

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

**“Determinación de características asociadas al potencial patogénico de
aislamientos de *Acanthamoeba*, obtenidos a partir de muestras de equipos
de la Universidad de Costa Rica”**

Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en
Microbiología y Química Clínica

Esteban Castro Artavia
Carné: B01509

Comité asesor:

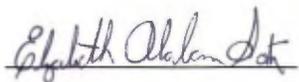
Tutor: Elizabeth Abrahams Sandí, PhD.
Lectores: Alexandra Rucavado Romero, PhD
Alfredo Castro Castillo, PhD.

Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIET)
Laboratorio de Protozoología Médica, Facultad de Microbiología

Julio-2015

Julio, 2015

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación:



Dra. Elizabeth Abrahams Sandí

Tutor



Alexandra Rucavado Romero

Lector



Dr. Alfredo Castro Castillo

Lector



Dra. Norma Gross Martinez

Presidente del Tribunal



Dra. Ana Fernández Sánchez

Profesor designado

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional durante estos años. Mi familia ha sido un pilar para mi persona durante mis años de estudio en la carrera de Microbiología, la cual representa para mí la mejor carrera universitaria que pude haber escogido. Quiero agradecer principalmente a mis padres por su comprensión y su apoyo incondicional. Siempre me han enseñado que luchar por nuestros sueños es indispensable en la vida.

No hay palabras para describir lo agradecido que me siento hacia la sección de Protozoología Médica por darme la oportunidad de desarrollar esta investigación, y por su completa dedicación y confianza en mi persona para llevarla a cabo. Principalmente quiero agradecer a la Dra. Lissette Retana Moreira, por brindarme su tutoría durante todo el proceso, por no ser únicamente mi tutora, sino también una amiga. También a la Dra. Elizabeth Abrahams Sandí, una gran investigadora, la cual fue la pieza clave para desarrollar la investigación, ya que siempre brindó su ayuda en la parte experimental y en el análisis de datos de manera desinteresada. Todo el departamento de Protozoología ha sido parte de este viaje: el Sr. Dennis Camareno, Dr. Alfredo Castro, Dra. Ana Fernández, y el estudiante Daniel Vargas, todos compañeros de proyecto y que de una u otra forma hicieron este proyecto realidad, ya que no es solamente mío, sino de toda la sección.

También quiero agradecer al Departamento de Virología de la Facultad de Microbiología, principalmente al Sr. Francisco Vega, que fue de increíble ayuda para el cumplimiento del objetivo de determinar el efecto citopático en cultivo celular, siempre de forma amable ayudándome en este proceso y aconsejándome, además a la Dra. Eugenia Corrales y al Dr. Jorge Arias. De igual forma, agradecer a la Dra. Cynthia Arroyo por su apoyo tan sincero y amigable.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer de manera especial a la Dra. Alexandra Rucavado, investigadora del Instituto Clodomiro Picado, por su

tutoría y ayuda en el desarrollo de metodologías para este trabajo. Gracias por su apoyo incondicional y sincero.

ÍNDICE

RESUMEN	7
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	9
Justificación.....	9
Hipótesis.....	10
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	11
Amebas de vida libre: generalidades.....	11
Características biológicas de <i>Acanthamoeba</i>	13
Importancia clínica de <i>Acanthamoeba</i>	16
Encefalitis granulomatosa amebiana.....	16
Queratitis amebiana.....	18
Determinación del potencial patogénico en <i>Acanthamoeba</i>	20
Amebas de vida libre en Costa Rica.....	22
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	24
Objetivo General.....	24
Objetivos Específicos.....	24
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	25
Muestras.....	25
Unidades dentales.....	25

Aires acondicionados.....	25
Unidades combinadas de emergencia.....	25
Cultivo axénico de <i>Acanthamoeba</i>	28
Preservación de los cultivos axénicos.....	28
Evaluación del potencial patogénico mediante pruebas termotolerancia, osmotolerancia y producción de proteasas.....	29
Pruebas de termotolerancia.....	29
Pruebas de osmotolerancia.....	30
Determinación de proteasas y caracterización mediante zimografía.....	30
Obtención de proteasas.....	30
Zimografía.....	31
Determinación de los tipos de proteasas secretadas.....	32
Evaluación del efecto citotóxico en cultivo celular.....	32
Determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica.....	33
Observación al microscopio de luz y tinción con cristal violeta.....	34
Análisis estadístico de los datos.....	35
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	37
Cultivo axénico de <i>Acanthamoeba</i>	37
Resultados de pruebas de termotolerancia y osmotolerancia.....	37
Determinación de proteasas y caracterización mediante zimografía.....	39
Efecto citotóxico en cultivo celular.....	42
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	46

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	61
CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	74

RESUMEN

Las amebas de vida libre juegan un rol importante en salud pública por su capacidad de generar cuadros clínicos y su amplia distribución en diversos ambientes relacionados con el ser humano. En particular, el género *Acanthamoeba* es un género de importancia, ya que puede producir encefalitis granulomatosa amebiana en individuos inmunosupresos, un cuadro clínico que la mayoría de veces es fatal, así como queratitis amebiana en individuos inmunocompetentes. Aparte de estos dos cuadros clínicos, se reportan también otros a nivel cutáneo y pulmonar. Además de su importancia médica como agentes productores de enfermedad en el ser humano y animales, es conocida la capacidad de este género de funcionar como transportadores de bacterias y virus con potencial patogénico.

Dada la importancia clínica de *Acanthamoeba* y debido a la poca información que existe sobre amebas de vida libre en Costa Rica, con este trabajo se pretendió determinar algunas características asociadas al potencial patogénico en diferentes aislamientos de amebas del género *Acanthamoeba*, obtenidos a partir de muestras recolectadas en unidades dentales de la Facultad de Odontología, unidades de aire acondicionado de la Facultad de Microbiología y unidades combinadas de emergencia de los laboratorios de la Facultad de Química, todos ubicados en la Universidad de Costa Rica. A los diferentes aislamientos se les realizó una batería de pruebas para evaluar posible patogenicidad, las cuales incluyeron pruebas de termotolerancia y osmotolerancia, determinación de la producción de proteasas extracelulares mediante zimografía y

evaluación de efecto citopático en cultivo celular mediante la cuantificación de los niveles de DHL y microscopía de luz.

Para cumplir con los objetivos del proyecto, se trabajó con 21 aislamientos primarios de *Acanthamoeba*, provenientes de unidades dentales de la Facultad de Odontología (13 aislamientos), unidades de aire acondicionado de la Facultad de Microbiología (6 aislamientos) y unidades combinadas de emergencia de los laboratorios de la Facultad de Química (2 aislamientos). De los 21 aislamientos se obtuvo un 100% de termotolerancia a 37 °C y un 85,7% a 40 °C; un 100% presentó osmotolerancia a una concentración de 0,5 M de manitol, mientras que a 1,0 M de manitol un 90,5% la presentó.

Del total de aislamientos solo fue posible axenificar 8 (38,1%), los cuales se utilizaron para la determinación de la producción de proteasas mediante zimografía y la evaluación del efecto citopático en cultivo celular; en dos se obtuvieron pruebas positivas de termotolerancia, osmotolerancia, presencia de proteasas de serina extracelulares y un porcentaje de citotoxicidad en cultivo celular significativo (uno de una unidad dental y el otro de una unidad combinada de emergencias). Los resultados obtenidos indican la presencia de aislamientos de *Acanthamoeba* genotipo T4 con potencial patogénico en muestras obtenidas a partir de equipos que están o pueden estar en contacto directo con el ser humano.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Justificación

Los estudios sobre amebas de vida libre en Costa Rica son escasos y la información derivada de los mismos sólo hace referencia a aislamientos de amebas a partir de muestras biológicas. Actualmente, existen solo dos publicaciones que reportan el aislamiento de amebas de muestras ambientales, sin llegar a determinarse su potencial patógeno. Es por esto que surge la presente investigación, con el fin de que sea el primer estudio en Costa Rica en el que se lleve a cabo la determinación de características biológicas asociadas con la capacidad patogénica en amebas de vida libre, específicamente de *Acanthamoeba*.

Siendo un género ubicuota, ampliamente distribuido en la naturaleza, *Acanthamoeba* se encuentra asociado tanto a suelos como a aguas y polvo. De los 20 genotipos descritos, el T4 es el que se aísla con mayor frecuencia de casos clínicos. La caracterización de los aislamientos obtenidos a partir de una serie de dispositivos cuyo empleo podría suponer la exposición a estos agentes resulta relevante para la salud humana. Debido a que ya ha sido posible asociar un aislamiento de *Naegleria fowleri* en Costa Rica con la muerte de una persona, además del hallazgo de *Balamuthia mandrillaris* en dispositivos de bioseguridad, resulta evidente que existe la necesidad de determinar la capacidad de producir daño de las amebas aisladas de dispositivos estrechamente ligados con la actividad humana, identificándose así posibles focos de infección y zonas de

riesgo en los diversos ambientes ecológicos. Es por esta razón que en este trabajo surge la siguiente pregunta de investigación: ¿cuáles aislamientos de *Acanthamoeba* en unidades dentales, unidades de aire acondicionado y unidades combinadas de emergencia de la Universidad de Costa Rica son potencialmente patogénicos?

Hipótesis

Algunos de los aislamientos de *Acanthamoeba* aislados de unidades dentales, unidades de aire acondicionado y unidades combinadas de emergencia de la Universidad de Costa Rica son potencialmente patogénicos.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Amebas de vida libre: generalidades

Las amebas de vida libre pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Balamuthia* han sido conocidas por causar infecciones fatales en el sistema nervioso central en el ser humano. *Acanthamoeba* causa infecciones a nivel del sistema nervioso central en personas inmunocomprometidas y queratitis amebiana en inmunocompetentes, mientras que *Balamuthia* causa la infección a nivel de sistema nervioso central tanto en inmunocomprometidos como en inmunosupresos (Schuster & Visvesvara, 2004). Especies de *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris* se relacionan porque pueden causar encefalitis granulomatosa amebiana e infecciones en piel. Con respecto a *Naegleria*, aunque existen alrededor de 40 especies reportadas en la literatura, solo *N. fowleri* se ha asociado con un cuadro de meningoencefalitis amebiana primaria, principalmente en niños y adultos jóvenes, la cual se caracteriza por ser una infección fulminante. Además de estos tres géneros de amebas de vida libre, se ha reportado un único caso de encefalitis amebiana por *Sappinia diploidea*, donde el paciente sobrevivió a la infección (Schuster & Visvesvara, 2004). Estos géneros de amebas pueden ser aislados de diversas fuentes ambientales, como fuentes de agua y suelos.

Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* son microorganismos que habitan diversos ambientes. El género fue descrito por primera vez en 1930 por Aldo Castellani, como organismos saprófitos contaminantes de cultivos

(Schuster & Visvesvara, 2004). En 1958, Clyde Culbertson y colaboradores demostraron su potencial patogénico en animales, evidenciando un cuadro de encefalitis en ratones. Actualmente, se ha comprobado que las especies *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. astroonyxis* y *A. divionensis* son capaces de producir enfermedad (Schuster & Visvesvara, 2004; Khan, 2006).

Actualmente se prefiere la identificación molecular a nivel de genotipos y no de especies de *Acanthamoeba*, por medio de un análisis de secuencias de la subunidad 18S del ARN ribosomal; con esta técnica se pueden separar en 20 genotipos, que se nombran desde T1 hasta T20 (Corsaro et al, 2015). Los casos clínicos se relacionan en mayor grado con el genotipo T4 (Siddiqui & Khan, 2012; Trabelsi et al, 2012). Otros genotipos aislados con menor frecuencia son el T1, T3, T5, T10, T11, T15, T17 y T18 (Lorenzo-Morales et al, 2013; Qvarnstrom et al, 2013; Reyes-Batlle et al, 2014).

Al ser posible el desarrollo de estos microorganismos en diferentes ambientes, es posible aislarlos de fuentes de agua pública, piscinas, agua embotellada, lagunas, botellas de agua destilada, lagos de agua salada, ductos de ventilación, unidades de aire acondicionado, compost, suelos, vegetales, lentes de contacto, unidades dentales, ambientes hospitalarios, entre otros. Esto indica que esta ameba se encuentra ampliamente distribuida en todos los ecosistemas, y se estima que más del 80% de la población mundial posea anticuerpos contra ella (Schuster & Visvesvara, 2004; Trabelsi et al, 2012).

Otra particularidad que recientemente se atribuye a estos protozoarios es la capacidad de actuar como transportadores biológicos, principalmente virus y

bacterias (Siddiqui & Khan, 2012). Se ha demostrado que la ameba puede albergar echo-virus, mimivirus, coxsackie virus, adenovirus y pandoravirus (Philippe et al, 2013), además de bacterias como *Legionella* spp., *Vibrio cholerae*, *Burkholderia cepacia*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium*, entre otros (Trabelsi et al, 2012). Se cree que las amebas proveen protección contra las condiciones adversas que enfrentan estos organismos cuando infectan a diferentes animales o al ser humano, convirtiéndose, por tanto, en posibles transportadores de estas bacterias, que eventualmente podrían provocar una presentación clínica (Trabelsi et al, 2012).

