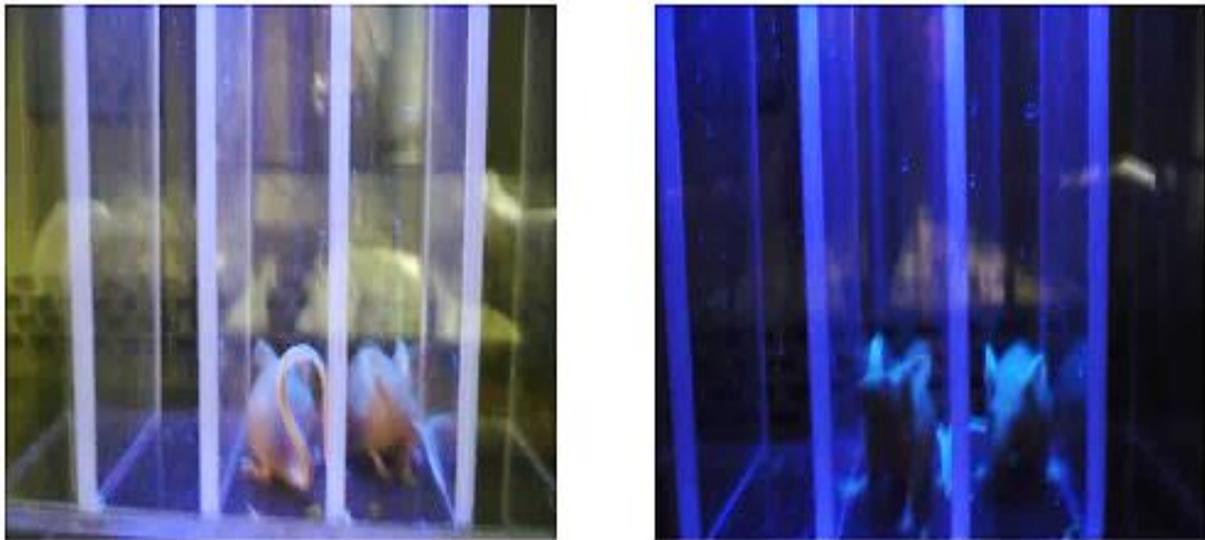


Figura 5. Cámaras de irradiación. Ratones SKH- 1 en cámaras de irradiación.

5.5 Inoculación intradérmica e interacción en lesiones cutáneas

Al finalizar el periodo propuesto para ser considerada irradiación crónica con luz UV-B, dos de los ratones desarrollaron lesiones cutáneas evidentes, por lo que se decidió trabajar acorde a los siguientes esquemas de interacción con las amibas en estudio:

Grupo 1. En los ratones que presentaron lesiones cutáneas evidentes se realizó la interacción colocando trofozoítos de *A. castellanii* (2.5×10^4 / 20 μ l) directamente sobre la zona de lesión e inoculando vía intradérmica en cinco zonas preestablecidas del dorso en cada ratón utilizando agujas ultrafine. Uno de los ratones desarrolló una lesión eritematosa de 3 mm y se programó su sacrificio 48h post-interacción, el segundo ratón desarrolló un carcinoma evidente (1.5 cm) por lo que después de llevar a cabo la interacción con las amibas, se decidió esperar el tiempo necesario hasta observar signos de infección en SNC, lo cual ocurrió 18 días post-interacción.

Grupo 2. En el ratón sin lesión cutánea aparente se realizó la inoculación intradérmica (jeringas Ultrafine) con el mismo número de trofozoítos, en cinco zonas preestablecidas del dorso (Figura 6. A) y se realizó el sacrificio a las 24 h post-inoculación.

Grupo control. La zona ventral del ratón se consideró como control, ya que es una zona no irradiada con luz UV-B en la cual también se marcaron cinco puntos donde se inoculó la misma cantidad de trofozoítos ($2.5 \times 10^4 / 20\mu\text{l}$) (Figura 6. B).

Posteriormente se realizó el procesamiento histológico de las muestras. En todos los casos se cortaron secciones de 1 cm^2 de piel, quedando en el centro de este el sitio de inoculación o zona de lesión. Finalmente, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se procesaron por la técnica histológica convencional, que incluye la deshidratación e inclusión en parafina y obtención de cortes de $3 - 5 \mu\text{m}$.

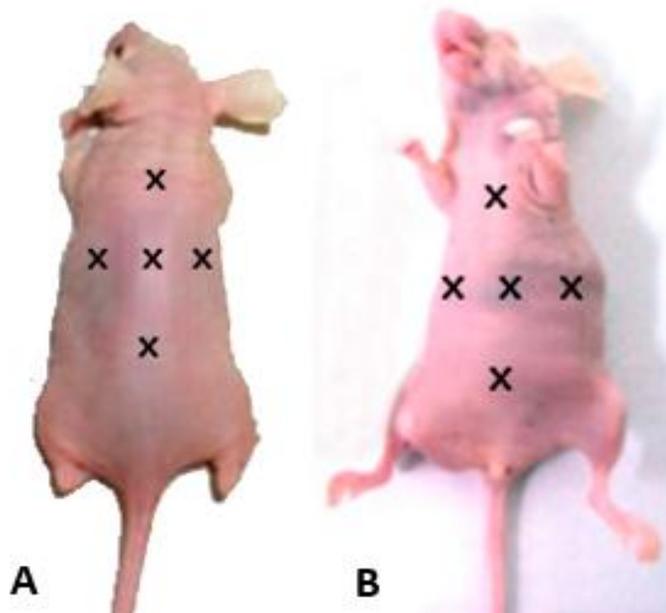


Figura 6. Esquema de marcaje para inoculación intradérmica en ratones de la cepa SKH-1. **A.** Grupo 2. Zonas marcadas en parte dorsal. **B.** Grupo control. Zonas marcadas en parte ventral.

5.6 Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos fueron colocados en una estufa a 70 °C durante 1 h, se desparafinaron con xilol y se hidrataron gradualmente con una serie descendentes de etanol (100, 96 y 90%), se lavaron con agua destilada, y TBS-Tween 20 (0.1%) (TBS-T). La recuperación antigénica se llevó a cabo por digestión enzimática con proteinasa K 0.1 mg/ml. en buffer TBS-T con 1% de CaCl₂ durante 15 min. Se lavaron con TBS-T y se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en agua destilada, la unión inespecífica del anticuerpo se bloqueó con SFB (suero fetal bovino) al 10% en TBS-T durante 2 h, nuevamente se hicieron lavados con TBS-T para después incubar con el suero policlonal de conejo anti- *A. castellanii* (previamente obtenido en el laboratorio) a una dilución 1:100 obtenida a través de un ensayo inmucitoquímico. Se incubaron las muestras toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda; se realizaron lavados con TBS-T y se incubó con el segundo anticuerpo (HRP-Rabbit MACH 2 Polymer Biocare) acoplado a peroxidasa anti-IgG de conejo durante 30 min. Las laminillas se lavaron con TBS-T y se reveló la reacción enzimática con diaminobencidina-H₂O₂ (DAB), después fueron contrateñidas con hematoxilina, y deshidratadas con etanol en series graduales (90, 96 y 100%) y xilol. Finalmente, para preservar los tejidos, se montaron con resina. Las zonas de los ratones consideradas como controles se procesaron de la misma manera. Así mismo algunas laminillas fueron procesadas mediante la técnica tradicional de hematoxilina-eosina.

Las laminillas procesadas se observaron en un microscopio óptico con el propósito de localizar trofozoítos o quistes en el tejido, cambios histopatológicos, así como células inflamatorias para realizar un registro fotográfico y describir la invasión en piel de estas amibas.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo amibiano

Los trofozoítos de *A. castellanii*; cepa en estudio crecida en medio PYG a 30 °C y cosechada en fase exponencial de crecimiento se observó en óptimas condiciones, mostrando su morfología clásica (Figura 7). Se observaron abundantes trofozoítos activos adheridos a la superficie de las botellas de cultivo celular mostrando sus vacuolas contráctiles (Page, *op. cit.*).

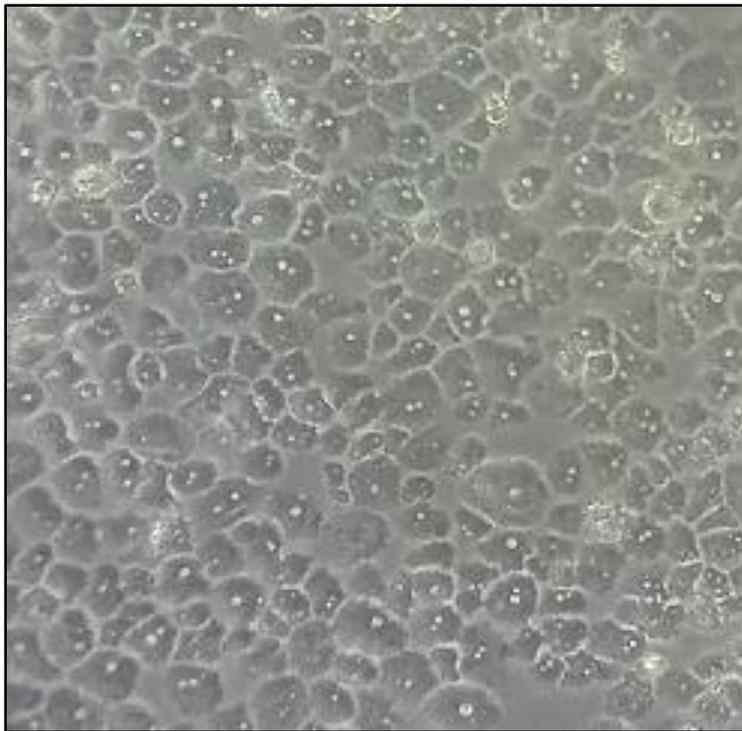


Figura 7. Microscopía de luz. Contraste de fases. Trofozoítos en cultivo en medio PYG, en fase exponencial de crecimiento. Se muestran abundantes trofozoítos adheridos a la superficie de las botellas de cultivo. 200x.

6.2 Reactivación de virulencia

Las amibas del género *Acanthamoeba* en general se adaptan con facilidad manteniéndose en un cultivo axénico, lo que a menudo conduce a la disminución de su virulencia y capacidad de enquistamiento, atenuado por el prolongado cultivo en medios axénicos, sin importar si han sido aisladas del medio ambiente o de casos clínicos (De Jonckheere, *op. cit.*; John y Howard, 1993; Im *et al.*, 1999; Salazar, 2007; Castro, 2012).

Se ha demostrado también que la disminución de la virulencia en *Acanthamoeba* no es permanente y puede restaurarse a través de múltiples inoculaciones en ratón (Mazur T y Hadas; 1994). Por lo anterior, se reactivó la virulencia de la cepa en estudio a través de dos pases seriados mediante la inoculación intranasal de $1 \times 10^6/20\mu\text{l}$ trofozoítos en 5 ratones machos BALB/c de tres semanas de edad, acorde a lo propuesto por Culbertson (1959) donde se promueve una infección en el SNC. Dos de los cinco ratones inoculados intranasalmente con trofozoítos de *A. castellanii* murieron antes de los 21 días, tiempo establecido por Culbertson para este procedimiento, los demás ratones fueron sacrificados una vez que transcurrieron los 21 días. Inmediatamente después 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 hemorragia.

Después de un par de días de incubación de los órganos extraídos y colocados en medio NNE (cerebro, pulmón, hígado y riñón), se realizó el análisis microscópico y se observaron trofozoítos en todos los órganos (Figura 8). Comprobando así también su virulencia y capacidad invasiva (Salazar, 2007; Cárdenas, 2016).

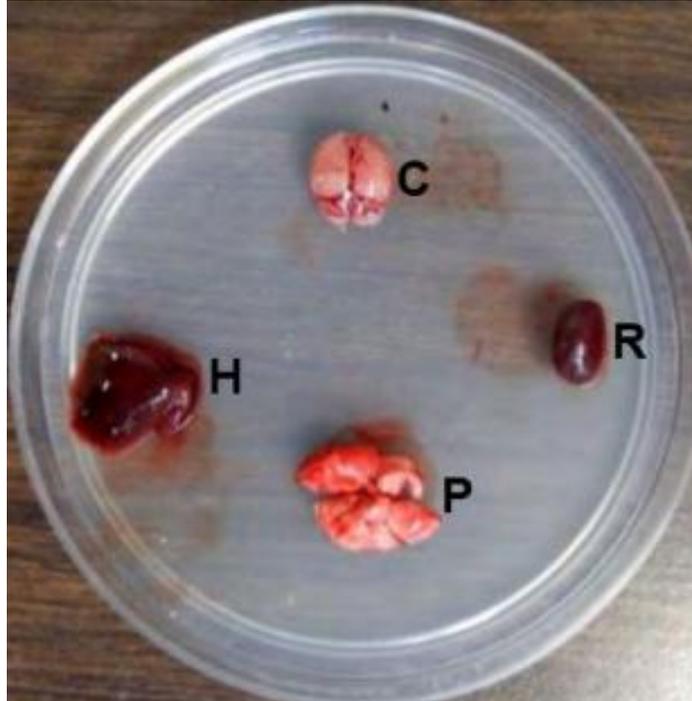


Figura. 8. Órganos extraídos de ratón recién sacrificado. Los órganos se muestran sin cambios patológicos aparentes. **C.** Cerebro. **R.** Riñón. **P.** Pulmón. **H.** Hígado.

Las amibas recién recuperadas se axenizaron nuevamente en el medio PYG y se trabajó con los trofozoítos recuperados de pulmón. Cabe mencionar, que no se observaron formas quísticas y con esta cepa se realizó la inmunización de conejo y la inoculación de ratones desnudos.

6.3 Obtención de suero hiperinmune anti- *A. castellanii*

Se llevó a cabo el esquema de inmunización convencional descrito en la metodología en el conejo Nueva Zelanda macho adulto. Posterior al sangrado, mediante punción cardíaca, se obtuvo aproximadamente 15 ml de sangre; se separó el suero por centrifugación, y se mantuvo en congelación hasta su uso. Posteriormente, se realizó una inmunocitoquímica encontrando que una dilución

1:100 del suero anti-*A. castellanii* es la óptima ya que permite visualizar nítidamente amibas y quistes.

6.4 Análisis histológico de piel irradiada con luz UV-B

Dos de los tres ratones desnudos de la cepa SKH- 1 irradiados durante 32 semanas presentaron lesiones cutáneas (Figura 9. A y B).

En el análisis histológico de los cortes de piel del ratón que mostró la lesión mayor (1.5 cm. de diámetro) en la zona dorsal (Figura 9. A. flecha) se observa una neoplasia (masa anormal de tejido cuyo crecimiento es excesivo e incontrolado respecto al tejido normal), con las características de un carcinoma de células escamosas, con áreas de engrosamiento epitelial irregular debido a hiperplasia (aumento de tamaño por proliferación celular) y se acompaña de hiperqueratosis, se observan perlas de queratina e invasión epidérmica hacia la dermis sin diferenciación de la membrana basal y en conjunto se diagnosticó como carcinoma ulcerado de células escamosas (Figura 12. A).

Los cortes histológicos del segundo ratón con una lesión (5 mm de diámetro aproximadamente) en la zona dorsal inferior (Figura 9. B. flecha), mostraron hiperplasia e hipertrofia (aumento de tamaño de las células y del tejido), y en conjunto se diagnosticó como una lesión eritematosa (Figura. 10. A).

Con lo anterior, se confirma como un modelo de irradiación con luz UV-B exitoso, pues se generaron lesiones en piel.

Respecto al tejido sin lesiones aparentes (Figura. 9. B. cabeza de fecha y C), presentaban un eritema difuso en la piel del dorso, sólo se observó hipertrofia e hiperplasia a nivel de la epidermis (Figura 15. A).

En el tejido de las zonas control, se observaron las capas de la piel bien organizadas y diferenciadas, con los quistes pilosos característicos de la cepa de ratón SKH-1 a inicios de la hipodermis.



Figura. 9. A y B. Ratones desnudos de la cepa SKH- 1, los cuales presentan una lesión cutánea debido a la exposición crónica de irradiación de luz UV-B las cuales fueron interaccionadas con las amibas. **A.** Carcinoma ulcerado de células escamosas de aproximadamente 1.5 cm. de diámetro. **B.** Lesión eritematosa (flecha), así mismo se observa piel sin lesión cutánea aparente (cabeza de flecha) en donde se realizó la inoculación intradérmica de trofozoítos. **C.** Ratón desnudo de la cepa SKH- 1 que no presentó lesiones cutáneas después de ser irradiado con luz UV-B, sobre el dorso de este se realizó la inoculación de trofozoítos con una jeringa ultrafina.

Grupo 1. Ratones con lesiones cutáneas. El ratón con la lesión eritematosa se sacrificó a las 48 h post- interacción. En el análisis histológico de la zona de lesión, se observaron amibas en forma trófica en óptimas condiciones a lo largo de la dermis, adosadas a adipocitos y adheridas a las fibras de colágena y los espacios interfibrilares, sin mostrar un daño aparente en el tejido (Figura 10). Así mismo, se localizaron trofozoítos adheridos a tejido conjuntivo, cercanos a vasos sanguíneos y quistes pilosos. Tampoco se observó daño en el tejido, sin embargo, se observó actividad colagenolítica cercana a zonas con trofozoítos (Figura 11).

En los cortes histológicos de las zonas inoculadas intradérmicamente alrededor de la lesión se observan trofozoítos invadiendo dermis y migrando hacia la hipodermis, se localizaron adosados a adipocitos y adheridos a tejido conjuntivo, así como rodeando y cercanos a vasos sanguíneos tanto en hipodermis como en músculo, no se observa daño tisular (Figura 12).

El ratón que presentaba el carcinoma se mantuvo bajo observación varios días, con el fin de evaluar la invasión de las amibas a otros órganos a partir de su interacción en la lesión de piel. A los 18 días post- interacción con las amibas, presentó algunos síntomas tales como aletargamiento y asterixis (temblores), por lo que se decidió sacrificar y procesar la piel bajo las mismas técnicas de tinción. En el análisis histológico de los cortes procesados por inmunohistoquímica, se identificaron varios trofozoítos en óptimas condiciones y de manera constante penetrando y migrando en todas las capas de piel (epidermis, dermis e hipodermis) a través de las uniones celulares sin aparente daño o citólisis en el tejido, interaccionando con componentes dérmicos tales como quistes pilosos y adipocitos, así también, en los cortes histológicos procesados con H&E se observaron trofozoítos rodeando vasos sanguíneos (Figura 13).

Del mismo modo, se analizaron cortes histológicos de cerebro, hígado y bazo del ratón sacrificado a los 18 días post- interacción; encontrándose también trofozoítos. Es importante resaltar que no se observó una reacción inflamatoria hacia los trofozoítos en los órganos analizados, ni lisis de los mismos (Figura 14).

Grupo 2. Ratones sin lesiones aparentes. En el análisis histológico de la piel del ratón sin lesión aparente y sacrificado a las 24 h post- inoculación intradérmica de trofozoítos, se observaron trofozoítos en óptimas condiciones y de manera

constante a lo largo de las dermis adheridos entre las fibras de colágeno e interactuando con componentes dérmicos como glándulas sebáceas (Figura 15).

Grupo control. Zonas ventrales sin irradiación. En los cortes histológicos control, de ratones inoculados intradérmicamente con trofozoítos y sacrificados a las 24 h y 48 h post- inoculación, se observan fibras de colágena de la dermis bien organizadas, así mismo, en la hipodermis se encuentran los quistes pilosos característicos de la cepa, en conjunto se observa un tejido histológicamente normal con capas de piel bien organizadas y sin presencia de amibas.