Además de la importancia a nivel clínico las amebas de vida libre, como *Acanthamoeba*, son un importante factor en el equilibrio ecológico debido a su papel en el consumo bacteriano, siendo responsables del 60% de la reducción bacteriana en el ambiente. Estas amebas poseen un potencial de descomposición importante, ayudando a que los nutrientes se encuentren disponibles para otros organismos(Siddiqui & Khan, 2012).

Características biológicas de *Acanthamoeba*

Durante su ciclo de vida, las amebas del género *Acanthamoeba* presentan dos formas evolutivas (Figura 1): la vegetativa o trofozoíto, que mide aproximadamente de 8 μm a 40 μm , y la forma quística, que mide aproximadamente de 8 μm a 29 μm (Siddiqui & Khan, 2012).

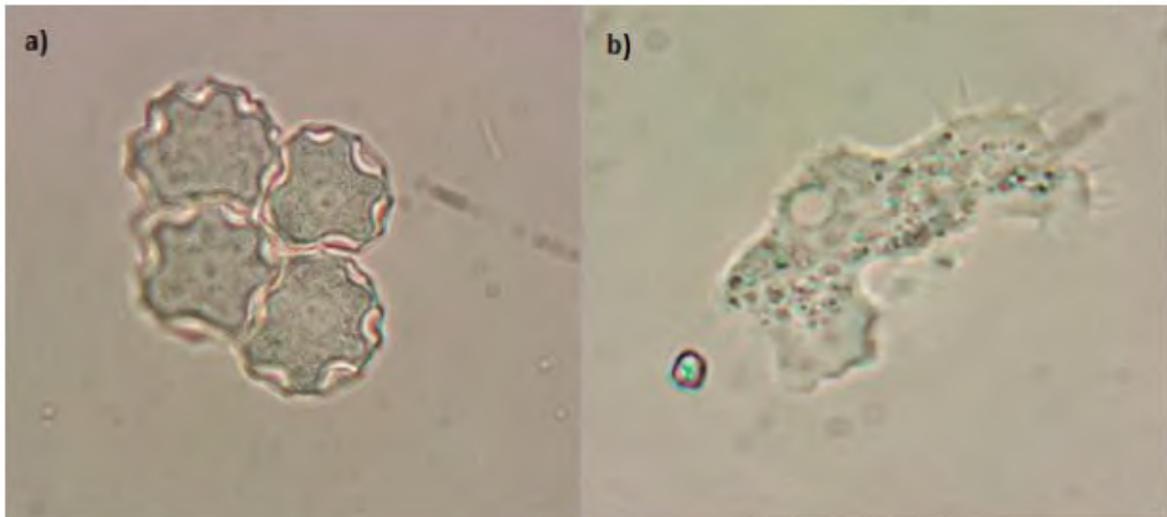


Figura 1. Formas evolutivas de *Acanthamoeba* sp. a) quistes; b) trofozoíto. Fotografías tomadas por Daniel Vargas Ramirez.

El trofozoíto de *Acanthamoeba* presenta múltiples proyecciones pseudopodiales retráctiles irregulares, que sirven para movimiento y como método de captura de su alimento (bacterias, por ejemplo), además de presentar un único núcleo prominente y una o más vacuolas contráctiles, con la función de expulsar agua para regulación osmótica; su membrana plasmática consiste en 33% de proteínas, 25% fosfolípidos, 13% esteroides, y 29% lipofosfoglicanos (Siddiqui & Khan, 2012; Trabelsi et al, 2012). Esta forma se reproduce por fisión binaria y el tiempo de generación varía entre 8 y 24 horas, dependiendo de la especie o genotipo (Khan, 2006).

Por otra parte, el quiste posee una doble pared celular que contiene celulosa y se caracteriza por ser muy resistente a desinfectantes, a la variación de temperatura y a la desecación (Khan, 2006). En un estudio realizado para comparar la resistencia del quiste de *Acanthamoeba* con otros géneros de amebas

de vida libre, se concluyó que el quiste de *Acanthamoeba* es el más resistente a diferentes desinfectantes, siendo susceptible solamente al dióxido de cloro (Dupuy et al, 2014). Se ha reportado que este género puede soportar amplio rango de osmolaridad, temperatura, salinidad y cambios de pH, permitiéndoles reproducirse en agua destilada, tejidos y fluidos corporales de mamíferos, entre otros (Trabelsi et al, 2012). Incluso, se ha observado la capacidad de sobrevivencia de los quistes por más de 20 años *in vitro*, y en solución oftalmológica por un período de 14 días (Schuster & Visvesvara, 2004).

En la actualidad se reportan alrededor de 20 especies de *Acanthamoeba* y la observación de la morfología del quiste fue durante mucho tiempo la técnica más usada para la clasificación de especies (Figura 2). Sin embargo, el empleo único de las características morfológicas no es adecuado, debido a la semejanza entre algunas especies y a la variación morfológica dependiendo incluso del medio de cultivo que se utilice. Es por esta razón que hoy se emplean técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación para su identificación y clasificación (Schuster & Visvesvara, 2004).



Figura 2. Clasificación de los quistes de *Acanthamoeba* con base en características morfológicas. El grupo I consiste de especies caracterizadas por grandes quistes y trofozoítos con endocistos en forma estrellada y ectocistos que pueden ser lisos o rugosos. El grupo II contiene amebas donde el ectocisto es rugoso y grueso, mientras que el endocisto puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado. En el último grupo el ectocisto es delgado y ondulado mientras que el endocisto es generalmente redondeado (Tomado de Castrillón & Orozco, 2013).

Importancia clínica de *Acanthamoeba*

El género *Acanthamoeba* es capaz de producir dos cuadros clínicos principales: la encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) y la queratitis amebiana (QA).

Encefalitis granulomatosa amebiana

La encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) provocada por este género es una afección que se presenta en tejido cerebral, siendo los lóbulos parietales y temporales los más afectados con necrosis hemorrágica y edema. Las observaciones microscópicas han revelado quistes de la ameba

predominantemente en el espacio perivascular en el parénquima, lo que indica que el sistema capilar está involucrado en la entrada de la ameba al cerebro. Está descrito que la ruta de entrada de la ameba incluye el tracto respiratorio o vía hematológica por alguna lesión cutánea (Khan, 2008). La vía nasal lleva a la invasión de los vasos alveolares, seguido de la diseminación hematológica para atravesar la barrera hematoencefálica, logrando entrar al sistema nervioso central (Khan, 2008).

El mecanismo por el cual *Acanthamoeba* atraviesa la barrera hematoencefálica es complejo y no se conoce totalmente. Se ha descrito la necesidad de factores presentes en el parásito como adhesinas, proteasas y fosfolipasas, que producen un proceso inflamatorio, lo cual lleva a la necrosis del epitelio de la misma, dándose la entrada al sistema nervioso central (Khan, 2008). El principal grupo de riesgo para la EGA son personas inmunosupresas y adultos mayores (Khan, 2006).

La EGA es una infección insidiosa, donde los síntomas y signos clínicos son variados e incluyen cefalea, fiebre, cambios en el comportamiento, hemiparesia, letargia, afasia, ataxia, náuseas, vómito y en estados más avanzados, convulsiones, coma, y muerte (Trabelsi et al, 2012). Tradicionalmente, el diagnóstico se realizaba por medio de la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes para detectar anticuerpos en el suero, además de la neuroimagen, biopsia del tejido afectado y el cultivo de la muestra para aislar el microorganismo. Con el avance del diagnóstico molecular se han desarrollado técnicas de PCR que permiten incluso diferenciar de otras encefalitis amebianas producidas por amebas como *Balamuthia mandrillaris* o *Naegleria fowleri*, además de permitir su detección

temprana (Schuster & Visvesvara, 2004). La familiaridad con el cuadro clínico es de gran importancia para un diagnóstico oportuno. Además del análisis de pruebas de laboratorio como el estudio del líquido cefalorraquídeo tanto para determinar aumento de la concentración de proteínas y disminución de la concentración de glucosa como para buscar formas ameboides (Abrahams-Sandí & Retana-Moreira, 2014).

Para su tratamiento se emplean agentes terapéuticos en combinación como pentamidina, isetionato de pentamidina, ketoconazol, sulfadiazina, fluconazol, amfotericina B, azitromicina, itraconazol o ripamficina, las cuales llevan raramente a un tratamiento exitoso (Schuster & Visvesvara, 2004); únicamente un tratamiento llamado miltefosina ha mostrado ser efectivo contra la acantamebiasis diseminada de un caso clínico (Trabelsi et al, 2012).

Además de la generación de manifestaciones clínicas en seres humanos, se ha reportado la EGA por *Acanthamoeba* en animales; por ejemplo, se han publicado cuatros casos en caballos. Lo anterior demuestra que el diagnóstico de este género a nivel veterinario también debe ser considerado (Kinde et al, 2007).

Queratitis amebiana

La queratitis amebiana (QA) se presenta cuando las formas tróficas se adhieren al epitelio de la córnea y ahí secretan una variedad de proteasas, las cuales favorecen la invasión, resultando en la citólisis que lleva a la destrucción del estroma y el epitelio corneal, inflamación con migración celular y perforación (Weissman & Mondino, 2002). Lo anterior tiene la contraposición del mecanismo

de defensa propio del ojo, el cual cuenta con el pestañeo y el flujo de lágrimas para remover microorganismos. Las lágrimas son pobres en nutrientes y contienen sustancias antibacterianas como lisozima, betalina, lactoferrina, y mucus, además de IgA secretoria y factores del complemento que puede atrapar microorganismos y suprimir la adhesión al epitelio, promoviendo también la lisis y fagocitosis (Weissman & Mondino, 2002).

Esta infección de la córnea se desarrolla en pacientes inmunocompetentes y es el genotipo T4, el cual se ha relacionado con el 90% de los casos (Siddiqui & Khan, 2012). Sin embargo, en 2010, en Tailandia se reportó por primera vez dos casos de queratitis causadas por los genotipos T17 y T10 (Nuprasert et al, 2010).

Entre los principales factores de riesgo de esta infección están el uso de lentes de contacto por un periodo extenso de tiempo de manera inadecuada; el trauma corneal, nadar con los lentes de contacto puestos, el aseo incorrecto de los lentes de contacto son ejemplos de factores de riesgo (Weissman & Mondino, 2002). Típicamente la infección es unilateral, dependiendo de la virulencia de la ameba y del estado fisiológico de la córnea. Entre las manifestaciones clínicas que se pueden presentar están: ojos rojos, epifora, hiperemia conjuntival, dolor y fotofobia. Al inicio de la infección se presentan lesiones epiteliales pseudodendríticas que se parecen a queratitis por herpes simplex (Trabelsi et al, 2012).

La incidencia de la QA ha aumentado desde los años 70 debido al número de usuarios de lentes de contacto; en 1974 se reportó el primer caso en el Reino Unido, en un paciente que usaba lentes de contacto blandos. Por lo que un factor necesario para enfrentar la QA es la necesidad de un control más estricto en las

soluciones de mantenimiento de los mismos, realizadas por los fabricantes, ya que la mayoría de infecciones se da por un uso inadecuado del lente de contacto y lo permisible que son los antimicrobianos utilizados en las soluciones de mantenimiento (Lorenzo-Morales et al, 2013). En años recientes, los casos por QA han ido aumentando en Estados Unidos, el Reino Unido y Francia (Trabelsi et al, 2012).

Con respecto al diagnóstico de QA, éste se realiza principalmente por medio del cultivo del raspado corneal cuando hay sospecha clínica, junto con la observación al microscopio en busca de los trofozoítos o los quistes; sin embargo, la técnica más recomendada es la PCR tiempo real junto con la biopsia y la observación microscópica, ya que llega a una sensibilidad del 89,3% (Clarke et al, 2012). Es importante mencionar que alrededor del 8% de usuarios de lentes de contacto presentan cultivo positivo de los lentes por *Acanthamoeba* sin que se presente invasión a la córnea o sintomatología alguna. Por lo tanto, el aislamiento de la ameba en los lentes de contacto no es confirmatorio de la enfermedad, ya que el diagnóstico se confirma con biopsia de la córnea y el aislamiento del patógeno en la muestra (Trabelsi et al, 2012).

Determinación del potencial patogénico en *Acanthamoeba*

La ameba depende de diversos factores de virulencia que funcionan de manera integrada para producir el cuadro clínico, factores que pueden ser tanto contacto dependientes como contacto independientes (Siddiqui & Khan, 2012).

El potencial patogénico del género *Acanthamoeba* se asocia con varias características que se consideran necesarias en el microorganismo para producir un cuadro clínico (Khan et al, 2002). Por ejemplo, se reporta que la capacidad de crecimiento a temperaturas mayores de 35 °C es necesaria para distinguir los aislamientos potencialmente patogénicos de los que no lo son; esto se ha definido como termotolerancia (Khan et al, 2002). A nivel de laboratorio se han desarrollado diferentes pruebas para clasificar los aislamientos del ambiente, entre ellos la incubación de la ameba a 37 °C y a 40°C y así observar si logra reproducirse en las placas de Petri con medio de cultivo sólido (Khan et al, 2002).

También se describe el uso de pruebas de osmotolerancia, empleándose manitol como soluto concentrado y determinando la capacidad de reproducción del aislamiento bajo este estrés. Simulando el estrés osmótico al que es sometida la ameba al invadir el epitelio corneal (Khan et al, 2002).