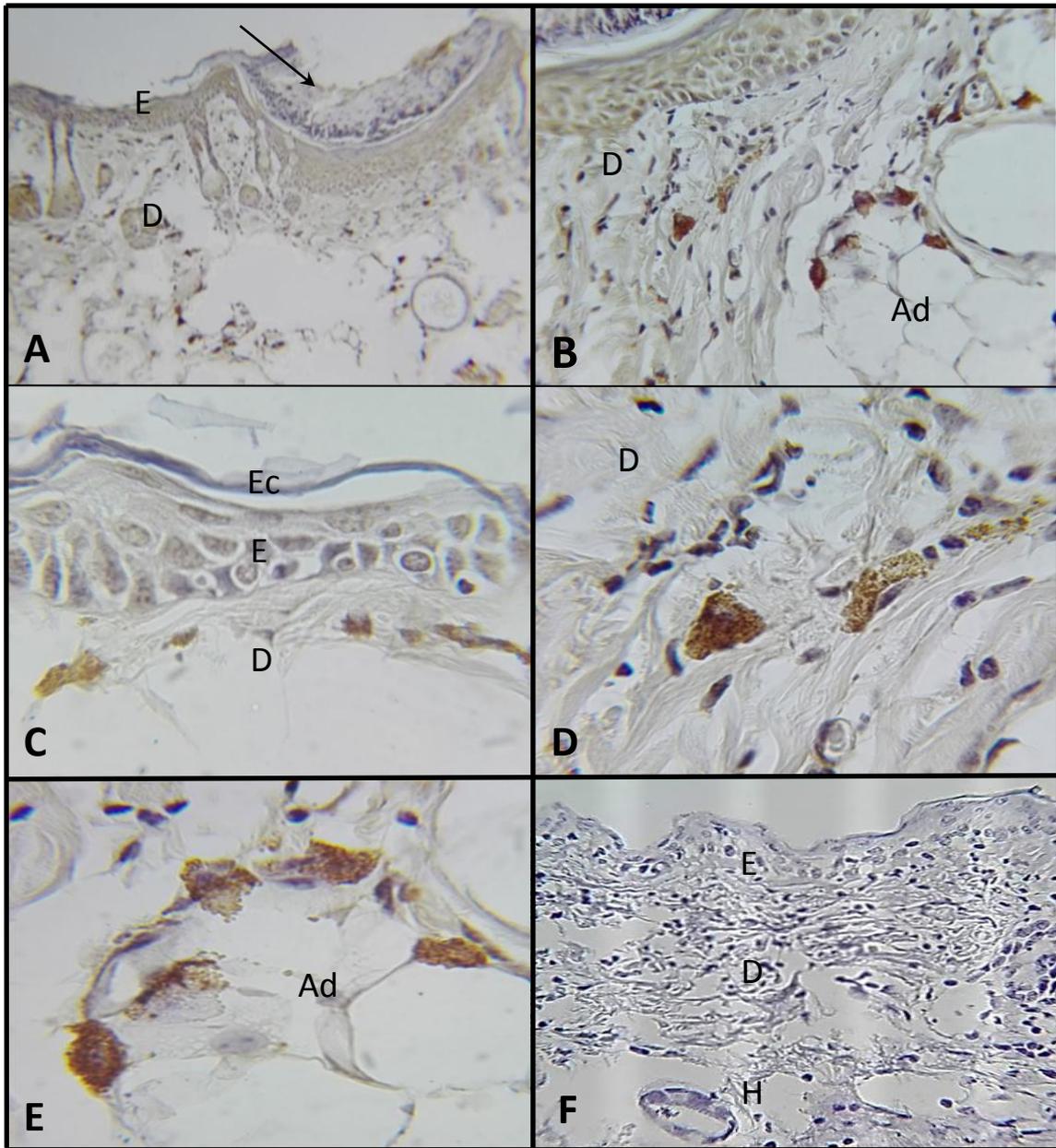


Figura 10. Fotomicrografías de piel con lesión eritematosa causada con luz UV- B en ratón SKH- 1 sacrificado 48 h post- interacción con *A. castellanii*. **A.** Vista panorámica de la zona de lesión (Flecha) en donde se colocaron tópicamente las amibas; Epidermis (E) y Dermis (D) (100x). **B.** Acercamiento de zona de lesión donde se observan trofozoítos cercanos a dermis (D) y a adipocitos (Ad) (400x). **C.** Trofozoítos debajo de epidermis (E) y capa basal; estrato corneo (Ec) (1000x). **D.** Trofozoítos en dermis (D) (1000x). **E.** Trofozoítos adosados en adipocitos (Ad) (1000x). **F.** Control, zona ventral, sin daños en su histología ni marcaje de trofozoítos; epidermis (E), dermis (D) e hipodermis (H) (100x). (IHQ DAB).

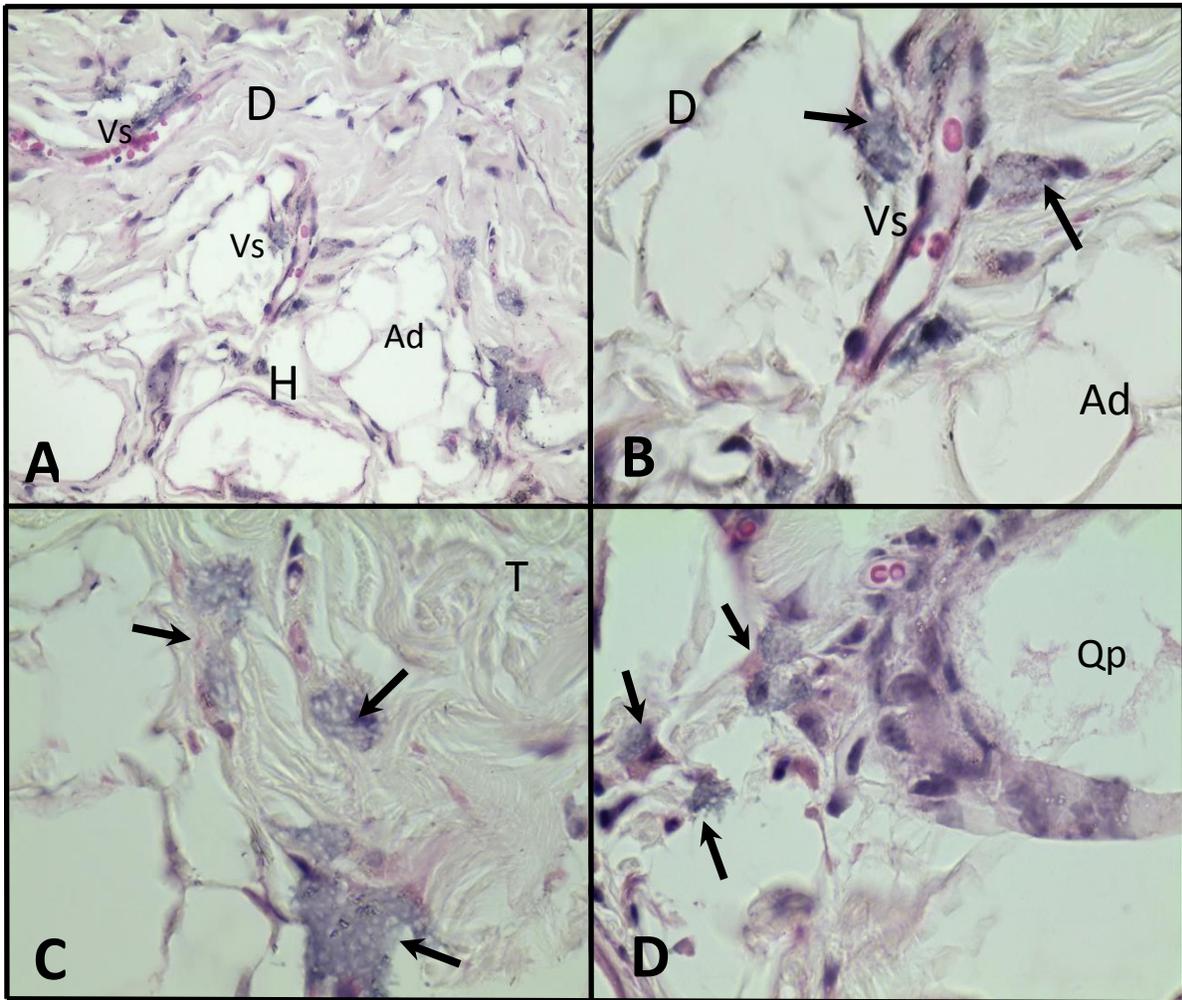


Figura 11. Fotomicrografías de piel con lesión eritematosa causada con luz UV- B en ratón SKH-1 sacrificado 48 h post- inoculación. **A.** Vista panorámica de dermis (D) de la zona de lesión, se observan vasos sanguíneos (Vs) y adipocitos (Ad) en hipodermis (H) (400x). **B.** Trofozoítos (Flechas) en pared de vaso sanguíneo (Vs) en el tejido conjuntivo de dermis, se observan adipocitos (Ad) a su lado (1000x). **C.** Trofozoítos (Flechas) en tejido conjuntivo (Tc) (1000x). **D.** Trofozoítos en pared de quiste piloso (Qp) donde se observa lisis de colágena (1000x). (H&E).

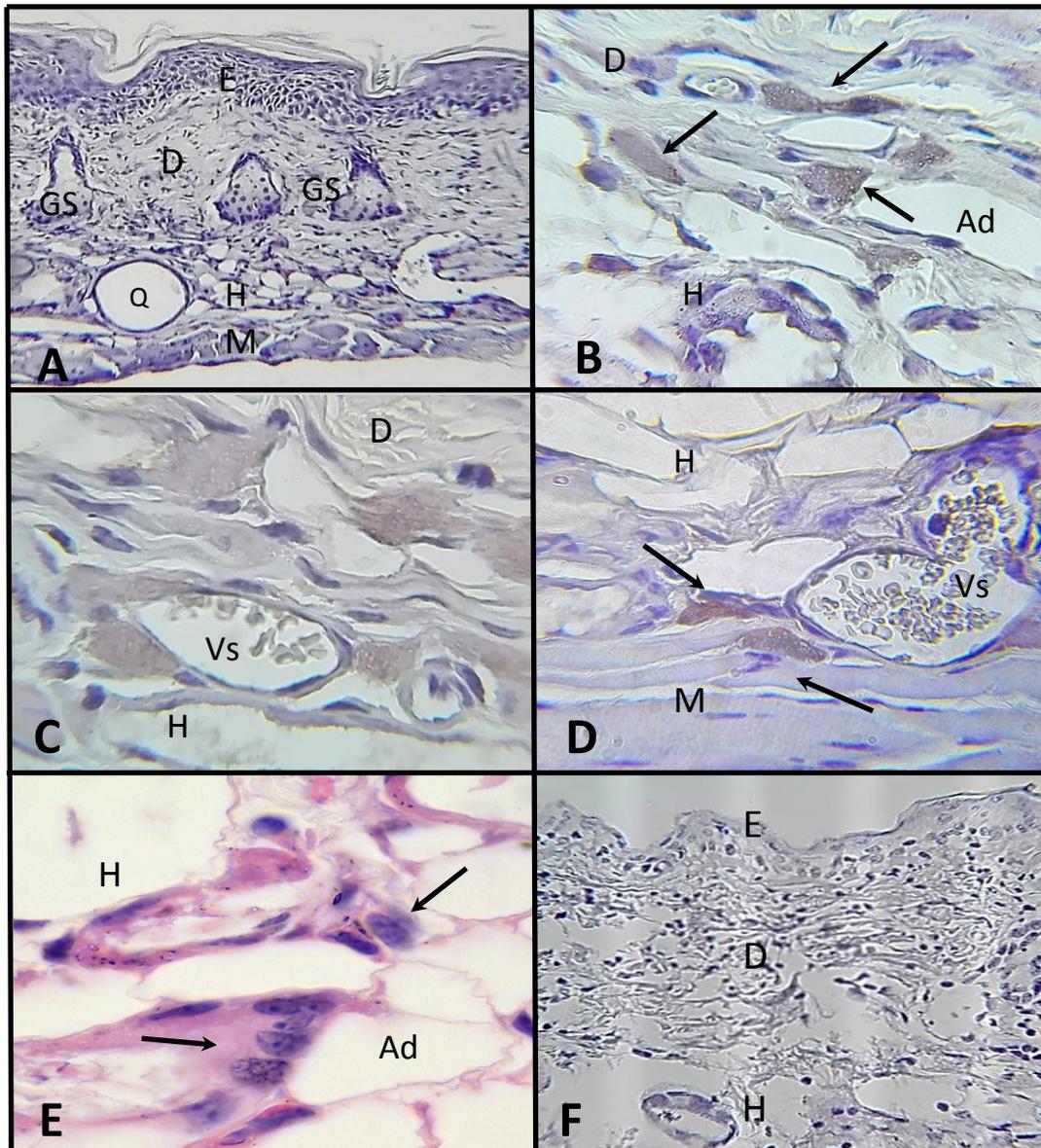


Figura. 12. Fotomicrografías de piel lesionada con luz UV-B en ratones SKH-1 sacrificados 48 h post- inoculación intradérmica con *A. castellanii*. **A, B, C, D y F.** Inmunolocalización de trofozoítos de *A. castellanii* (IHQ DAB). **A.** Vista panorámica de piel lesionada con luz UV-B e inoculada intradérmicamente con *A. castellanii*; epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), músculo (M) y glándulas sebáceas (Gs) (100x). **B.** Trofozoítos (flechas) en dermis (D) e hipodermis (H), cercanos a adipocitos (Ad) (400x). **C.** Trofozoítos en dermis (D) e hipodermis (H), rodeando a un vaso sanguíneo (Vs) (1000x). **D.** Trofozoítos (flechas) en músculo (M) cercanos a vaso sanguíneo (Vs) (400x). **E.** Trofozoítos (flechas) en hipodermis (H) cercanos a adipocitos (Ad) (1000x) (H&E). **F.** Control, zona ventral sin daños aparentes en su histología ni marcaje de trofozoítos; epidermis (E), dermis (D) e hipodermis (H) (100x).

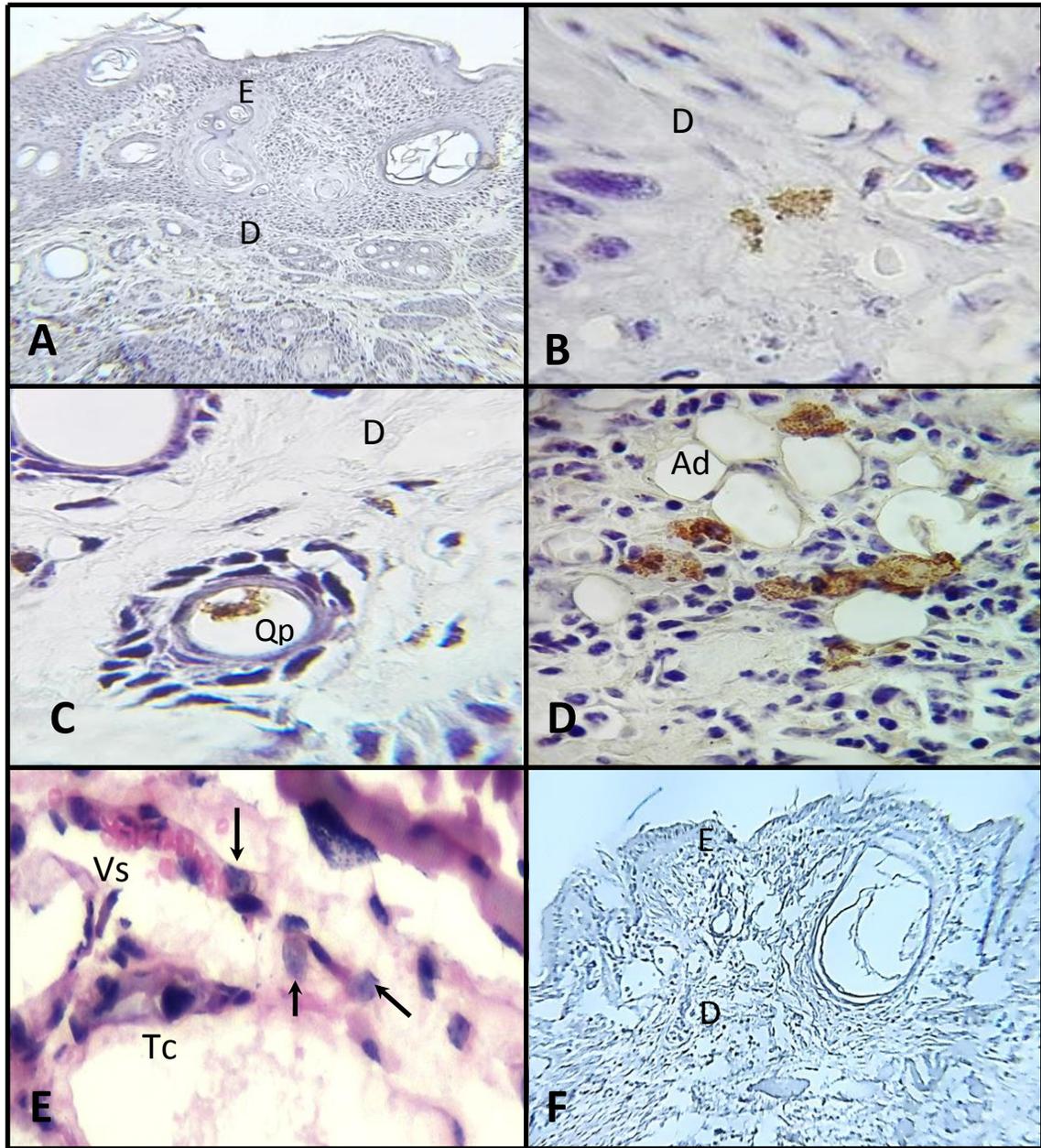


Figura 13. Fotomicrografías de piel con carcinoma causado con luz UV- B en ratones SKH- 1 sacrificado 18 días post- interacción con *Acanthamoeba castellanii*. **A, B, C, D y F** Inmunolocalización de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* (flechas) (IHQ DAB). **A.** Vista panorámica del carcinoma en donde se observan células de la epidermis transformadas e invadiendo dermis (D) (100x). **B.** Trofozoítos en dermis (D) (1000x). **C.** Amibas en el interior de un quiste piloso (Qp) (1000x). **D.** Trofozoítos en adipocitos (Ad) (1000x). **E.** Se observan trofozoítos en tejido conjuntivo (Tc) y en la pared de un vaso sanguíneo (Vs) (H&E). **F.** Control, zona ventral sin daños en su histología y sin trofozoítos; epidermis (E) y dermis (D) (400x).

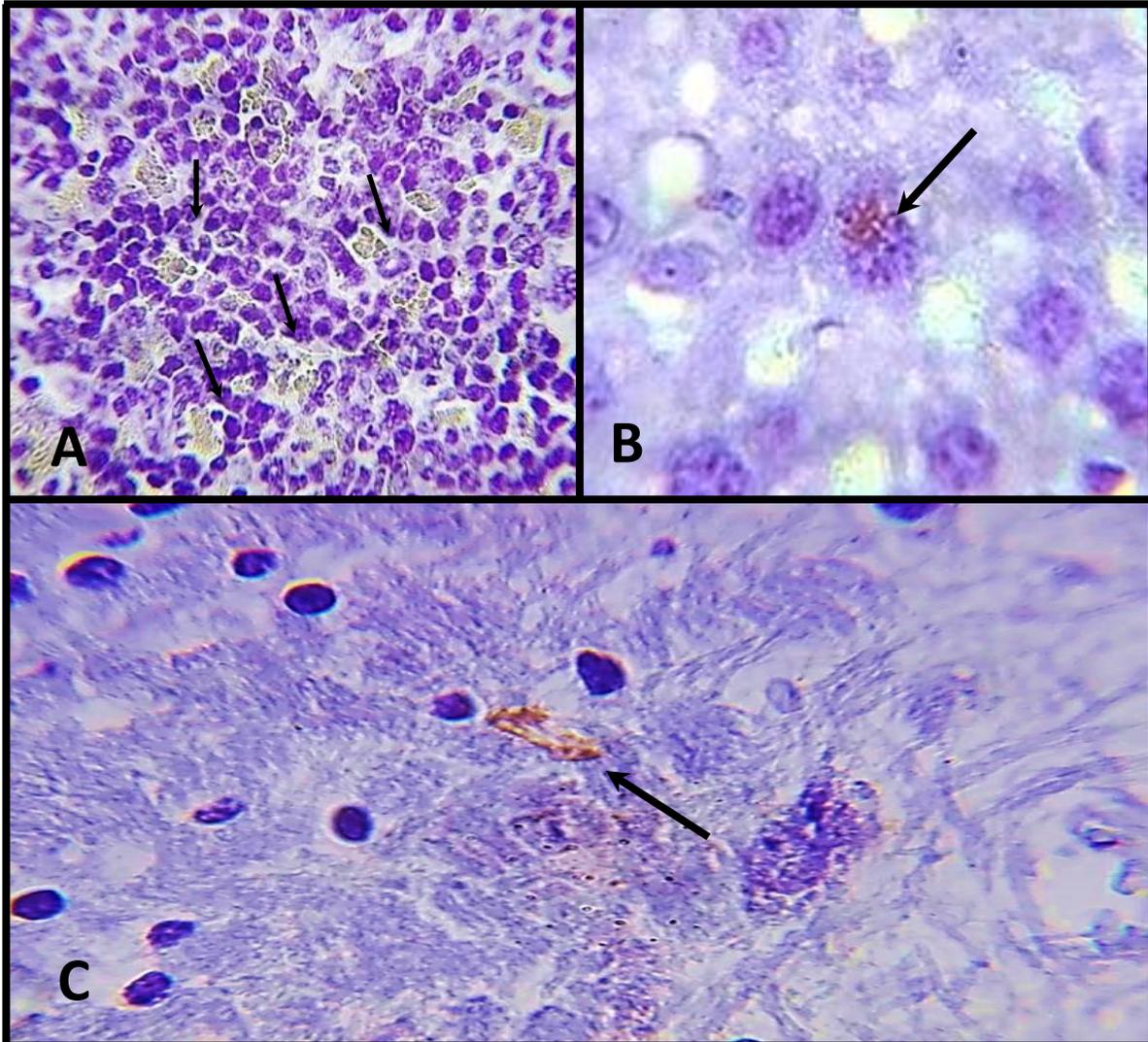


Figura 14. Fotomicrografías de órganos de ratón SKH-1 con carcinoma en piel causado con luz UV- B, interaccionada con *Acanthamoeba castellanii*, sacrificado 18 días post-interacción. **A.** Bazo. Se observan trofozoítos (fechas) en células que conforman la pupa blanca de bazo (400x). **B.** Hígado. Trofozoíto adherido a hepatocito (1000x). **C.** Cerebro. Trofozoíto localizado en tejido nervioso (1000x). (IHQ DAB).