La determinación de la presencia de proteasas extracelulares secretadas por la ameba como proteasas de serina, proteasas de cisteína y metaloproteasas relacionadas con la invasión de tejidos son también empleadas para seleccionar los aislamientos con mayor potencial de producir un cuadro clínico, aunque es necesario mencionar que la producción de proteasas no es una característica definitiva para clasificar el aislamiento como potencialmente patogénico (Takaoka-Sugihara et al, 2012).

La observación del efecto citopático de las amebas en cultivo celular y la determinación de enfermedad en ratones BALB/c de tres meses de edad cuando se inoculan intranasalmente con amebas; también han sido reportadas en la

literatura para la evaluación del potencial patogénico de la ameba (Culbertson et al, 1958; Khan et al, 2000; Gonzáles et al, 2013).

El genotipo T4 es el más asociado con la producción de cuadros de encefalitis granulomatosa amebiana (EGA), queratitis amebiana (QA) e infecciones cutáneas (Maciver et al, 2013). No se conoce con exactitud por qué los aislamientos del genotipo T4 son más abundantes en las infecciones en humanos, pero se sospecha que es debido a los factores de virulencia intrínsecos, además de la susceptibilidad disminuida a los antimicrobianos (Siddiqui & Khan, 2012). En 2009, Edagawa y colaboradores encontraron en Osaka, Japón, que a pesar de que el genotipo T3 es el aislado con mayor frecuencia en fuentes de agua, la mayoría de casos clínicos de QA ocurridos en la zona eran debidos al genotipo T4; un patrón similar fue encontrado en Hong Kong (Maciver et al, 2013).

Amebas de vida libre en Costa Rica

En Costa Rica existen escasos trabajos sobre el tema de las amebas de vida libre con potencial patogénico. En el año 1979, Chinchilla y colaboradores realizaron un estudio con muestras biológicas de fosas nasales de estudiantes universitarios donde aislaron 8 muestras de *Acanthamoeba* potencialmente patogénicas. En 1981, Chinchilla y colaboradores lograron aislar *Acanthamoeba* de fosas nasales y de líquido cefalorraquídeo de niños del Hospital San Juan de Dios. En 1994, Echandi y colaboradores realizaron 32 aislamientos de amebas potencialmente patógenas de muestras de heces de 500 pacientes de consulta externa de la Clínica Marcial Fallas.

Los últimos reportes sobre amebas de vida libre se realizaron en el año 2014, donde Retana y colaboradores demostraron por primera vez la presencia de *Balamuthia mandrillaris* en una muestra de polvo procedente de una unidad combinada de emergencia en Costa Rica y donde Abrahams-Sandí y colaboradores (2015) aislaron *Naegleria fowleri* a partir de una fuente de agua termal, la cual se sospecha pudo estar relacionada con la muerte de un niño norteamericano diagnosticado con meningoencefalitis amebiana primaria. Estos dos reportes dieron inicio al aislamiento de amebas de vida libre a partir de muestras ambientales en Costa Rica.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el potencial patogénico de amebas del género *Acanthamoeba* aisladas de unidades dentales, unidades de aire acondicionado y unidades combinadas de emergencia en la Universidad de Costa Rica.

Objetivos específicos

- Cultivar en medio axénico los aislamientos de *Acanthamoeba* obtenidos de los diferentes equipos de la Universidad de Costa Rica.
- Evaluar potencial patogénico analizando la termotolerancia, osmotolerancia, y determinación de la producción de proteasas de los aislamientos de *Acanthamoeba* obtenidos de los diferentes equipos de la Universidad de Costa Rica.
- Evaluar el potencial citotóxico de los aislamientos de *Acanthamoeba* en cultivo celular, mediante la cuantificación de los niveles de la enzima deshidrogenasa láctica y observación por microscopía de luz.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Unidades dentales (Anexo 1)

Se trabajó con trece aislamientos de unidades dentales del área de cirugía reconstructiva de la Facultad de Odontología, identificadas desde UD1 hasta UD13, como se muestra en la Tabla 1.

Aires acondicionados (Anexo 1)

Se trabajó con seis aislamientos de aires acondicionados de la Facultad de Microbiología identificados desde AA1 hasta AA6 (Tabla 1).

Unidades combinadas de emergencia (Anexo 1)

Se incluyeron dos aislamientos obtenidos de unidades combinadas de emergencia de la Facultad de Química, identificados como T7 y Sed7 (Tabla 1), los cuales formaron parte de un plan piloto realizado al inicio del proyecto (Retana-Moreira et al, 2014)

Todos los aislamientos provienen de muestreos realizados en el transcurso del desarrollo del proyecto de investigación código 803B4050, inscrito en Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, y ejecutado en la sección de Protozoología Médica. La identificación del género *Acanthamoeba* se realizó gracias a las características morfológicas y mediante una PCR que

amplifica gen ARN ribosomal 18S del género *Acanthamoeba* (específicamente la región DF3), para la clasificación de los distintos genotipos mediante secuenciación.

Los productos de PCR de los aislamientos de *Acanthamoeba* se secuenciaron en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC) de la Universidad de La Laguna (ULL), en Tenerife, España (Tabla 1). Además este instituto proporcionó como controles para las pruebas a realizadas; *Acanthamoeba castellanii* Neff American Type Culture Collection (ATCC) 30010 (un aislamiento ambiental con potencial patogénico) y *Acanthamoeba* T3 cepa CLC-16 (un aislamiento clínico) (Martín-Navarro et al, 2010). También se utilizó un aislamiento ambiental axenificado diferente al genotipo T4 (*Acanth*), obtenido de una fuente de agua de Nicaragua e identificado como genotipo T5.

Tabla 1. Detalle del aislamiento, identificación y genotipo dado por la secuenciación del gen ARN ribosomal 18S.

Identificación	Aislamiento	Genotipo
UD1	Unidad dental 1 de scaler	T4
UD2	Unidad dental 3 de jeringa de triple función (B)	T4
UD3	Unidad dental 3 de jeringa de triple función (A)	T4
UD4	Unidad dental 4 de scaler (B)	T4
UD5	Unidad dental 5 de scaler (A)	T4
UD6	Unidad dental 5 de reservorio (1B)	T4
UD7	Unidad dental 6 de jeringa de triple función	T4
UD8	Unidad dental 13 de scaler (A)	T4
UD9	Unidad dental 14 de scaler (B)	T4
UD10	Unidad dental 15 de scaler (B)	T4
UD11	Unidad dental 17 de jeringa de triple función (A)	T4
UD12	Unidad dental 17 de jeringa de triple función (B)	T4
UD13	Unidad dental 17 de jeringa de triple función (2B)	T4
AA1	Aire acondicionado de servicio de laboratorio (A)	T3
AA2	Aire acondicionado de servicio de laboratorio (B)	T3
AA3	Aire acondicionado de sala de computo (A)	T3
AA4	Aire acondicionado de oficina de sala de computo (B)	T3
AA5	Aire acondicionado de laboratorio de Anaerobios (B)	T4
AA6	Aire acondicionado de servicio de laboratorio Manuel (B)	T13
T7	Unidad combinada de emergencia de polvo tomado con torunda	T4
Sed7	Unidad combinada de emergencia de sedimento del lavado de ojos	T4
Acanth	Fuente de agua de Nicaragua	T5
Neff	<i>Acanthamoeba castellanii</i> Neff ATCC 30010 (*)	T4
CLC-16	<i>Acanthamoeba</i> T3 cepa CLC-16 (*)	T3

(*) Controles de amebas proporcionadas por el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC) de la Universidad de La Laguna (ULL), en Tenerife, España.

Cultivo axénico de *Acanthamoeba*

A partir de las amebas aisladas de unidades dentales, unidades de aire acondicionado y unidades combinadas de emergencia se cultivaron axénicamente los aislamientos confirmados de *Acanthamoeba* mediante la técnica descrita por Page (1998). Para esto, se realizaron repiques de los clones de amebas aislados de las muestras ambientales en agar no nutritivo (ANN) (Riedel-de Haën Chemicals, Suiza), se incubaron durante 48 h a 30 °C y posteriormente se transfirieron a placas de 24 hoyos (Costar, Corning CellBind, USA) con medio axénico de crecimiento masivo con peptona 2% (m/V), extracto de levadura 0,1% (m/V) y glucosa 1,8% (m/V) (PYG, por sus siglas en inglés) (Oxoid LTD, England), suplementado con gentamicina 10 mg/mL, penicilina 100 unidades/mL y estreptomycinina 100 mg/mL (Sigma-Aldrich, USA). Las amebas que mostraron crecimiento se cultivaron en botellas de cultivo celular de 25 cm² (Corning Incorporated, New York, USA) con aproximadamente 5 mL de medio PYG.

Preservación de los cultivos axénicos

Se realizó siguiendo las recomendaciones de la ATCC (www.atcc.org) para *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC® 30461™). Los aislamientos axénicos obtenidos se cultivaron por aproximadamente 2 días con medio de crecimiento masivo con peptona 2% (m/V), extracto de levadura 0,1% (m/V) y glucosa 1,8% (m/V) (PYG, por sus siglas en inglés) (Oxoid LTD, England). Con este medio se obtuvo una concentración de aproximadamente 10⁶ amebas/mL cuantificado en

cámara de Neubauer. Posteriormente, se tomó 3 mL del medio con amebas y se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, (Sigma-Aldrich, USA). Alícuotas de aproximadamente 1 mL se colocaron en viales de criopreservación (Evergreen Scientific, USA), los cuales se congelaron en cámara de congelación a -80 °C con isopropil-2-propanol (Sigma-Aldrich, USA) durante 24 horas. Finalmente se pasaron a un tanque con nitrógeno líquido.

Evaluación del potencial patogénico mediante pruebas de termotolerancia, osmotolerancia y determinación de la producción de proteasas

Pruebas de termotolerancia

Se utilizó el protocolo descrito por Khan y colaboradores (2002). En placas de agar no nutritivo (ANN) (Riedel-de Haën Chemicals, Suiza) suplementadas con *Escherichia coli*, se colocó un inóculo conocido de aproximadamente 1000 amebas determinado en cámara de Neubauer. Se trabajó con dos grupos de placas: un grupo se incubó durante 48 h a 37 °C y el otro grupo se incubó durante el mismo tiempo a 40 °C. Transcurrido este tiempo, se observó la presencia de trofozoítos y multiplicación de los mismos, se consideró positivo si las amebas poseían una vacuola pulsátil activa y si se encontraban distribuidas fuera del punto de aplicación en toda la placa de ANN. El ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento.

Pruebas de osmotolerancia

Se empleó el protocolo descrito por Khan y colaboradores (2002). En placas de ANN suplementadas con *E. coli* más manitol (J.T. Baker Co., USA), en concentraciones de 0,5 M (grupo 1) y 1,0 M (grupo 2), se colocó un inóculo conocido de aproximadamente 1000 amebas determinado en cámara de Neubauer. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 48 h y transcurrido este tiempo se observó la presencia de trofozoítos y multiplicación de los mismos. Se consideró positivo, si las amebas poseían una vacuola pulsátil activa y si se encontraban distribuidas fuera del punto de aplicación en toda la placa de ANN. El ensayo también se realizó por triplicado para cada aislamiento.

Determinación de la producción de proteasas y caracterización mediante zimografía

- Obtención de proteasas

La determinación de proteasas extracelulares de los aislamientos axénicos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Iqbal y colaboradores (2014), con algunas modificaciones. Las amebas se cultivaron en medio PYG (aproximadamente 10^6 amebas/mL) en botellas de cultivo celular de 25 cm², las cuales se incubaron a 30 °C. Unos días después, se retiró el medio PYG de las botellas, se agregó 5 mL de medio PYG nuevo y se incubó por 24 horas a 30 °C,

para asegurar un predominio de trofozoítos en la botella. Concluida la incubación, se retiró el medio PYG y se agregó 5 mL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA), para posteriormente incubar las mismas durante 24 h a 30 °C. Transcurrido este tiempo, se realizó la extracción cuidadosa del sobrenadante, el cual se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se filtró a través de membrana de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, USA), esto con el fin de obtener las proteasas secretadas por los trofozoítos. Los sobrenadantes se almacenaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL (Eppendorf, USA) a -80°C hasta su uso.

- Zimografía

Para la visualización de las proteasas se llevó a cabo una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% (Sigma-Aldrich, USA) con una concentración de gelatina de 1 mg/mL, de acuerdo con las indicaciones descritas en el protocolo de Herron y colaboradores (1986). Se cargaron 8 µL de las muestras en cada canal del gel, además de un marcador de alto peso molecular de escalera de espectro multicolor (300 kDa a 40 kDa) (Thermo Scientific, USA) y se realizó una corrida de aproximadamente 45 min a 180 V, en una minicámara de electroforesis Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad laboratorios Inc, USA). Al finalizar la corrida, los geles se incubaron en una disolución de Tritón X-100 al 1% (ICN Biomedicals Inc., USA) durante una hora, para posteriormente incubarse toda la noche a 37 °C en una solución de buffer sustrato (CaCl₂ 2 mM y Tris-HCl 50 mM) (Sigma-Aldrich, USA) y así potenciar la expresión de las proteasas. Tras la incubación, los geles se tiñeron con azul Coomassie R-250 (Bio-Rad laboratorios, USA) al 0,2% (p/v) en solución fijadora (metanol 40% y ácido acético al 10% v/v).