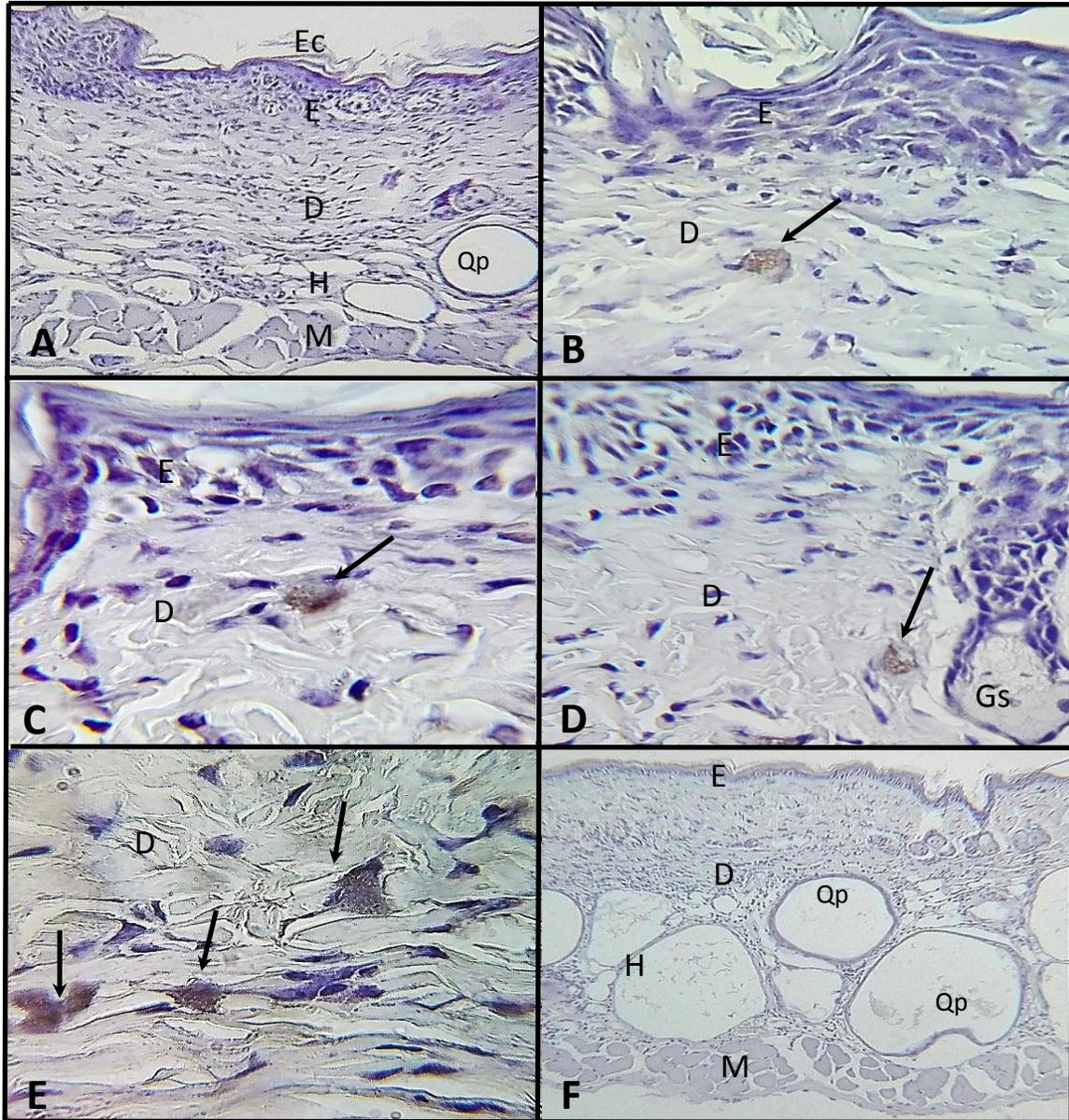


Figura 15. Fotomicrografías de piel expuesta a luz UV-B en ratón SKH-1 sacrificado 24 h post- inoculación intradérmica con *A. castellanii*. **A.** Vista panorámica de piel expuesta a luz UV-B; estrato córneo (Ec), epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H) músculo (M) y quiste piloso (Qp) (100x). **B.** Trofozoíto (flecha) en dermis (D); epidermis (E) (400x). **C.** Trofozoíto (flecha) en dermis (D); epidermis (E) (400x). **D.** Trofozoíto (flecha) en dermis (D) cercano a una glándula sebácea (Gs); epidermis (E) (400x). **E.** Trofozoítos (flechas) en dermis (D) (1000x). **F.** Control, zona ventral sin daños en su histología y sin marcaje de trofozoítos; epidermis (E), dermis (D), hipodermis (H), músculo (M) y quistes pilosos (Qp) (100x). (IHQ DAB).

7. DISCUSIÓN

Desde que se demostró el potencial patógeno de las amibas del género *Acanthamoeba*, se han realizado trabajos en modelos animales, con la intención de describir los hallazgos histopatológicos de infecciones experimentales causadas por estas amibas en córnea y principalmente en SNC (Martínez, *op. cit.*; Górnik y Kuźna-Grygiel, *op. cit.*; Omaña- Molina, *op. cit.*); reportándose estos hallazgos en organismos sanos, y en periodos de tiempo que van de 3 a 14 días, e incluso hasta 7 meses post-inoculación. Es ampliamente aceptado que la acanthamebosis cutánea causada por amibas del género *Acanthamoeba*, ocurre principalmente en personas con un sistema inmune debilitado, con SIDA con o sin afección del SNC (Casper *et al.*, *op. cit.*; Galarza *et al.*, *op. cit.*; Murakawa *et al.*, *op. cit.*) aunque también se han descrito casos en personas VIH negativas pero con EAG, que cursan con terapia inmunosupresora posteriores a un trasplante de órganos o con desordenes inmunológicos (Slater *et al.*, *op. cit.*; Steinberg *et al.*, *op. cit.*; Visvesvara *et al.*, 1983). Así mismo, las infecciones por *Acanthamoeba* en piel pueden ser una manifestación de una infección en otro órgano y que se hayan diseminado por vía hematológica o bien, puede ser el foco primario de la infección a través de heridas o quemaduras cutáneas y de ahí diseminarse a otros órganos (Friedland *et al.*, *op. cit.*; Murakawa *et al.*, *op. cit.*, Tan *et al.*, *op. cit.*).

Hasta el momento, es aceptado que la vía de entrada de estas amibas hacia el cerebro puede ocurrir a través del neuroepitelio olfatorio o por vía hematológica (Martínez *et al.*, 1975); sin embargo, no se han realizado estudios experimentales que ayuden a determinar la invasión a partir de un foco primario de infección en piel.

Es por ello, que en el presente trabajo se describen los eventos morfológicos (24h, 48h y 18 días) de la invasión de *Acanthamoeba castellanii* en un modelo murino de piel irradiada con luz UV-B. Cabe mencionar, que este trabajo es el primero en describir la invasión de amibas del género *Acanthamoeba* en piel, el cual se realizó con una cepa de la especie *A. castellanii*, aislada de un caso clínico de QA, misma que pertenece al grupo II considerando criterios morfológicos y se sabe que en este grupo están reportadas especies de importancia médica (Pussard y Pons, 1977).

Así mismo, ésta cepa fue ubicada en el genotipo T4, el cual está relacionado con enfermedades en humanos como: encefalitis amibiana granulomatosa y queratitis amibiana (Siddiqui, *op. cit*), y se ha comprobado su capacidad invasiva en modelos animales in vitro, a través de interacciones de trofozoítos con córnea de hámster Dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*) (Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*; Omaña-Molina *et al.*, *op. cit*), en córnea humana (Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*) y en cultivos MDCK (González-Robles *et al.*, *op. cit.*; Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*).

Todos los ensayos fueron llevados a cabo en las condiciones que permitieran el desarrollo óptimo de las amibas, por lo que fueron cosechadas en su fase exponencial de crecimiento, la cual corresponde a las 72h, y a una temperatura óptima de 30 °C, siendo la temperatura habitual para el crecimiento de aislados de QA (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Desde el momento en que la cepa se aisló de un caso clínico fue considerada patógena, no obstante, las amibas se mantuvieron en cultivo axénico durante varios meses, por lo que fue necesario reactivar la virulencia de la cepa por medio de la inoculación en ratones machos BALB/c sanos de 3 semanas de edad. Lo anterior se sustentó en 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, *op. cit*; John y Howard, 1993; Salazar, 2007; Castro, 2012). Im y Kim en 1998 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.

En este estudio, al llevar a cabo la reactivación de la virulencia se observó que *A. castellanii* fue invasiva, ya que se aislaron trofozoítos de todos los órganos extraídos (cerebro, pulmón, hígado y riñón) después de la inoculación intranasal con estas amibas. Así también, se consideró virulenta ya que mató a dos de los cinco ratones inoculados antes de los 21 días tal como lo establece Culbertson (1959). Es importante enfatizar que aunque no todos los ratones murieron, la muerte de los dos ratones se registró a los 7 días post-inoculación, similar al tiempo en que *Naegleria fowleri*, considerada como una especie de AVL muy virulenta, provoca la muerte en animales experimentales (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

Así mismo, May y John en 1982 realizaron un trabajo en donde describen la invasión en tiempos tempranos con *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.

Con el fin de inmunolocalizar y describir la invasión de *A. castellanii* en piel se realizó la técnica de inmunohistoquímica. Para esta prueba se utilizaron anticuerpos anti-*A. castellanii*, obtenidos a través de un esquema de inoculación en conejo de raza Nueva Zelanda, sanos.

La inmunohistoquímica es una técnica diagnóstica útil para determinar antígenos o anticuerpos en muestras biológicas, que en este caso fueron los cortes histológicos de piel de ratón desnudo irradiados con luz UV-B, los cuales fueron inoculados intradérmicamente con trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* e interactuados con trofozoítos de la misma en lesiones cutáneas.

En cuanto al modelo murino de piel irradiada con luz UV- B, se comprobó que la radiación UV-B provocó lesiones en la piel de ratones SKH-1; una lesión eritematosa y una lesión relacionada con el desarrollo de carcinoma lo cual coincide con Makinen y Stenback, (1998) y Cano- Gómez *et al.*, (2010) quienes en sus estudios concluyen que la exposición excesiva a la UV-B es carcinogénica, y que las lesiones epidérmicas y dérmicas son más fácil de ser inducidas por la radiación UV-B en los ratones SKH-1. Por lo anterior y debido a la gran similitud de las lesiones desarrolladas por los animales de forma experimental, con las que tienen lugar en la piel humana tras la exposición crónica a radiaciones ultravioleta (Benavides *et al.*, 2009), se consideró el modelo establecido sobre ratones desnudos SKH-1, útil para el estudio de la infección por *Acanthamoeba castellanii* en piel lesionada o dañada.

Los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos de la interacción e inoculación de amibas en piel lesionada y dañada del modelo murino de piel irradiada con luz UV-B, nos permitió confirmar los mecanismos dependientes de contacto, como la adherencia, migración hacia capas más profundas de la piel y penetración de las amibas desde las 24 h post- inoculación intradérmica, encontrándose en epidermis y dermis. A las 48 post- inoculación intradérmica las

amibas siguen penetrando y migrando hacia hipodermis y músculo, encontrándose trofozoítos adosados y adheridos a componentes dérmicos tales como quistes pilosos, adipocitos y vasos sanguíneos. En las lesiones cutáneas, un carcinoma de células escamosas (18 días post- interacción) y una lesión eritematosa (48 h post- interacción), donde fueron aplicadas tópicamente las amibas; se observaron mayor cantidad de trofozoítos viables en óptimas condiciones y de manera constante en todas las capas de piel: epidermis, dermis e hipodermis, así como en músculo; penetrando de manera mecánica a través de las uniones celulares del tejido, interaccionando con componentes dérmicos tales como quistes pilosos y adipocitos, encontrándose adosados y adheridos a estos componentes, los cuales se encuentran revestidos por un epitelio queratinizado y pueden contener sebocitos en la pared, pudiendo ser estos contenidos fuente de alimento para las amibas. Cabe mencionar que no se mostraron daños aparentes en el tejido y no hubo presencia de amibas en forma quística. Lo anterior concuerda con Carrada (2005) en donde describe que la acanthamebosis cutánea comienza con la adhesión del trofozoíto a las células epiteliales, a través de moléculas de adhesión. Del mismo modo, las amibas se localizan especialmente de manera constante a lo largo de la dermis, principalmente alrededor de vasos sanguíneos y en el tejido graso subcutáneo, lo cual concuerda con estudios histopatológicos de lesiones en piel de paciente infectados con *Acanthamoeba* (Torres, *op. cit.*).

La localización de trofozoítos rodeando vasos sanguíneos, sugiere su búsqueda por oxígeno, lo que les permite alcanzar el sistema circulatorio propagándose al resto del cuerpo, pudiendo alcanzar el SNC por la vía hematológica, puesto que 18 días post- interacción de amibas en la lesión (carcinoma), el ratón presentó síntomas tales como aletargamiento y asterixis (temblores), esto se comprobó al observar cortes histológicos de cerebro encontrándose trofozoítos en él, lo cual indica una invasión vía hematológica a través de los vasos sanguíneos hacia el cerebro; así también, se encontraron trofozoítos en bazo e hígado, lo cual indica una diseminación al resto del cuerpo.