La actividad proteasa se determinó siguiendo el método descrito por Hadas y Mazur (1993), realizando una observación de la degradación de gelatina por acción del sobrenadante de los cultivos de *Acanthamoeba*.

- Determinación de los tipos de proteasas secretadas

Para la identificación de las proteasas de los sobrenadantes de cada aislamiento se emplearon los inhibidores específicos fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF por sus siglas en inglés) (inhibidor de proteasas de serina) y 1,10-fenantrolina (inhibidor de metaloproteasas) (Sigma-Aldrich, USA). El procedimiento incluyó la incubación de los sobrenadantes con cada inhibidor en concentraciones de 1 mM durante 30 minutos a 37 °C. Puesto que la inhibición con 1,10 fenantrolina es reversible, fue necesario además agregar este inhibidor al buffer de sustrato en el que se incubaron los geles durante la noche.

Evaluación del efecto citotóxico en cultivo celular

Para cumplir con esta parte del proyecto se utilizó la línea celular Madin-Darby de riñón canino (MDCK, por sus siglas en inglés) NBL2 ATCC CCL-34™, facilitadas por la sección de Virología Médica de la Universidad de Costa Rica. Estas células se cultivaron en botellas de cultivo celular de 75 cm² con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, USA), estreptomina 100 mg/mL y penicilina 100 unidades/mL (Sigma-Aldrich, USA); las mismas se incubaron a 37 °C, con 5% CO₂.

Se realizó el estudio en los aislamientos axénicos siguiendo el protocolo descrito por Iqbal y colaboradores (2014), con algunas modificaciones. Brevemente, las células MDCK fueron crecidas en botellas de 75 cm² (Corning Incorporated, USA) con medio RPMI-1640, hasta llegar a confluencia (aproximadamente durante 3 días). Posteriormente, se cultivaron 10⁵ células/mL en cada hoyo de placas de 24 hoyos (Costar, Corning CellBind, USA), las cuales se mantuvieron con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos, de nuevo hasta alcanzar confluencia (aproximadamente 24 horas). Transcurrido ese tiempo, se agregó a los hoyos correspondientes un inóculo de 5x10⁵ trofozoítos en medio RPMI-1640 con antibióticos y libre de suero fetal bovino y se incubó la placa a 37 °C durante 24 horas, con 5% de CO₂.

Se emplearon dos técnicas diferentes para evaluar la producción de efecto citopático en cultivo celular: la determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL) y la observación al microscopio de luz y tinción con cristal violeta.

Determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL)

El efecto citopático se estimó realizando la determinación de la actividad de esta enzima en el sobrenadante de cada muestra, siguiendo el protocolo del kit comercial LDH BR (Linear Chemicals, Barcelona, España), con un espectrofotómetro Shimadzu modelo TCC-240A (Kioto, Japón).

Como control del 100% de actividad de la enzima (100% actv) se utilizó una monocapa celular en confluencia en la placa de 24 hoyos, la cual se trató con Tritón X-100 al 1% y como control basal de producción de DHL se utilizaron

células MDCK incubadas sin amebas. Como controles positivos en el ensayo se utilizaron las cepas *A. castellanii* Neff (ATCC) 30010 y *Acanthamoeba* T3 cepa CLC-16 (Martín-Navarro et al, 2010). Además, se realizaron mediciones de la actividad de DHL para un inóculo de 5×10^5 determinado en cámara de Neubauer de amebas Neff y CLC-16 en medio RPMI-1640 (sin células), el cual se incubó y trató igual que los demás aislamientos durante todo el experimento, con el fin de determinar había alguna liberación espontánea de DHL por parte de los trofozoítos.

Como un primer ensayo, se realizaron mediciones de la actividad de la DHL en los controles positivos Neff y CLC-16 a diferentes tiempos (4, 6 y 24 horas), con el fin de encontrar el más adecuado para la determinación de la actividad enzimática utilizando esta línea celular. Cuando se determinó este tiempo, se determinó la actividad de la DHL de cada aislamiento y se obtuvieron los porcentajes de citotoxicidad, mediante la siguiente fórmula (Iqbal et al, 2014):

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad (\%)} = \frac{(\text{valor de la muestra} - \text{valor del control de células})}{(\text{valor del 100\% actv} - \text{valor del control de células})}$$

El experimento se realizó por triplicado.

Observación al microscopio de luz y tinción con cristal violeta

Para la observación de daño celular se empleó el procedimiento descrito por Khan y colaboradores (2000), con algunas modificaciones. Brevemente, los diferentes hoyos de la placa fueron observados a las 24 horas con un microscopio

invertido modelo CK30-F100 de Olympus Optical (Tokio, Japón), para así anotar los cambios en la monocapa celular o en las amebas y ver si los aislamientos lograban un efecto citopático observable a 200X. Se comprobó que los controles positivos (cepa *A. castellanii* Neff (ATCC) 30010 y *Acanthamoeba* T3 cepa CLC-16) produjeran efecto citopático en el cultivo celular y que el control de la monocapa celular sin inóculo de amebas se encontrara en buen estado.

Posteriormente, a cada hoyo se le agregó 100 microlitros de formalina al 5% (Sigma-Aldrich, USA) y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se descartó cuidadosamente el sobrenadante, para finalmente agregar 300 microlitos de cristal violeta al 1% (J.T. Baker Chemical Co., USA) e incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se descartó el colorante y se dejó secar la placa al aire por 60 minutos. Las placas fueron vistas en un transiluminador y se realizan anotaciones de lo observado, tanto en las monocapas celulares como en las amebas.

Análisis estadístico de los datos

Para la evaluación del efecto citopático en cultivo celular mediante la determinación de la actividad de la DHL, se calculó la media y desviación estándar de los valores obtenidos para cada aislamiento.

Se realizó una comparación de los niveles de DHL obtenidos para cada aislamiento con respecto al control de células utilizando un ANOVA de un factor, previa comprobación de la normalidad y homocedasticidad de los datos. Como se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se realizaron

comparaciones múltiples post hoc utilizando la prueba de Tukey, para evidenciar los aislamientos con las medias estadísticamente diferentes. Resultados con un valor $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Cultivo axénico de *Acanthamoeba*

Se logró axenificar 8 de los 21 aislamientos primarios de *Acanthamoeba*: UD3, UD4, UD5, UD6, UD8, UD12, T7 y Sed7; esto equivale a un 38,1% del total de aislamientos. De las unidades dentales se logró el cultivo axénico de 6 de los 13 aislamientos (46%), mientras que de las unidades combinadas de emergencia se axenificaron los dos aislamientos con los que se contaba (100%); de los aires acondicionados ninguno se logró axenificar. El aislamiento de Nicaragua (*Acanth*) ya se tenía en medio axénico desde el inicio del estudio.

Resultados de pruebas de termotolerancia y osmotolerancia

Los resultados de las pruebas para evaluar la multiplicación de los aislamientos a diferentes temperaturas y concentraciones de manitol se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de pruebas de termotolerancia (capacidad de multiplicación a 37 °C y a 40 °C) y osmotolerancia (capacidad de multiplicación a concentraciones de 0,5 M y 1,0 M de manitol), de los aislamientos primarios de *Acanthamoeba* y los controles de amebas.

Aislamiento	Genotipo	37°C	40°C	0,5 M manitol	1,0 M manitol
UD1	T4	+	+	+	+
UD2	T4	+	+	+	+
UD3	T4	+	+	+	+
UD4	T4	+	+	+	+
UD5	T4	+	+	+	+
UD6	T4	+	+	+	+
UD7	T4	+	+	+	+
UD8	T4	+	+	+	+
UD9	T4	+	-	+	-
UD10	T4	+	-	+	+
UD11	T4	+	+	+	+
UD12	T4	+	+	+	+
UD13	T4	+	+	+	+
AA1	T3	+	+	+	+
AA2	T3	+	+	+	+
AA3	T3	+	+	+	+
AA4	T3	+	+	+	+
AA5	T4	+	+	+	+
AA6	T13	+	-	+	-
T7	T4	+	+	+	+
Sed7	T4	+	+	+	+
Acanth	T5	+	-	+	-
Neff (*)	T4	+	+	+	+
CLC-16 (*)	T3	+	+	+	+

(*) Controles de amebas proporcionadas por el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC) de la Universidad de La Laguna (ULL), en Tenerife, España.

Determinación de proteasas y caracterización mediante zimografía

Las Figuras 3 y 4 muestra el perfil de proteasas extracelulares obtenido por zimografía para los aislamientos axénicos. Se muestra en el mismo gel, en los carriles con la letra b, el efecto inhibitorio de PMSF 1 mM.

Las Figuras 5 y 6 muestran que la 1,10 fenantrolina no ejerció un efecto inhibitorio sobre ninguna de las proteasas extracelulares de los aislamientos axénicos. Se muestran los geles de sólo cuatro aislamientos y de los controles a manera de ejemplo.

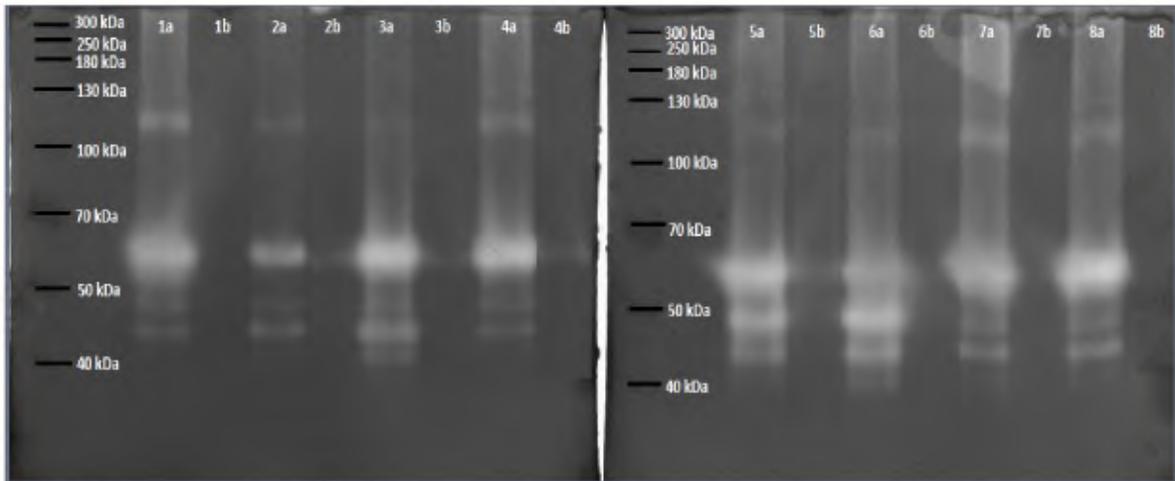


Figura 3. Zimografía de proteasas extracelulares de los aislamientos axénicos de *Acanthamoeba*; 1) UD12, 2) UD5, 3) UD3, 4) UD8, 5) T7, 6) Sed7, 7) UD6, 8) UD4. a) Carriles con extractos sin tratar con el inhibidor PMSF 1 mM, b) carriles con extractos tratados con el inhibidor PMSF 1 mM.

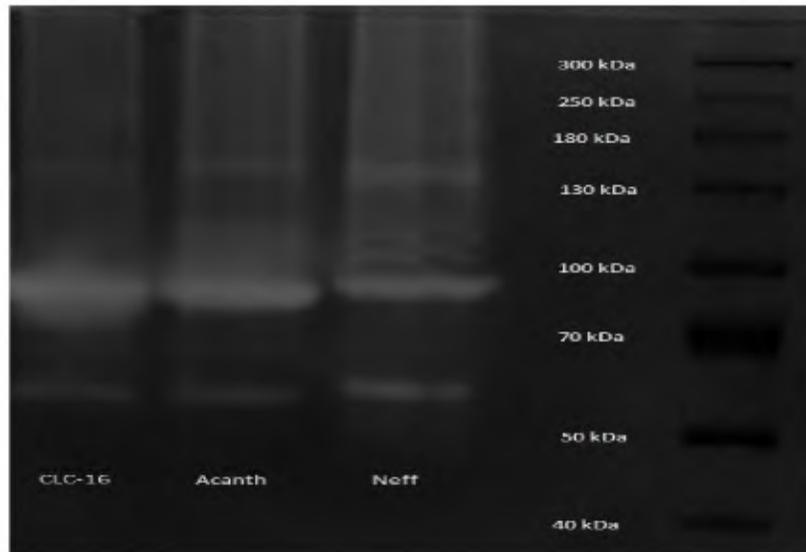


Figura 4. Zimografía de proteasas extracelulares de aislamientos de *Acanthamoeba* utilizados como controles: CLC 16 y Neff, además de Acanth, que corresponde al aislamiento de la fuente de agua de Nicaragua.