Cabe mencionar, que se observa actividad colagenolítica cercana a zonas con trofozoítos, lo que sugiere la actividad colagenolítica por parte de *Acanthamoeba castellanii* lo que concuerda con lo reportado por He *et al.* (1990) y Rocha- Azevedo

(2009) quienes encuentran colagenasa en cultivos axénicos de *Acanthamoeba*, así como concentraciones más bajas de otras enzimas proteolíticas. Además los neutrófilos infiltrados y activados a su vez pueden exacerbar la lisis de colágeno y la necrosis de queratocitos a través de la liberación de varias enzimas lisosomales inespecíficas y metabolitos de oxígeno. Se ha sugerido que la necrosis estromal característica de la queratitis amibiana es el resultado de enzimas colagenolíticas liberadas de los lisosomas de neutrófilos que se infiltran en las córneas infectadas (Garner, 1988). Así también, se ha reportado áreas difusas de colágeno en muestras de piel de pacientes infectados con *Acanthamoeba*, lo que sugiere una actividad colagenolítica por parte de la amiba (Paltiel *et al.*, *op. cit.*).

Con base en estas observaciones, la amiba también causa daño dependiente de contacto en el hospedero (Munive y Rojas, 2008). Es probable que enzimas favorezcan la lisis de la matriz extracelular facilitando la invasión de los tejidos por parte de la amiba (Magaña *et al.*, 2008), así mismo, además de abrirse camino a través de las proteínas de la matriz extracelular podría fagocitarla y utilizarla como fuente de alimento.

Del mismo modo, la manera como *Acanthamoeba castellanii* invade el tejido cutáneo se asemeja a como lo hacen otras amibas patógenas relacionadas también en lesiones en piel como lo son *Entamoeba histolytica* (Godbold y Mann *et al.*, 1998) y *Balamuthia mandrillaris* (Cabello- Vílchez, *op. cit.*)

Cabe mencionar, que la piel de las zonas control (zonas ventrales no irradiadas con luz UV-B e inoculadas con amibas) fueron resistentes a la invasión debido a que no se inmunolocalizaron trofozoítos o quistes, ni tampoco se observó daño en su histología.

La implementación de modelos experimentales es de gran importancia para poder comprender y explicar la invasión de *Acanthamoeba* en la piel. El modelo utilizado en este trabajo en tiempos tempranos de interacción nos da evidencia de que las amibas invaden la piel de modo semejante como lo hacen en córnea humana (Omaña-Molina *et al.*, *op. cit.*) y en córnea de hámster (Omaña-Molina *et al.*, 2013), mostrando una adherencia, migración y penetración a través de las uniones celulares lo que sugiere que se abren paso por acción mecánica, lo cual confirma la

importancia de los mecanismos dependientes de contacto en las especies del género *Acanthamoeba* para llevar a cabo la infección.

Con lo anteriormente mencionado, se puede concluir que a través del modelo murino de piel lesionada y dañada por irradiación con luz UV-B, se demostró que trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* son capaces de invadir áreas de piel expuestas o dañadas por la luz UV-B, así como invadir vía hematógica el SNC a través de una lesión expuesta causando EAG.

8. CONCLUSIONES

- Este trabajo es el primero en realizar la descripción de los eventos tempranos de invasión de amibas del género *Acanthamoeba* en un modelo murino de infección en piel.
- Se confirma el potencial patógeno e invasivo de la cepa *A. castellanii*.
- Las amibas invaden principalmente dermis e hipodermis en ambos grupos experimentales.
- *A. castellanii* muestra actividad colagenolítica.
- A través del modelo murino de piel lesionada y dañada por irradiación con luz UV-B, fue posible demostrar que trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* son capaces de invadir áreas de piel expuestas o dañadas por la luz UV-B, así como invadir vía hematogena el SNC a través de una lesión expuesta causando EAG.

9. PERSPECTIVAS

Se sugiere la realización de más estudios que permitan describir la invasión de estas amibas en tiempos más largos, con el fin de determinar las moléculas involucradas durante la invasión o la resistencia de estos protozoos, para poder tener un mejor entendimiento de los mecanismos de defensa, así como los mecanismos de patogenicidad de estas amibas anfizoicas, con el fin de que las biopsias de las lesiones cutáneas sean tempranas y el diagnóstico histopatológico sea el correcto antes de que los pacientes desarrollen una lesión avanzada del SNC y se puedan salvar vidas en algunos casos.

10. LITERATURA CITADA

- Ahearn, D.G., Simmons, R.B., Ward, M.A. y Stulting, R.D. 2012. Potential resistant morphotypes of *Acanthamoeba castellanii* expressed in multipurpose contact lens disinfection systems. *Eye and Contact Lens*. 38 (6):400-405.
- Alves, D. S., Morales, 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.
- Anderlini, P., Przepiorka, D., Luna, M., et al. 1994. *Acanthamoeba* meningoencephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 14:459-461.
- Arias-Fernández, M.C., Paniagua-Crespo, E., Martimallen, M., Peñas-Aves, M.P.M. y Castro-Casas, M.L. 1989. Marine Amoeba from waters of north-western Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species. *J. Protozool.* 36(3):239-241.
- Barbeau, J. y Buhler, T. 2001. Biofilms augment the number of free living amoebae in dental unit waterlines. *Res. Microbiol.* 152: 753-760.
- Barker, J., Humphrey, T.J. y Brown, M.W. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS MicrobiolLett.* 173(2):291-295.
- Barsoum, R. S. 2004. Parasitic Infections in Organ Transplantation. *Exp. and clinical transplantation*, (2): 258-267.
- Benavides, F., Oberyszyn, M. T., VanBuskirk, M. A., Vivienne, E. R., y Kusewitt, D. F. 2009. The hairless mouse in skin research. *Jour. Of Derma. Scie.* 53:10-18.
- Breland, M. y Beckmann, N. 2016. Case Report: Amebic osteomyelitis in an immunocompromised patient. *Radiology Case Report.* 207-211.
- 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.
- Bronfield, M. N., Reid, M. R., Rutishauser, R. L., Cope, J. R., Tang, J., Ritter, J. M., Matanock, A., Ali, I., Doernberg, S. B., Hilts-Horeczko, A., DeMarco, T., Klein, L. y Badik J. M. 2017. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a heart transplant

- recipient treated successfully with a miltefosine-containing regimen: case report and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis*, 19(2), 10.
- Brown, T. J., Cursons, R. T. M. y Keys E. A. 1978. Virulence of pathogenic free-living amoebae. *J. Parasitol.* 64: 744-745.
- Cabello-Vílchez, A.M. 2016. Balamuthia mandrillaris en el Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. *Infection*, 20 (2): 107-109.
- Cano, G. A., Gómez. F. J., Álvarez, N., Sánchez-Pedreño, P. y Vicente, V. 2010. Modelo de fotocarcinogénesis cutánea en ratones SKH-1 por radiación ultravioleta. *Revista Española de Patología.* 43(4): 191-195.
- Carrada. T. 2005. Amebiasis cutánea: parasitosis emergente y letal. *Piel*, 20:28-34.
- Casemore, D. P. 1977. Free-living amoebae in home dialysis unit. *Lancet. Volumen;* 2(8047):1078.
- Casper, T., Basset, D., Leclercq, C., et al. 1999. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS: response to 5-fluorocytosine therapy. *Clin Infect Dis*, 29:944-945.
- Castellani, A.1930. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. *Am 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.
- Chagla, A. H. y Griffiths, A. J. 1974. Growth and encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* 85:139-145.
- Chamorro, L., Madrigal-Sesma, M.J. y Zapatero-Ramos. L.M. 1989. The pathogenicity of free-living amoebae isolated from the intestinal tract of reptiles. *Exp Parasitol.* 65(1):154-155.
- Chandrasekar, P.H., Nandi, P.S., Fairfax, M.R., et al. 2007. Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med.* 157:569-572.

- Chusattayanond, A.D., Boonsilp, S. y Kasisit, J. 2010. *Acanthamoeba* isolate (T4) induced apoptotic death in neuroblastoma cells via the Bax-mediated pathway. *Parasitol Int* 59: 512-516.
- Clarke, D.W. y Niederkorn, J.Y. 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol* 22: 175–180.
- Corsaro, D., Walochnik, J., Kohsler, M. y Rott, M.B. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research*. DOI: 10.1007/s00436-015-4445-8.
- Culbertson, C.G., Smith, J.W. y Minner J.R. 1958. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science*. 127: 1506.
- 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.
- De Jonckheere, J. y Van 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.
- De Jonckheere, J.F. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: Survey in Belgium. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 130B:205-212.
- Deluol, A.M, Teilhac M.F, Poirot J.L, et al. 1996. Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* sp in a patient with AIDS. *J Eukaryot Microbiol*, 43:130S-131S.
- Diaz, J.H. 2010. Increasing intracerebral infections caused by free-living amebae in the United States and Worldwide. *J Neuroparasitol.* 1(1): 1–10.
- Duggal. S.D., Rongpharpi, S.R., Duggal, A.K., Kumar, A., Biswal, I. 2017. Role of *Acanthamoeba* in Granulomatous Encephalitis: A Review. *J Infect Dis Immune Ther* 1:1.
- Dunand VA, Hammer SM, Rossi R, et al. 1997. Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. *Clin Infect Dis.* 25:267-272.
- Dwivedi, J.N. y Singh, C.M. 1965. Pulmonary lesions in an Indian buffalo associated with *Acanthamoeba* sp. *Indian J Microbiol* 5:31–4.

- Dyková, I., Lom, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Booton, G.C. y Byers, T.J. 1999. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J Parasitol.* 85(6):1106-1013.
- 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.
- Fuentealba, I.C., Wikse, S.E., Reed, W.K., Edwards, J.F. y Visvesvara, G.S. 1992. Amebic meningoencephalitis in a sheep. *J Am Vet Med Assoc.* 200:363–5.
- Galarza, C., Ramos, W., Gutiérrez, E.L., Ronceros, G., Terán, M., Uribe, M., Navincopa, M. y Ortega, L.A. 2009. Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *Int J Dermatol.* 48(12): 1324–1329.
- Garate, M., Cao, Z. y Bateman, E. 2004. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem.* 279: 29849-29856.
- Garate. M., Marchant, J., Cubillos, I., Cao, Z., Khan, N.A. y Panjwani N. 2006. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1056–1062.
- Garner, A. 1988. Pathology of corneal acanthamoebic infection. In *The Cornea: Transactions of the World Congress on the Cornea III.* Raven Press. pp. 535-539.
- Godbold, G.D. y Mann, B.J. 1998. Involvement of the actin cytoskeleton and p21^{rho} family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 31, 1049-1058.
- Gómez- Marín, J.E. 2010. Protozoología médica: protozoos parásitos en el contexto latinoamericano. Bogotá. Manual Moderno. p. 83- 173.
- González, M.M., Gould, E., Dickinson, G., et al. 1986. Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Arch Pathol Lab Med*, 110:749-751.
- 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. *Exp. 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.
- 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.
- He, Y.G., Niederkorn, J.Y., McCulley, J.P., Stewart, G.L., Meyer, D.R., Silvany, R. y Dougherty, J. 1990. In Vivo and In Vitro Collogolytic Activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31 (11).
- Helton, J., Loveless, M. y White, C.R. 1993. Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. *Am J Dermatopathol*, 15:146-149.
- Hunt, S., Reed, S., Matthews, W. y Torian, B. 1995. Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multi drug therapy. *Cutis*, 56(5): 285-287.
- Im, K. y Kim, D.S. 1998. Acanthamoebiasis in Korea: two new cases with clinical cases review. *Yonsei Med J*. 39:478-484.
- Jager, B.V. y Stamm, W.P. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet*.23: 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.
- Jung, S., Schelper, R.L., Visvesvara, G.S., Chang, H.T. 2004. *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis in an immunocompetent patient: an unusual clinical course and a favorable outcome. *Arch Path Lab Med*. 128: 466–468.
- Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M. y Friedman, M.G. 2001. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Appl Environ Microbiol*. 67(10): 4789–4795.