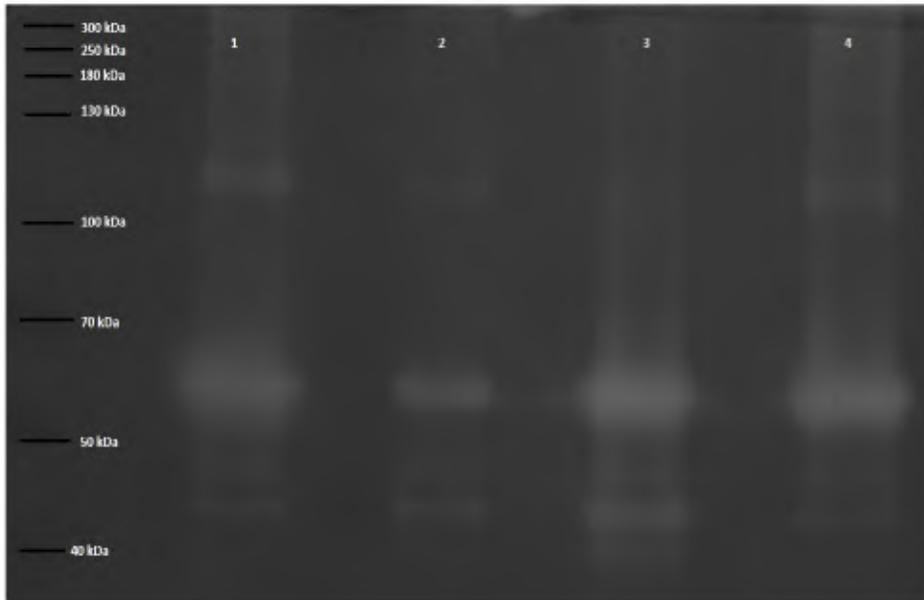


Figura 5. Zimografía de proteasas extracelulares de aislamientos de *Acanthamoeba*. 1) UD12, 2) UD5, 3) UD3, 4) UD8. Inhibición con 1,10 fenantrolina 1 mM, incubada con el inhibidor en el buffer sustrato.

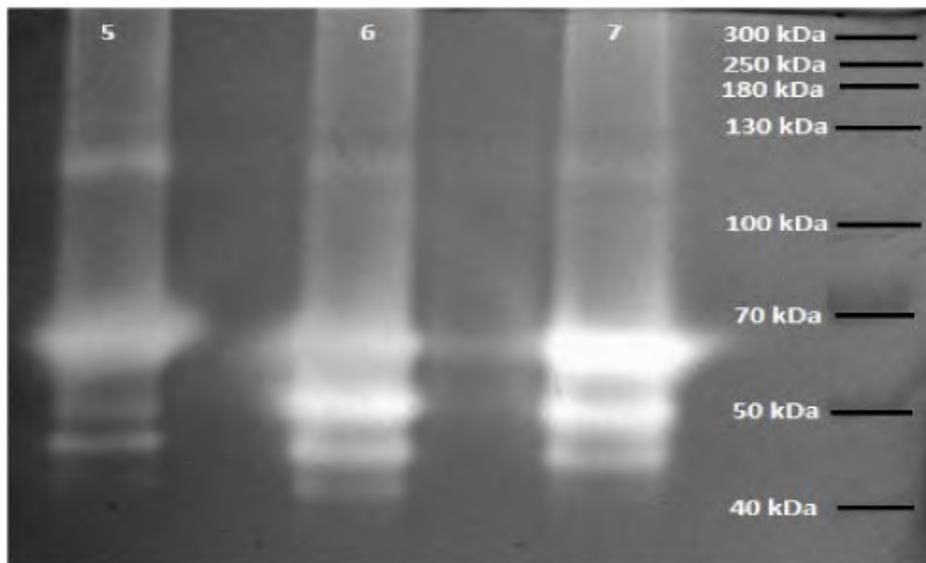


Figura 6. . Zimografía de proteasas extracelulares de aislamientos de *Acanthamoeba* utilizados como controles: 5) CLC 16 y 6) Neff, además de 7) Acanth, que corresponde al aislamiento de la fuente de agua de Nicaragua. Inhibición con 1,10 fenantrolina 1 mM e incubada con el inhibidor en el buffer sustrato.

Efecto citotóxico en cultivo celular

En la Figura 7 se muestra un gráfico de la actividad de la enzima DHL liberada por las células durante las 4, 6 y 24 horas de incubación, así como la liberada por efecto de destrucción de la monocapa celular MDCK por los controles de amebas Neff y CLC-16. Se muestra también la producción basal de DHL de las amebas Neff durante 24 horas.

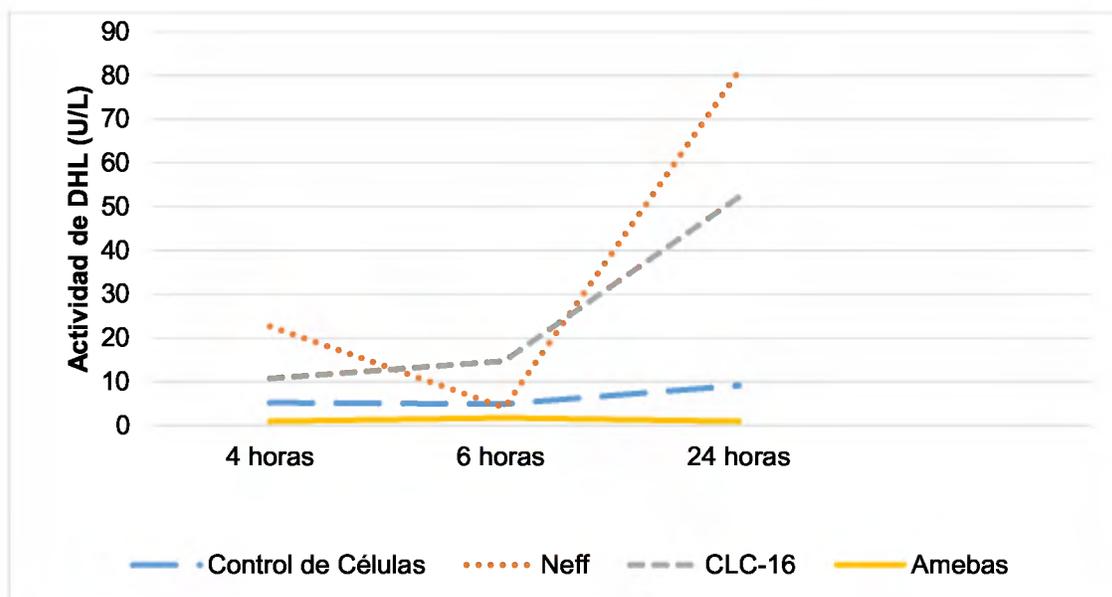


Figura 7. Medición de la actividad de la DHL (U/L) en monocapas celulares de MDCK, a las 4, 6 y 24 horas. Se muestran los resultados de actividad al incubar los controles positivos (Neff y CLC-16) con las células, así como los resultados de la producción basal de DHL por las amebas y las células por separado.

En la Figura 8 se observa la actividad de la enzima DHL liberada principalmente por las células MDCK a las 24 horas, luego de la incubación con cada aislamiento y con cada control. En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de citotoxicidad de los 9 aislamientos y los dos controles de amebas utilizados.

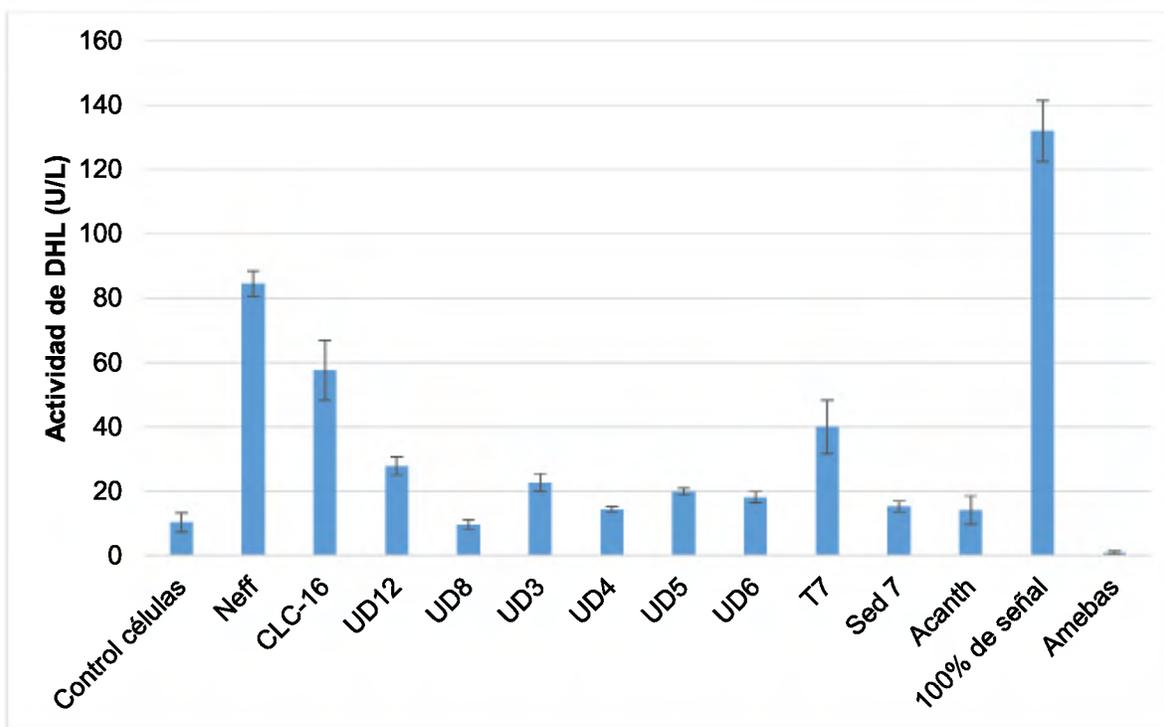


Figura 8. Medición de la actividad de la DHL (U/L) en monocapas de células MDCK, incubadas con los diferentes aislamientos axénicos y las cepas control Neff y CLC-16 durante 24 horas.

Tabla 3. Resultados de porcentaje de citotoxicidad de los aislamientos axénicos de *Acanthamoeba* y de los controles de amebas.

Muestras	Porcentaje de citotoxicidad (%)
*Neff	60,9
*CLC-16	38,8
UD12	14,4
UD8	-0,6
UD3	10,2
UD4	3,3
UD5	7,8
UD6	6,4
T7	24,4
Sed 7	4,0
Acanth	3,1

(*) Controles de amebas proporcionadas por el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC) de la Universidad de La Laguna (ULL), en Tenerife, España.

Un claro efecto citopático sobre las células MDCK se pudo apreciar a las 24 horas solamente para los aislamientos Neff, CLC-16, T7 y UD12 (Figura 9); el mismo efecto citopático se pudo apreciar con la tinción con cristal violeta (Figura 10).

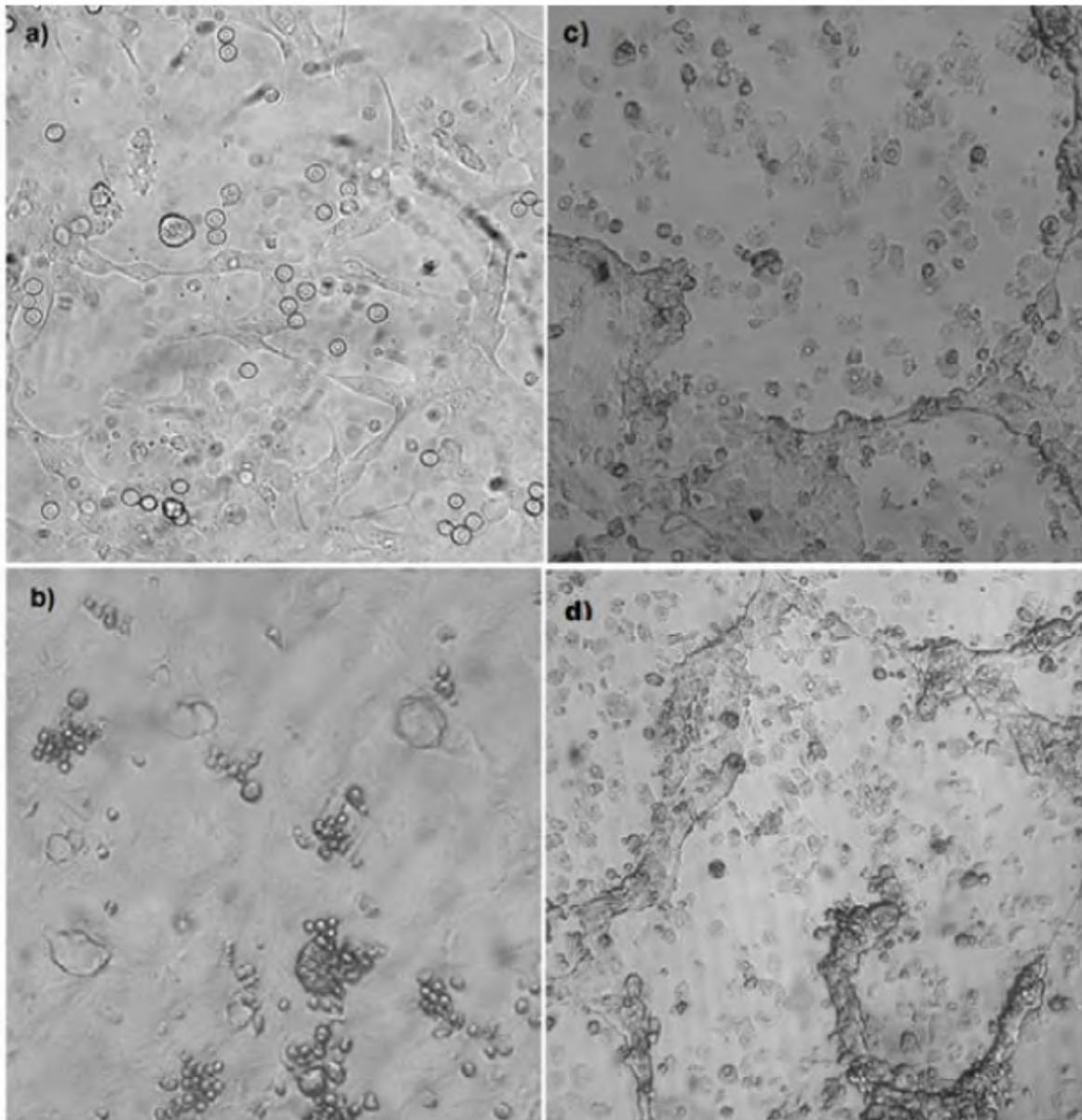


Figura 9. Efecto citopático observado con microscopio de luz invertido a 200X. a) T7, b) UD5, c) Neff, d) CLC-16.

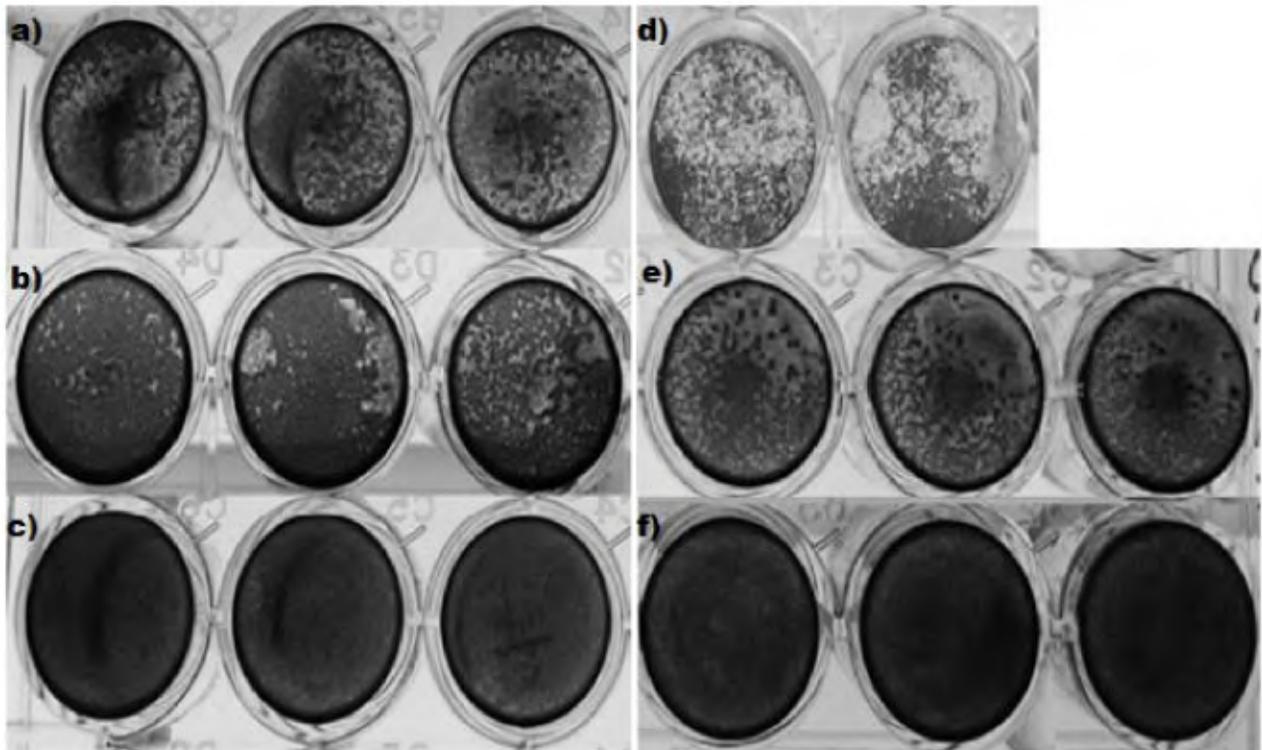


Figura 10. Efecto citopático de las amebas de cultivo axénico sobre células MDCK, teñido con cristal violeta. Monocapa celular en confluencia con un inóculo de 5×10^5 amebas, luego de 24 horas de incubación a 37°C . a) T7, b) B UD12, c) UD5, d) Neff, e) CLC16, f) control de células.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Las amebas de vida libre son organismos con distribución cosmopolita, presentes en diversos ambientes. Hasta la fecha, tres géneros han sido involucrados como agentes etiológicos de cuadros clínicos en el ser humano, siendo el más común *Acanthamoeba* (Walochnik et al, 2000). Durante muchos años fue difícil implementar una metodología eficiente para identificar amebas con potencial patogénico del género *Acanthamoeba*, ya que las pruebas existentes se basaban en metodologías convencionales y poco confiables como la morfología de los quistes observada al microscopio y algunos métodos isoenzimáticos poco estandarizados (Khan et al, 2002). La caracterización por genotipo logró una identificación más fidedigna, permitiendo la comparación entre los aislamientos de diferentes ambientes y zonas geográficas. En la actualidad, se conocen cerca de 20 genotipos dentro del género *Acanthamoeba* (Corsaro et al, 2015), siendo el T4 el que más se aísla de casos clínicos (Walochnik et al, 2000; Maciver et al, 2013).

El uso de metodologías de fácil implementación en el laboratorio, para la detección de organismos potencialmente patogénicos es de gran importancia, ya que ayudan a resolver problemas de diagnóstico y epidemiología. Son precisamente algunas de estas técnicas las que permitieron la caracterización de los aislamientos obtenidos en esta investigación.

En el presente estudio se encontró que un 76,2% de los genotipos aislados corresponden a T4 y un 23,8% al genotipo T3. *Acanthamoeba* genotipo T4 es el

más relacionado con patología en humanos, además de ser el genotipo más encontrado en ambientes ocupados por actividad humana (Fuerst et al, 2003; Maghsood et al, 2005; Maciver et al, 2013). En lo que respecta a los casos de queratitis, este es el genotipo más asociado con infecciones oculares (Maghsood et al, 2005). Maghsood y colaboradores (2005) indicaron que, de 13 aislamientos de *Acanthamoeba* obtenidos de cuadros de queratitis en Irán, 8 (61,5%) eran genotipo T4 y el resto T3 y T2. Maciver y colaboradores (2013) reportaron que la mayoría de casos clínicos de queratitis ocurridos en Osaka, Japón, eran debidos al genotipo T4 e indicaron que un patrón similar fue encontrado en Hong Kong. Los mismos autores informaron sobre una alta incidencia de este genotipo en contenedores de lentes de contacto, aduciendo que esto se puede deber a la capacidad de T4 de sobrevivir a los antimicrobianos utilizados en las soluciones para lentes (Maciver et al, 2013).

En el presente proyecto, se aisló *Acanthamoeba* del 36% de las unidades dentales y el 100% correspondieron al genotipo T4 (Retana-Moreira et al, 2015). Este hallazgo coincide con lo reportado en la literatura; por ejemplo, Barbeau y Buhler (2001) trabajando con fuentes de agua de unidades dentales, reportaron una positividad del 40% para *Acanthamoeba*, mientras que Trabelsi y colaboradores (2010) demostraron la presencia de éste género en el 13,3% de 135 unidades dentales estudiadas. La posibilidad de que estos dispositivos funcionen como posibles fuentes de infección es un hecho reconocido (Retana-Moreira et al, 2015) e incluso, se tiene el antecedente de un caso de infección ocular relacionado con el contacto, de manera accidental, con agua y aerosoles de una unidad dental durante el tratamiento médico (Barbeau J, 2007).

Al hacer referencia a los aislamientos de los aires acondicionados, 4 de los 6 (66,7%) pertenecen al genotipo T3 y los dos restantes fueron identificados como un T4 y un T13 (Tabla 2). El genotipo T3 ya ha sido reportado en aislamientos de aires acondicionados en Egipto (el Sibae, 1993), Irán (Niyiyati et al, 2009) y Malasia (Chang et al, 2011). Además, en Chile se han reportado aislamientos de aires acondicionados de genotipos T3, T4 y T11 (Astorga et al, 2011). Chan y colaboradores (2011) encontraron que 18 de los 20 aislamientos encontrados en aires acondicionados pertenecían al genotipo T4 y los restantes eran T5. Con respecto al genotipo T13 son escasos los trabajos que reportan este aislamiento en muestras ambientales. Recientemente se informó, por primera vez, del aislamiento de una *Acanthamoeba* T13 en un caso clínico por queratitis en una mujer de 22 años que utilizaba lentes de contacto (Grün et al, 2014).

Con respecto a los aislamientos de *Acanthamoeba* provenientes de unidades combinadas de emergencia, los resultados del plan piloto al inicio del proyecto indicaron que el 30% de las unidades muestreadas fueron positivas por *Acanthamoeba* y que el 100% eran genotipo T4 (Retana-Moreira et al, 2014), tal como las muestras T7 y Sed7 del presente estudio. Existen reportes previos de aislamientos de amebas de vida libre en unidades combinadas de emergencia. Por ejemplo, Tyndall y colaboradores (1987) encontraron *Acanthamoeba* y *Harmannella* en unidades combinadas de emergencia y Bier y Sawyer (1990) demostraron la presencia de amebas en 31 de 59 estaciones de estas unidades. Paszko y colaboradores (1991) informaron de la presencia de amebas de vida libre en 47,5% de estas unidades, además de la presencia de *Pseudomonas* y *Legionella* sp. Finalmente, cabe mencionar que del plan piloto de Retana-Moreira

y colaboradores (2014) se reporta el aislamiento de *Balamuthia mandrillaris* en este tipo de unidades, ameba que se conoce es agente de encefalitis amebiana en pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos. Los autores sugieren que estas unidades podrían ser focos de infección de organismos potencialmente patógenos para seres humanos, los cuales pueden ser introducidos a ojos traumatizados por algún accidente en el laboratorio, por lo que se recomienda el adecuado control y mantenimiento de las mismas.

Como ya se sabe, el aislamiento de amebas de vida libre del ambiente es un hecho conocido. Para lograr determinar la relevancia de estos aislamientos se hace necesaria la identificación de aquellos que posean las características asociadas al potencial patogénico. A la hora de realizar este análisis en un organismo como *Acanthamoeba*, es necesario el cultivo de la ameba en medios axénicos para realizar la producción de proteasas así como evaluar el efecto directo sobre un cultivo celular y en animales de laboratorio. Las amebas deben ser crecidas en medio axénico para que el efecto observado se deba solamente al organismo en estudio y no a otros organismos presentes, como por ejemplo bacterias (Khan et al, 2002).

En el presente trabajo solo se logró el cultivo axénico de 8 aislamientos, lo que corresponde al 38,1% del total disponible; la mayoría de ellos provenían de los aislamientos de unidades dentales (6 de los 8). No se logró la axenificación de ningún aislamiento a partir de aires acondicionados, mientras que de unidades combinadas de emergencia fue posible axenificar los dos aislamientos con los que se contaba. De estos aislamientos cultivados en medio axénico, el 100% pertenece al genotipo T4. Según el Dr. Jacob Lorenzo Morales, investigador del

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, un aislamiento potencialmente patogénico va a tener más posibilidad y afinidad a la axenificación que los que no lo son y es común que no se puedan axenificar todos los aislamientos primarios de muestras ambientales (comunicación personal).

Dentro de las pruebas básicas para determinación características asociadas al potencial patogénico se encuentran las de termotolerancia y osmotolerancia. En este estudio, todos los aislamientos del genotipo T4 lograron un crecimiento a 37 °C, mientras que un 87,5% logró crecer cuando se incubaron a 40 °C (Tabla 2). Para este mismo genotipo se encontró una osmotolerancia de 93,7% cuando se sometieron a una concentración de 1 M de manitol (Tabla 2). En el caso de *Acanthamoeba* genotipo T3, todos los aislamientos lograron crecer a 37 °C y 40 °C, además de a una concentración 1,0 M de manitol (Tabla 2). Los aislamientos con genotipo T5 y T13 (Tabla 2) no presentaron termotolerancia a 40 °C ni osmotolerancia a 1,0 M de manitol. Estos resultados coinciden con los estudios que relacionan al genotipo T4 con la presencia frecuente de características asociadas al potencial patogénico (Walochnik et al, 2000; Lorenzo-Morales et al, 2005; Maciver et al, 2013).