- Kandukuri, S., Morgan, M., Zakowski, P., Visvesvara, G.S., Falk, J., Roy, S., Chaux, G., Ghandehari, S. y Wu, J. 2015. Transplant patient with skin nodules. *Am. J. Dermatopathol*, (37):254–256.
- Khan, N.A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 564-595.
- Khan, N.A. y Siddiqui, R. 2009. *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *Int J Parasitol* 39: 1611-1616.
- Kliescikova, J., Kulda, J. y Nohynkova, E. 2011. Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. *Exp. Parasitol*. 127:326–328.
- Kong, H.H. 2009. Molecular Phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol*. 47: S21-S28.
- Król-Turmińska, K. y Olender, A. 2017. Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 24 (10): 254–260.
- 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.
- Kinde, H., Read, D.H., Daft, B.M., Manzer, M., Nordhausen, R.W., Kelly, D.J. y Visvesvara, G.S. 2007. Infections caused by pathogenic free-living amebas (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19: 317-322.
- Kingston, D, Warhurst, D. C. 1969. Isolate of amoebae from the air. *J. Med. Microbiol*. 2:27-36.
- Koshy, A., Blackburn G y Singh U. 2009. Free living amebas En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 7th ed. Cap. 274. *Filadelfia: Churchill Livingstone, Elsevier*, 3427-36.
- Krishna-Prasad, B.N. y Gupta, S.K. 1978. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr Sci*. 47: 245–247.

- Kutner, A., Aldrich, M., Patel, S., *et al.* 2018 *Acanthamoeba* endophthalmitis during treatment for cutaneous disease in a renal transplant patient. *Transpl Infect Dis*, 20:e12843.
- La Scola, B. y Raoult, D. 2001. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect.* 7(2):75–79.
- Libbey, J. E., Matthew, F. y Fujinami, R. S. 2014. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int. Rev. Immunol*, 33(4), 266–283.
- 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.
- Lorenzo- Morales, J., Cabello- Vílchez, A.M., Martín- Navarro, C.M., *et al.* 2013. Is *Balamuthia mandrillaris* a public health concern worldwide?. *Trends in Parasitology*, 29(10), 483-488.
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A. y Walochnik, J. 2015. An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.* 22: 10.
- Ly, T.M. y Muller, H.E. 1990. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol.* 33(1):51–54.
- Madrigal-Sesma, M.J. 1988. Isolation of free-living amoebae, potentially pathogenic for humans, from 3 species of saurians from the western Canary Islands. *Rev Sanid Hig Publica.* 62(1-4):1405-1409.
- Magaña, M.L, Fernández-Díez, J. y Magaña, M. 2008. Cutaneous amebiasis in pediatrics. *Arch Dermatol* 144:1369-1372.
- Makinen, M. y Stenback, F. 1998. Skin tumor development and keratin expression in different experimental models. Relation to inducing agent and target tissue structure. *Exp. Toxic. Pathol.* 50:199-208.
- Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. A. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev*, 16(2), 273-307.
- Martínez, A.J., Markowitz, S.M. y Duma, J.R. 1975. Experimental pneumonitis and encephalitis caused by *Acanthamoeba* in mice: pathogenesis and ultrastructural features. *J Infect Dis.* 131:692–699.
- Martinez, A.J. 1982. Case report. Acanthamoebiasis and immunosuppression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 41:548-557.

- Martínez, A. J. 1991. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis*, 13(5):399-402.
- Martínez, J. y Visvesvara, G. 1997. Free living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*, 7: 583-598.
- Martínez, D.Y., Seas, C., Bravo, F., Legua, P., Ramos, C., Cabello, A.M., Gotuzzo, E. 2010. Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. *Clin Infect Dis*. 51(2): 7–11.
- Massilamany, C., Marciano-Cabral, F., Rocha-Azevedo, B.D., Jamerson, M., Gangaplara, A., et al. 2014. SJL mice infected with *Acanthamoeba castellanii* develop central nervous system autoimmunity through the generation of cross-reactive T cells for myelin antigens. *PLoS ONE*, 9(5).
- May, L.P., Sidhu, G.S. y Buchness, M.R. 1992. Diagnosis of *Acanthamoeba* infection by cutaneous manifestations in a man seropositive to HIV. *J Am Acad Dermatol*. 26:352-355.
- Michel, R., Burghardt, H. y Bergmann, H. 1995. *Acanthamoeba* naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 196(6):532–544.
- Migueles, S. y Kumar, P. 1998. Primary cutaneous *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis*, 27:1547-1548.
- Munive, M. y Rojas, M. 2008. Amebiasis intestinal y cutánea. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXV*: 153-157.
- 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. y Playfair, T.J. 1974. Amoebic infections of the eye. *Lancet*.304: 1537–1540.
- Niederkon, J., Ubelaker, J. E., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Mellon, J. A., Silvany, R. E., He, Y., Pidherney, M., Martin, J. H. y Alizadeh, H. 1992. Susceptibility of corneas from various animal species to in vitro binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33:104-112.

- Oddó, D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Rev Chil Infect.* 23 (3): 200-214.
- Oliva, S., Jantz, M., Tiernan, R., et al. 1999. Successful treatment of widely disseminated acanthamoebiasis. *South Med J.* 92:55-57.
- 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.
- Omaña-Molina, M; González-Robles, A., Salazar-Villatoro, LI., Cristóbal-Ramos, AR., González-Lázaro, M., Salinas-Moreno, E., Méndez-Cruz, R., Sánchez-Cornejo, M., De la Torre-González, E. y Martínez-Palomo, A. 2010. *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of the interaction with human cornea. *Exp Parasitol*, 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.
- Omaña-Molina, M., Hernández-Martínez, D., Sánchez-Rocha, R., Cárdenas-Lemus, U., Salinas-Lara, C., Méndez-Cruz, AR., Colín-Barenque, L., Aley-Medina, P., Espinosa-Villanueva, J., Moreno-Fierros, L., Lorenzo-Morales, J. 2017. *In vivo* CNS infection model of *Acanthamoeba* genotype T4: the early stages of infection lack presence of host inflammatory response and are a slow and contact dependent process. *Parasitol Res*, 116(2).
- Page, C.F. 1988. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae with instructions for culture collection of Algae and Protozoa. Freshwater Biological Association. England. 122pp.

- Page, M.A. y William, D.M. 2013. Acanthamoeba Keratitis: A 12-Year Experience Covering a Wide Spectrum of Presentations, Diagnoses, and Outcomes. *J Ophthalmol.* 1–6.
- Pathiel, M., Powell, E., Lynch, J., Baranowski, B., y Martins, C. 2004. Disseminated Cutaneous Acanthamebiasis: A Case Report and Review of the Literature. *Cutis*, 73:241-248.
- Parmar, D.N., Awwad, S.T., Petroll, W.M., Bowman, R.W., McCulley, J.P., Cavanagh, H.D. 2006. Tandem scanningconfocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected Acanthamoeba Keratitis. *Ophthalmol.* 113(4): 538–547.
- Peralta, M.L. y Ayala J.J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uninorte. Barranquilla.* 25 (2): 280-292
- Pritzker, A.S., Kim, B.K., Agrawal, D., Southern, P.M. Jr., Pandya, A.G. 2004. Fatal granulomatous amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* presenting as a skin lesion. *J Am AcadDermatol.* 50(2): 38–41.
- Pussard, M. y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*; 13:557–598.
- Reddy, R., Vijayasaradhi, M., Uppin, M.S., Challa, S., Jabeen, A., Borghain, R. 2011. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in an immunocompetent patient: an autopsy case report. *Neuropathol*; 31(2): 183–187.
- Ríos-Yuil, J.M., Mercadillo-Pérez, P., Yuil-de Ríos, E. y Ríos-Castro, M. 2012. Cutaneous amebiasis: Current concepts. *Rev Med Hosp Gen Méx*, 75(2):114-122.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in México city and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollut*, 74: 65-87.
- Rivera, M.A. y Padhya, T.A. 2002. *Acanthamoeba*: a rare primary cause of rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 112:1201-1203.
- Rocha-Azevedo, B., Jamerson, M., Cabral, G.A., Silva-Filho, F. y Marciano- Cabral, F. *Acanthamoeba* Interaction with Extracellular Matrix Glycoproteins: Biological and Biochemical Characterization and Role in Cytotoxicity and Invasiveness. *J. Eukaryot. Microbiol*, 56(3), 2009 pp. 270–278.

- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of Free Living Amoebae. *Crit Rev Microbiol.* 20(3): 225 -241.
- Rosenberg, A.S. y Morgan, M.B. 2001. Disseminated acanthamoebiasis presenting as lobular panniculitis with necrotizing vasculitis in a patient with AIDS. *J Cutan Pathol*, 28:307-313.
- Rowbotham, T.J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* 33(12):1179–1183.
- Salazar, L.I. 2007. Interacción de *Acanthamoeba* spp. con células MDCK, lentes de contacto y córneas de Hámster. Tesis de Licenciatura (Biólogo). FES Iztacala, UNAM. México. Pp. 89.
- Sawyer, T.K. 1990. Marine amoeba in waters of Chincoteague Bay, Virginia: Ecological Significance of “Old” and “New” Species. *Virgin Journ Scien.* 41(4a):433-440.
- Sawyer, T.K., Nerad, T.A. y Visvesvara, G.S. 1992. *Acanthamoeba jacobsi* sp. N. (protozoa: Acanthamoebidae) from sewage contaminated ocean sediments. *J. Helminthol. Soc.* 59(2):223-226.
- Schuster, F. L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol. Rev*, 15(3): 342-354.
- Schuster, F. L. y Visvesvara, GS. 2004. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol*, 126:91-120.
- Schwarzwald, H., Shah, P., Hicks, J., *et al.* 2003. Disseminated Acanthamoeba infection in a human immunodeficiency virus-infected infant. *Pediatr Infect Dis J*, 22:197-199.
- Selby, D.M., Chandra, R.S., Rakusan, T.A., Loechelt, B., Markle, B.M. y Visvesvara, G.S. 1998. Amebic Osteomyelitis in a Child with Acquired Immunodeficiency Syndrome: A Case Report. *Fetal PediatrPathol.* 18(1): 89–95.
- Siddiqui, R., Khan, N.A. 2008. Balamuthia amoebic encephalitis: An emerging disease with fatal consequences. *Microb Pathogenesis.* 44: 89–97.
- Siddiqui, R. y Khan, N.A. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5: 1-6.

- Siddiqui, R., Aqeel, Y., y Khan, N.A. 2013. Killing the Dead: Chemotherapeutic Strategies Against Free-Living Cyst-Forming Protists (*Acanthamoeba* sp. and *Balamuthia mandrillaris*). *J Eukaryot Microbiol*. Article in Press.
- 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.
- Sissons, J.P., Kemper, C.A., Loveless, M., et al. 1995. Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review. *Clin Infect Dis*, 20:1207-1216.
- Sissons, J., Alsam, S., Goldsworthy, G., Lightfoot, M., Jarroll, E.L. y Khan, N.A. 2006. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiol* 6: 42.
- Slater, C.A., Sickel, J.Z., Visvesvara, G.S., et al. 1994. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *N Engl J Med*. 331:85-87.
- Steinberg, J.P., Galindo, R.L., Kraus, E.S., et al. 2002. Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. *Clin Infect Dis*. 35:43-49.
- Steinert, M., Birkness, K.K., White, E., Fields, B. y Quinn, F. 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*. 64(6): 2256–2261.
- Tan, B., Weldon-Linne, C. M., Rhone, D. P., Penning, C. L. y Visvesvara, G. S. 1993. *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesion in patients with at acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med*, 117(10):1043-1046.
- Thom, S., Warhurst, D. y Drasar, B.S. 1992. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol*. 36(5):303–306.
- Torno, M.S. Jr, Babapour, R., Gurevitch, A., et al. 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J Am Acad Dermatol*. 42:351-354.
- Torres, V., Camacho, F., Mihm, M., Sober, A. y Sánchez, C. 2005. Dermatología Práctica Ibero-Latinoamericana. México, D.F.; p. 283-4.

- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathologie-Biologie*. 60: 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 Hamme, C., Dumont, M. y Lachapele, M. J. 2001. Cutaneous acanthamebiasis in a lung transplant patient. *Ann. Dermatol. Venereol.* 128: 1237-1240.
- Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A.V., Vásquez-Morales, J.A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J.F. y Lares-Villa, F. 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch Med Res.* 36(1): 83–86.
- Visvesvara, G.S., Mirra, S.S., Brandt, F.H., Moss, D.M., Mathews, H.M., Martinez, A.J. 1983. Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J Clin Microbiol.* 18(6):1405-1412.
- Visvesvara, G.S. y Maguire, J.H. 2006. Pathogenic and opportunistic free-living amebas: *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. In: RL Guerrant, DH Walker, PF Weller (Eds.), *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice*. Vol. 2. Churchill Livingstone (Elsevier), Philadelphia, pp. 1114–1125.
- Visvesvara, G., Moura, H. y Schuster, F. 2007. Pathogenic and oportunist free-living amoebae: *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia madrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Immunology Med microbial.* 50(1): 1-26.
- Visvesvara, G. S., Roy, S. L. Maguire, J. H. 2010. 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 S. 2015. Brain Eating Amoebas: Review of Recent Cases and Risk Analysis of Transmission to Recipients of Solid Organ Transplantation. En: XVI International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae – May 18th-22nd, Alghero Italy.
- Walia, R., Montoya, J.G., Visvesvera, G.S., Booton, G.C y Doyle, R.L. 2007. A case of successful treatment of cutaneous *Acanthamoeba* infection in a lung transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 9: 51-54.
- Walochnik, J., Hassl, A., Simon, K., Benyr, G. y Aspöck, H. 1999. Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae). *Parasitol Res.* 85(7): 601-603.
- Wiley, C.A., Safrin, R.E, Davis, C.E., et al. 1987. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with AIDS. *J Infect Dis.* 155:130-133.
- Winiacka-Krusnell, J., Wreiber, K., von Euler, A., Engstrand, L. y Linder, E. 2002. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis.* 34(4): 253–256.
- Winsent, F., Dietert, J., Tschen, J., Swaby, M. y Bangert, C.A. 2017. A rare case of cutaneous acanthamoebiasis in a renal transplant patient. *Derm.Online Journal*, 23(3):11.

11. ANEXOS

Anexo1. Agar no nutritivo (NNE) con *Enterobacter aerogenes*

NaCl 0.120 gr

MgSO₄H₂O 0.004 gr

CaCl₂H₂O 0.004 gr

Na₂HPO₄ 0.142 gr

KH₂PO₄ 0.136 gr

Bactoagar 15.000 gr

Agua destilada 1000 ml

El agar NNE se prepara disolviendo los componentes con el agua destilada que se calienta hasta su punto de ebullición. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min, y cuando se ha enfriado un poco se vacían aproximadamente 15 ml del agar en cajas Petri previamente esterilizadas. Cuando el agar solidifica, se inocula una preparación de bacterias de la especie *Enterobacter aerogenes* inactivada. Las bacterias se obtienen a partir de cultivos puros e inactivándola por calor en autoclave a 15 libras de presión por 5 min.

En las cajas Petri con agar se depositan aproximadamente 0.5 ml de solución de bacterias inactivadas la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie del medio con asa de vidrio estéril. Se dejan reposar por una hora y se guardan en el refrigerador hasta su uso.

Anexo 2. Recuento de células por exclusión del azul de tripano.

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

1. Se añaden 90 ml del cultivo amibiano y 10 ml de azul de tripano y se incuba durante 3 minutos. (Nota: tiempos muy largos de exposición al colorante pueden hacer que las células vivas acaben por captar también éste).
3. Recuento celular en un porta objetos se colocan 10 μ l de la mezcla de amibas y azul de tripano, se coloca un cubreobjetos para poder observar al microscopio con objetivo 40 x, posteriormente se realiza un conteo de 100 amibas.

Anexo 3. Técnica de inmunohistoquímica

1. Desparafinar la muestras a 70° C por una hora.
2. 5 a 10 baños
 - a) Xilol I
 - b) Xilol II
 - c) Xilol III
 - d) Alcohol 100%
 - e) Alcohol 100%
 - f) Alcohol 96%
3. 3 lavados en TBST.
4. Colocar 400 µl de proteínasa K preparada y dejar por 15 min. (Se preparara al momento).
5. 3 lavados con TBST.
6. 2 lavados con agua destilada.
7. Colocar 200 µl de peróxido por 15 min.
8. 2 lavados con agua destilada.
9. 3 lavados con TBST.
10. Bloqueo con 250 µl de suero fetal bovino al 5% por 2 horas (se prepara al momento).
11. Colocar 400 µl de suero de conejo (anticuerpo primario) toda la noche. El suero es diluido 1:400 (se prepara al momento).
12. Lavar 3 veces con TBST.
13. Colocar la cantidad necesaria para cubrir el tejido con Match 2 por 30 min. (Segundo anticuerpo). Cada gota es de 30 µl.
14. Lavar 3 veces con TBST.
15. Colocar DAB el tiempo que sea necesario (5- 15 seg.) hasta que cambie de color café (Se prepara al momento). Hacer en el microscopio. (Usar guantes y cubrebocas).
16. Lavar 3 veces con TBST.

17. Tren de tinción
- Hematoxilina (3 min.) (Dejar caer la laminilla).
 - Agua destilada (5 a 10 lavados).
 - Alcohol 96 %
 - Alcohol 96 %
 - Alcohol 100 %
 - Alcohol 100 %
 - Xilol III
 - Xilol II
 - Xilol I
18. Montaje con resina.

Reactivos para Inmunohistoquímica

Buffer TBST (1 L)

- 2.4 gr. de Tris- HCl
- 0.56 gr. de Tris base
- 8.8 gr. de NaCl
- 1 ml de Tween 20
- 1 L de agua destilada

Disolver Tris – HCl, Tris base y NaCl en 800 de agua destilada, ajustando el pH a 7.6. Después se afora a 1L y se agrega el Tween 20.
 NOTA: El buffer TBST puede durar hasta dos semanas en refrigeración.

Proteinasa K

- Proteinasa K disuelta en agua destilada (1 mg / 1 ml).
- 100 ml. de buffer TBST
- 0.1 gr. de CaCl₂

Al buffer TBST se le agrega el CaCl₂, se disuelve completamente y se le agrega la proteinasa necesaria:

Reactivo/ laminilla	1	2	3	4	5
Proteinasa	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	250 µl
Buffer TBST con CaCl ₂	450 µl	900 µl	1,350 µl	1,800 µl	2,250 µl
Total	500 µl	1,000 µl	1,500 µl	2,000 µl	2,500 µl

NOTA: El buffer TBST puede durar hasta dos semanas en refrigeración.

Peróxido de hidrógeno

- 3 ml. de H₂O₂ AL 30 %
 - 97 ml. de agua destilada
- Se mezclan los dos reactivos. La mezcla puede durar meses.

Suero fetal bovino

- Suero fetal bovino
- Buffer TBST

Se descongela el suero fetal bovino y se mezcla lo necesario con buffer TBST.

Reactivo/ laminilla	1	2	3	4	5
Suero fetal bovino	12.5 µl	25 µl	37.5 µl	50 µl	62.5 µl
Buffer TBST	237.5 µl	475 µl	712.5 µl	950 µl	1,187.5 µl
Total	250 µl	500 µl	750 µl	1,000 µl	1,250 µl

Suero de conejo

- Suero de conejo
- Buffer TBST

Se descongela el suero del conejo y se mezcla lo necesario con buffer TBST.

Reactivo/ laminilla	1	2	3	4	5
Suero de conejo	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl
Buffer TBST	399 µl	798 µl	1, 197 µl	1, 596 µl	1,995 µl
Total	400 µl	800 µl	1,200 µl	1,600 µl	2,000 µl

Kit de revelado - DAB

Solución de trabajo:	2.5 ml.-----	Para 5.0 ml.
Agua destilada	2.5 ml. -----	5.0 ml.
Solución stock buffer	1 gota -----	2 gotas
Solución DAB	2 gotas -----	4 gotas
Solución de peróxido de H	1 gota -----	1 gota

Anexo 4. Tinción Hematoxilina & Eosina

DESPARAFINAR

1. Xilol – 5 min
2. Xilol – 5 min

HIDRATAR

3. Alcohol etílico absoluto – 3 min
4. Alcohol etílico al 96% - 3 min
5. Alcohol etílico al 90 % - 3 min
6. Alcohol etílico al 80% - 3 min
7. Alcohol etílico al 70% - 3 min
8. Agua corriente – 3 min

TINCIÓN NUCLEAR

9. Hematoxilina de Harris – 7 min
10. Agua corriente- lavar (Hasta quitar el exceso de colorante).

DIFERENCIAR

11. Alcohol ácido al 1% - paso rápido
12. Agua corriente – lavar

VIRAR

13. Agua amoniacal – hasta virar a azul
14. Agua corriente- lavar

TINCIÓN CITOPLASMÁTICA

15. Eosina – 5 min

DESHIDRATAR

16. Alcohol etílico al 96% - 30 seg.

17. Alcohol etílico absoluto – 3 min

18. Alcohol etílico absoluto – 5 min

ACLARAR

19. Xilol – 5 min

20. Xilol - 5 min

21. Montar con resina