La termotolerancia a temperaturas superiores a 35 °C y osmotolerancia a 1,0 M de manitol se han relacionado con mayor potencial patogénico en los aislamientos clínicos y ambientales para las amebas del género *Acanthamoeba* (Walochnik et al, 2000; Khan et al, 2002; Lorenzo-Morales et al, 2005). Khan y colaboradores (2002), realizaron la comparación de diferentes aislamientos de suelos y fuentes de agua con aquellos obtenidos a partir de cuadros de queratitis

en el Reino Unido, mediante pruebas de termotolerancia a 37 °C, osmotolerancia con 1,0 M de manitol y efecto citopático en células epiteliales de córnea. Los autores demostraron que el 100% de los aislamientos clínicos presentaban las pruebas positivas, mientras que para los aislamientos ambientales un 43% presentaban muy poco crecimiento y el resto no soportaba las condiciones de estrés a las que fueron sometidos. Se ha propuesto utilizar temperaturas mayores a 37 °C en la prueba de termotolerancia, con el fin de poder hacer la prueba más útil y concluyente en los aislamientos ambientales principalmente, ya que se ha visto que la mayoría de aislamientos clínicos presentan termotolerancia a temperaturas mayores a 37 °C (Hadas & Mazur, 1993; Walochnik et al, 2000; Lorenzo-Morales et al, 2005). Por ejemplo, la mayoría de aislamientos del genotipo T16 son incapaces de crecer sobre los 37 °C y no tienen capacidad de producir efecto citopático en cultivo celular, lo que hace que exista poca posibilidad de que este genotipo llegue a producir un cuadro clínico (Corsaro et al, 2015). Por otro lado, Walochnik y colaboradores (2000) demostraron una correlación entre la capacidad de crecimiento de las amebas a temperaturas de 40 °C y el efecto citopático (total destrucción de la monocapa a las 48 horas) producido en la línea celular HEp-2.

Con respecto a la osmotolerancia, se menciona que entre mayor el grado de osmotolerancia en los aislamientos clínicos o ambientales, mejor correlación con el potencial patogénico del aislamiento (Walochnik et al, 2000; Chan et al, 2011). Esta prueba es importante ya que es representativa del estrés osmótico al cual se expone la ameba en la invasión y colonización de estrato córneo en los

cuadros de keratitis amebiana, dado principalmente por la salinidad de los líquidos secretados (Hadas & Mazur, 1993; Walochnik et al, 2000; Siddiqui & Khan, 2012).

A manera global, los resultados de este estudio muestran que los aislamientos de los genotipos T4 y T3 son lo que se aíslan en mayor cantidad de muestras ambientales y son los que presentan mayor osmotolerancia y termotolerancia. Lo anterior coincide con los diferentes estudios antes mencionados (Walochnik et al, 2000; Khan et al, 2002; Chang et al, 2011; Maciver et al, 2013), lo que indica que estos aislamientos cuentan con características consideradas necesarias, aunque no suficientes, para sospechar de un potencial patogénico. Las pruebas de osmotolerancia y termotolerancia no son definitivas para el análisis de este potencial. Geisen y colaboradores (2014) encontraron una variabilidad en los resultados de termotolerancia a 37 °C y osmotolerancia a 1,0 M con manitol para *Acanthamoeba* genotipo T4, aislados de suelos de diferentes zonas geográficas como los Países Bajos, Cerdeña y en las montañas del Tíbet. Los autores indicaron que la variabilidad de los resultados está asociada con las variaciones geográficas, en donde la adaptación de las amebas al nicho ecológico del cual se aíslan puede afectar los resultados de estas pruebas (Geisen et al, 2014).

Como ya se ha comentado, el género *Acanthamoeba* puede producir diferentes patologías mediante un proceso complejo, el cual involucra tanto factores dependientes como no dependientes del contacto ameba-célula. Se ha observado que el primer paso crítico para este efecto es la adhesión a los tejidos, lo cual se sugiere que se da por medio de proteínas como la proteína de unión a manosa con un peso molecular de 130 kDa y la proteína de unión a laminina con

un peso molecular de 55 kDa (Yang et al, 1997; Siddiqui & Khan, 2012). Ambas son proteínas de adhesión y constituyen el paso inicial que posteriormente llevará a la fagocitosis (Siddiqui & Khan, 2012). Adicionalmente, se conoce que *Acanthamoeba* posee la capacidad de producir elastasas, fosfolipasas, glicosidasas, una variedad de metaloproteasas y proteasas de serina y cisteína, las cuales se encargan de la ruptura de células, lo que lleva al incremento de la concentración de calcio, cambios en el citoesqueleto y en la morfología celular; esto provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana y eventualmente lleva a la muerte celular (Siddiqui & Khan, 2012; Castrillón & Orozco, 2013). Estas amebas poseen también ecto-ATPasas, las cuales activan la cascada de caspasa-3, por medio de la unión del adenosin difosfato (ADP) y el aumento de la concentración de calcio, lo que también lleva a la célula a la muerte celular por medio de apoptosis (Chusattayanond et al, 2010). Por lo tanto, las amebas del género *Acanthamoeba* no solo poseen mecanismos para destruir directamente a las células sino también cuentan con mecanismos para activar la apoptosis.

En el presente trabajo, mediante la técnica de zimografía, se evidenció la producción de varias bandas correspondientes a diferentes pesos moleculares (Figuras 3 y 4). En todos los aislamientos fue posible apreciar una proteasa cercana a los 130 kDa, así como una banda ancha entre los 70-50 kDa (Figuras 3 y 4). Bandas con el mismo peso molecular se pudieron observar en los controles Neff y CCL-16 y en el aislamiento axénico T5 (Figura 4). Además, en todos los aislamientos se presentaron dos o tres bandas con peso molecular entre los 40-50 kDa (Figuras 3 y 4). En términos generales, no fue posible observar una diferencia

real en el número y peso molecular de las bandas entre todos aislamientos axénicos.

Para llevar a cabo una identificación preliminar del tipo de proteasa secretada se emplearon los inhibidores fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), el cual se utilizó para la identificación de proteasas de serina, y 1,10 fenantrolina, para la identificación de metaloproteasas. En la Figura 3 se muestra como los carriles con la letra b de todos los aislamientos fueron inhibidos con PMSF, demostrándose que las proteasas detectables por medio de esta técnica eran proteasas de serina. Como se observa en las Figuras 5 y 6, ninguna banda se ve inhibida al emplear 1,10 fenantrolina. Se puede concluir que, al menos con la técnica empleada en este estudio, no fue posible detectar metaloproteasas extracelulares.

Khan y colaboradores (2000) sugieren que, entre mayor sea la producción de proteasas, mayor será el potencial patogénico de los aislamientos, el cual, según los autores, puede ser utilizado como marcador de patogenicidad. En este mismo estudio, se reportó que la sobreexpresión de una proteasa de serina de 107 kDa puede ser usada como marcador específico de patogenicidad en el diagnóstico, ya que fue encontrada en los aislamientos clínicos analizados y no en los aislamientos ambientales. Sissons y colaboradores (2006) reportaron dos proteasas de serina, de 130 kDa y 85 kDa (inhibidas con PMSF), en un aislamiento de un caso de keratitis (genotipo T4), mientras que en un caso de encefalitis granulomatosa (genotipo T1), reportaron una proteasa de serina 130 kDa y una metaloproteasa de 150 kDa (inhibida con 1,10 fenatrolina). En este estudio se indicó que, tanto las metaloproteasas como las proteasas de serina son

capaces de degradar la matriz extracelular, pero no de producir un efecto citotóxico en células de barrera hematoencefálica.

Alsam y colaboradores (2005) demostraron que las proteasas de serina juegan un papel importante en producir permeabilidad celular. Al medir la resistencia eléctrica transendotelial en células de endotelio microvascular de la barrera hematoencefálica humana, incubadas con proteasas extracelulares de un aislamiento clínico de *Acanthamoeba* genotipo T1, se logró evidenciar una inhibición de la permeabilidad celular cuando se empleaba el inhibidor PMSF. Sin embargo, el peso molecular de la proteasa o proteasas presentes en el sobrenadante empleado no se indicó en el estudio.

En trabajos publicados que emplean células MDCK como modelo experimental, para demostrar el efecto citopático “in vitro” de aislamientos clínicos de *Acanthamoeba* (genotipo T4), se determinó que proteasas de serina de peso molecular de 39 kDa y 58 kDa, tienen un papel en la separación celular y pérdida de su estructura, pero no un efecto citolítico en cultivo celular. Los autores indicaron que para este último efecto se necesita el contacto directo ameba-célula (Serrano-Luna, et al 2006).

Es importante mencionar que las proteasas de serina producidas por las amebas de vida libre no sólo han sido implicadas en el efecto o daño que pueden provocar sobre una célula hospedadora, ya que también se ha demostrado su importancia en el proceso de enquistamiento y desenquistamiento. Dudley y colaboradores (2008) realizaron ensayos de enquistamiento y desenquistamiento en medio axénico utilizando PMSF a diferentes concentraciones y lograron demostrar que a mayor inhibición de las proteasas de serina, el porcentaje de

enquistamiento es significativamente menor, al igual que la producción de trofozoítos a partir de quistes que son expuestos a este mismo inhibidor.

El hallazgo de proteasas de serina en esta investigación es importante, ya que los patrones de pesos moleculares de 130 kDa, las bandas ubicadas entre 50-70 kDa e incluso las de bajo peso molecular de entre 40-50 kDa (Figuras 3 y 4) coinciden con el peso molecular de algunas proteasas descritas en los estudios mencionados previamente. Sin embargo, al encontrarse en todos los aislamientos un patrón similar en la zimografía, no fue posible emplear la producción de proteasas como característica para la diferenciación de aislamientos patogénicos y no patogénicos. Una posibilidad es utilizar sustratos que permitan detectar con más facilidad diferencias cuantitativas de la actividad proteolítica, lo que permitiría la estimación de la actividad hidrolítica de las proteasas en ese sustrato (Alfieri et al, 2000). Otra posibilidad, sería la identificación por medio de proteómica, para poder llegar a una identificación más exacta de las proteasas de estos aislamientos, lo que permitiría determinar de forma definitiva si hay diferencias entre las cepas en cuanto a la expresión de enzimas proteolíticas.

El estudio del efecto citopático tanto “in vivo” como “in vitro” ha sido de gran importancia para ayudar a la identificación de aislamientos ambientales con potencial patogénico, siendo el estándar de oro la utilización de ratones de laboratorio. Actualmente y por razones éticas, el cultivo celular ha llegado a sustituir el ensayo en animales de laboratorio (Culbertson et al, 1958; Gonzáles et al, 2013). Utilizando el modelo de efecto citopático “in vitro” se ha reportado que la fagocitosis por parte de la ameba juega un papel muy importante en la patogénesis, ya que es uno de los mecanismos más importantes de alimentación

durante la fase parasítica (Takaoka-Sugihara et al, 2012). Durante la observación del efecto citopático en las células se ha encontrado que en células de córnea humana, el contacto directo es mucho más importante para producir el efecto citopático que factores solubles tipo proteasas producidas por las amebas (Takaoka-Sugihara et al, 2012). Incluso, se propone que los factores solubles funcionan promoviendo la separación celular, pero no la destrucción celular (Omaña-Molina et al, 2013).

En el presente estudio se observó que no todos los aislamientos axénicos genotipo T4 producen efecto citopático visible, lo que coincide con lo reportado previamente por Maciver y colaboradores (2013). De los 9 aislamientos axénicos que se sometieron a la prueba de efecto citopático en cultivo celular, solamente dos provocaron efecto citopático significativo sobre células MDCK ($p < 0,05$), un aislamiento de unidades combinadas de emergencia (T7) y un aislamiento de unidades dentales (UD12) (Figura 8 y Tabla 3).

En la actualidad, se sabe que existe una diversidad importante dentro del genotipo T4 de *Acanthamoeba*. Empleando la técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés), Maciver y colaboradores (2013) han podido diferenciar al genotipo T4 en 5 subgrupos (I-V); al emplear el análisis de diferencias en la secuenciación, es posible separar al genotipo T4 en 23 subgrupos. Lo que se busca en hoy en día es determinar cuáles subgrupos se relacionan más con las presentaciones clínicas en humanos.

En el presente estudio, los aislamientos T7 y UD12 que son capaces de producir efecto citopático en cultivo celular, también poseen termotolerancia a 40 °C y osmotolerancia a 1,0 M de manitol, lo cual coincide con el reporte de Khan y

colaboradores (2002) sobre las características que debe presentar un aislamiento potencialmente patogénico.

En la presente investigación, se empleó la línea celular MDCK para medir el posible efecto de los diferentes aislamientos. La literatura reporta que para determinar el efecto citopático “in vitro” de las amebas de vida libre, han sido utilizadas diferentes líneas de cultivo celular como: células endoteliales de la microvasculatura de barrera hematoencefálica (Iqbal et al, 2014), células epiteliales de córnea humana (Kinnear, 2004), células de cultivo primario de córnea de conejo (Khan, 2001) y la línea celular HEP-2 (Walochnik et al, 2000). Las células epiteliales de riñón canino MDCK han sido ampliamente utilizadas en análisis de efecto citopático por métodos de análisis de imágenes por microscopios especializados (Omaña-Molina et al, 2013). Queda pendiente en esta investigación el realizar este análisis, ya que sería de gran utilidad para evidenciar el tipo de efecto citopático ejercido por las amebas en cultivo celular.

Al hacer las observaciones con microscopía de luz se observó que después de la incubación de las células durante 24 horas, tanto con el aislamiento T7 (Figura 9a) como con el UD12, se afectó la monocapa celular, la cual se observó disgregada y con espacios ocupados por trofozoítos; incluso se observaron espacios donde no habían células y solo formas vegetativas amebianas (datos no mostrados). Efectos similares fueron observados al incubar las células con los controles Neff y CLC-16 (Figura 9c y 9d, respectivamente). Por otro lado, en la Figura 9b se muestra el aislamiento UD5 (genotipo T4, termotolerante y osmotolerante) después de 24 horas de incubación con las células MDCK; aquí, la monocapa celular se encontró intacta y se observaron muchas formas quísticas.

Estos resultados de observación microscópica se encuentran relacionados con los observados en la Figura 10, donde los aislamientos que producen un efecto citopático significativo en cultivo celular (Figura 8 y Tabla 3) producen un efecto observable en el hoyo de la placa de 24 hoyos teñida con cristal violeta, después de 24 horas de incubación (Figura 10).

La determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica también se reporta en la literatura para evaluar posible citotoxicidad en cultivo celular (Khan 2001; Iqbal et al 2014). En este estudio se realizaron mediciones de la enzima DHL a la monocapa de células MDCK, al incubarlas durante 4, 6 y 24 horas con los aislamientos Neff y CLC-16 (controles), para así determinar el momento más adecuado para realizar la medición (Figura 7). Se determinó que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la producción de actividad de la DHL a las 24 horas, comparada con el control de células, mientras que a las 4 y 6 horas no se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$). Es importante recalcar que estos resultados coinciden con las estandarizaciones realizadas en otros estudios de efecto citopático utilizando líneas celulares diferentes, como las células endoteliales de la microvasculatura de barrera hematoencefálica y células de cultivo primario de córnea de conejo (Khan 2001; Iqbal et al 2014). Este es el primer reporte donde se utiliza la actividad de la enzima DHL para medir efecto citopático producido por las amebas en cultivo celular, empleando la línea MDCK. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de estudios realizados con esta línea celular corresponden a análisis por microscopía electrónica y análisis de imágenes (González et al 2013; Omaña-Molina et al 2013; González et al, 2014).

El análisis de la actividad enzimática de la DHL es una forma de estimar el efecto citopático observado en el cultivo celular (Figuras 9 y 10), provocado por los diferentes aislamientos axénicos. En la Tabla 3 se puede observar el porcentaje de citotoxicidad en cultivo celular de cada uno de los aislamientos axenificados. Se determinó que los aislamientos T7 y UD12 son los que producen un porcentaje de citotoxicidad significativo de 24,4% y 14,4% ($p < 0,05$), respectivamente. Todos los demás aislamientos presentaron un porcentaje $< 10,2\%$ lo cual, mediante pruebas estadísticas, no fue considerado significativo (Tabla 3). Al comparar los controles Neff y CLC-16 (un aislamiento ambiental con potencial patogénico y un aislamiento clínico, respectivamente) con los aislamientos T7 y UD12, se observó que estos últimos poseen las mismas pruebas positivas y un comportamiento similar en cultivo celular.

Los resultados de el presente trabajo determinaron que los aislamientos T7 y UD12, cumplen con las características descritas en la literatura para ser aislamientos potencialmente patogénicos. Ambos presentan positividad en las pruebas de osmotolerancia y termotolerancia, son capaces de producir proteasas de serina y producen un efecto citopático en cultivo celular.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

- Se determina en este trabajo que las pruebas de termotolerancia osmotolerancia en agar no nutritivo no son parámetros definitorios, por sí solos, para separar los aislamientos con potencial patogénico. Lo anterior por cuanto un alto porcentaje de los aislamientos crecen de forma adecuada bajo las condiciones de temperatura y concentración de manitol a las que fueron sometidas.

- Se demuestra en el análisis de proteasas, que la totalidad de proteasas extracelulares detectadas en los aislamientos son proteasas de serina. Sin embargo, los análisis no permiten diferenciar los aislamientos con potencial patogénico. Son necesarias más pruebas para lograr la identificación de las mismas y evaluar su participación en el daño celular observado.

- El efecto citopático en cultivo celular llega a posicionarse en el presente estudio como la herramienta más poderosa para la determinación del potencial patogénico, ya que separa de forma más certera los aislamientos que poseen las características de producir daño celular de los que no lo poseen.

- Se concluye que para lograr diferenciar los aislamientos ambientales de amebas de vida libre con mayor potencial patogénico de los demás aislamientos, es necesario realizar el conjunto de pruebas desarrolladas en este estudio. Esto permitiría emitir un mejor criterio a la hora de estimar la capacidad que tenga un aislamiento ambiental para producir eventualmente un caso clínico.
- En este estudio se observa la presencia de amebas de genotipos relacionados con presentaciones clínicas (T4, T3 y T13) aislados de ambientes ligados al ser humano. Además, se determina la presencia de dos aislamientos con un potencial patogénico significativo provenientes de una jeringa de triple función de una unidad dental y una unidad combinada de emergencia.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams-Sandí E. & Retana-Moreira L. 2014. Amebas de vida libre como agentes de encefalitis en el ser humano. Revista de Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, 20: 4-8.
- Abrahams-Sandí E., Retana-Moreira L., Castro-Castillo A., Reyes-Batlle M. & Lorenzo-Morales J. 2015. Fatal meningoencephalitis in child and isolation of *Naegleria fowleri* from hot springs in Costa Rica. Emerging Infectious Diseases, 21: 382-384.
- Alfieri S.C., Correia C.B., Motegi S.A. & Pral E.F. 2000. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. The Journal of Parasitology, 86: 220-227.
- Alsam S., Sissons J., Jayasekera S. & Khan N.A. 2005. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. Journal of Infection, 51: 150-156.
- Astorga B., Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., Alarcón V., Moreno J., González A.C., Navarrete E., Piñero J.E. & Valladares B. 2011. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. Journal of Eukaryotic Microbiology, 58: 542-544.

- Barbeau J. & Buhler T. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Research in Microbiology*, 152: 753-760.
- Barbeau, J. 2007. Lawsuit against a dentist related to serious ocular infection possibly linked to water from a dental handpiece. *Journal of the Canadian Dental Association*, 73: 618-622.
- Bier J. & Sawyer T. 1990. Amoeba isolated from laboratory eyewash stations. *Current Microbiology*, 20: 349-350.
- Castrillón J.C & Orozco L.P. 2013. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista Chilena de Infectología*, 30: 147-155.
- Chinchilla M., Castro E., Alfaro M. & Portilla E. 1979. Amebas de vida libre productora de meningoencefalitis. Primeros hallazgos en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 21: 135-142.
- Chinchilla M., Alfaro M., Marín R.E., Guerrero O.M. & Portilla E. 1981. Amebas productoras de meningoencefalitis en el hombre. Estudio epidemiológico en Costa Rica. *Primeras Jornadas de Investigación UCR*. 208-209.
- Clarke B., Sinha A., Parmar D.N. & Sykakis E. 2012. Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal of Ophthalmology*, 2012: 1-6.
- Chan L.L., Mak J.W., Low Y.T., Koh T.T., Ithoi I. & Mohamed S.M. 2011. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica*, 117: 23-30.

- Chusattayanond A.D., Boonsilp S., Kasisit J., Boonmee A. & Warit S. 2010. Thai *Acanthamoeba* isolate (T4) induced apoptotic death in neuroblastoma cells via the Bax-mediated pathway. *Parasitology International*, 59: 512-516.
- Corsaro D., Walochnik J., Köhler M. & 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., Cohen H.K. & Minner J.R. 1958. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *American Association of Pathologists and Bacteriologists*, 35: 185-196.
- Dudley R., Alsam S. Khan & N.A. 2008. The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Letters*, 286: 9-15.
- Dupuy M., Berne F., Herbelin P., Binet M., Berthelot N., Rodier M.H. & Hécharde Y. 2014. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217: 335-339.
- Echanti L., González D. & Marin R. 1994. Aislamiento de amebas de vida libre capaces de producir meningoencefalitis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 61: 11-14.
- Edagawa A., Kimura A., Kawabuchi-Kurata T., Kusuhara Y. & Karanis P. 2009. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and

Naegleria species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitology Research*, 105: 1109-1117.

- el Sibae, M.M. 1993. Detection of free-living amoebae (*Acanthamoeba polyphaga*) in the air-conditioning systems. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 23:687-690.
- Fuerst P.A., Booton G.C., Visvesvara G.S. & Byers T.J. 2003. Genotypic identification of non-keratitis infections caused by the opportunistically pathogenic amoeba genus *Acanthamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50: 512-513.
- Geisen S., Fiore-Donno A.M., Walochnik J. & Bonkowski M. 2014. *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitology Research*, 113: 3151-3158.
- Gonzáles R.A., Salazar V.L., Omaña M.M., Lorenzo M.J. & Martínez P.A. 2013. *Acanthamoeba royreba*: Morphological features and in vitro cytopathic effect. *Experimental Parasitology*, 133: 369-375.
- Gonzáles R.A., Salazar V.L., Omaña M.M., Reyes M.B., Martín C.N. & Lorenzo M.J. 2014. Morphological features and in vitro cytopathic effect of *Acanthamoeba griffini* trophozoites isolated from a clinical case. *Journal of Parasitology Research*, 2014: 256310.
- Grün A.L., Stemplewitz B. & Scheid P. 2014. First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. *Parasitology Research*, 113: 2395-2400.

- Hadas E. & Mazur T. 1993. Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Tropical Medicine and Parasitology*, 44: 197-200.
- Herron G. S., Banda M. J., Clark E. J., Gavrilovic J. & Werb Z. 1986. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 2814-2818.
- Iqbal J., Naeem K., Siddiqui R. & Khan N. A. 2014. *In vitro* inhibition of protease-activated receptors 1, 2 and 4 demonstrates that these receptors are not involved in an *Acanthamoeba castellanii* keratitis isolate-mediated disruption of the human brain microvascular endothelial cells. *Experimental Parasitology*, 145: 78-83.
- Khan N. A., Jarrol, E. L., Panjwani N., Cao Z. & Paget T. A. 2000. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2858-2861.
- Khan N. A. 2001. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 43: 391-395.
- Khan N. A., Jarroll, E. L. & Paget, T. A. 2002. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 45: 197-202.
- Khan N. A. 2006. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 564–595.
- Khan N. A. 2008. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 1051-1057.

- Kinde H., Read D.H., Daft B.M., Manzer M., Nordhausen R.W., Kelly D.J. & Visvesvara G.S. 2007. Infections caused by pathogenic free-living amoebae (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19: 317–322.
- Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Foronda P., Martínez E. & Valladares B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*, 95: 273-277.
- Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Arnalich-Montiel F., Piñero J.E. & Valladares B. 2013. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology*, 29: 181-187.
- Kinnear F.B. 2004. *Acanthamoeba* pathogenicity for corneal cells. *Journal of Infection*, 49: 310-316.
- Maciver S. K., Asif M., Simmen M. W. & Lorenzo-Morales J. 2013. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *European Journal of Parasitology*, 49: 217-221.
- Maghsood A.H., Sissons J., Rezaian M., Nolder D., Warhurst D. & Khan N.A. 2005. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 755-759.

- Martín-Navarro C., Lorenzo-Morales J., Machín R., López-Arencibia A., Valladares B. & Piñero E. 2010. *Acanthamoeba* spp.: *in vitro* effects of clinical isolates on murine macrophages, osteosarcoma and HeLa cells. *Experimental Parasitology*, 126: 85-88.
- Niyiyati M., Lorenzo-Morales J., Rahimi F., Motevalli-Haghi A., Martín-Navarro C.M., Farnia S., Valladares B. & Rezaeian M. 2009. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103: 425-427.
- Nuprasert W., Putaporntip C., Pariyakanok L. & Jongwutiwes S. 2010. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 4636-4640.
- Omaña-Molina M., González-Robles A., Salazar-Villatoro L., Lorenzo-Morales J., Cristóbal-Ramos A., Hernández-Ramírez V., Talamás-Rohana P., Méndez-Cruz A. & 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: 461329.
- Page F.C. 1998. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside*.
- Pankhurst C. L. & Coulter W. A. 2007. Do contaminated dental unit waterlines pose a risk of infection? *Journal of Dentistry*, 35: 712-720.

- Paszko-Kolva C., Yamamoto H., Shahamat M., Sawyer TK., Morris G. & Colwel R.R. 1991. Isolation of amoebae and *Pseudomonas* and *Legionella* spp. from eyewash stations. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 163-167.
- Philippe N., Legendre M., Doutre G., Couté Y., Poirot O., Lescot M., Arslan D., Seltzer V., Bertaux L., Bruley C., Garin J., Claverie J.M. & Abergel M. 2013. Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science*, 341: 281-286.
- Qvarnstrom Y., Nerad T.A. & Visvesvara G.S. 2013. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60: 626-633.
- Retana-Moreira L., Abrahams-Sandí E., Cabello-Vílchez A.M., Reyes-Batlle M., Valladares B., Martínez C.E., Piñero J.E. & Lorenzo-Morales J. 2014. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* from combination shower units in Costa Rica. *Parasitology Research*, 113: 4117-4122.
- Retana-Moreira L. & Abrahams-Sandí E. 2014. Primer aislamiento de *Balamuthia mandrillaris* en Costa Rica. *Revista de Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 20: 9-13.
- Retana-Moreira L., Abrahams-Sandí E., Castro-Artavia E., Fernández-Sánchez A., Castro-Castillo A., Reyes-Batlle M. & Lorenzo-Morales J. 2015.

Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* strains from dental units in Costa Rica. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. In Press.

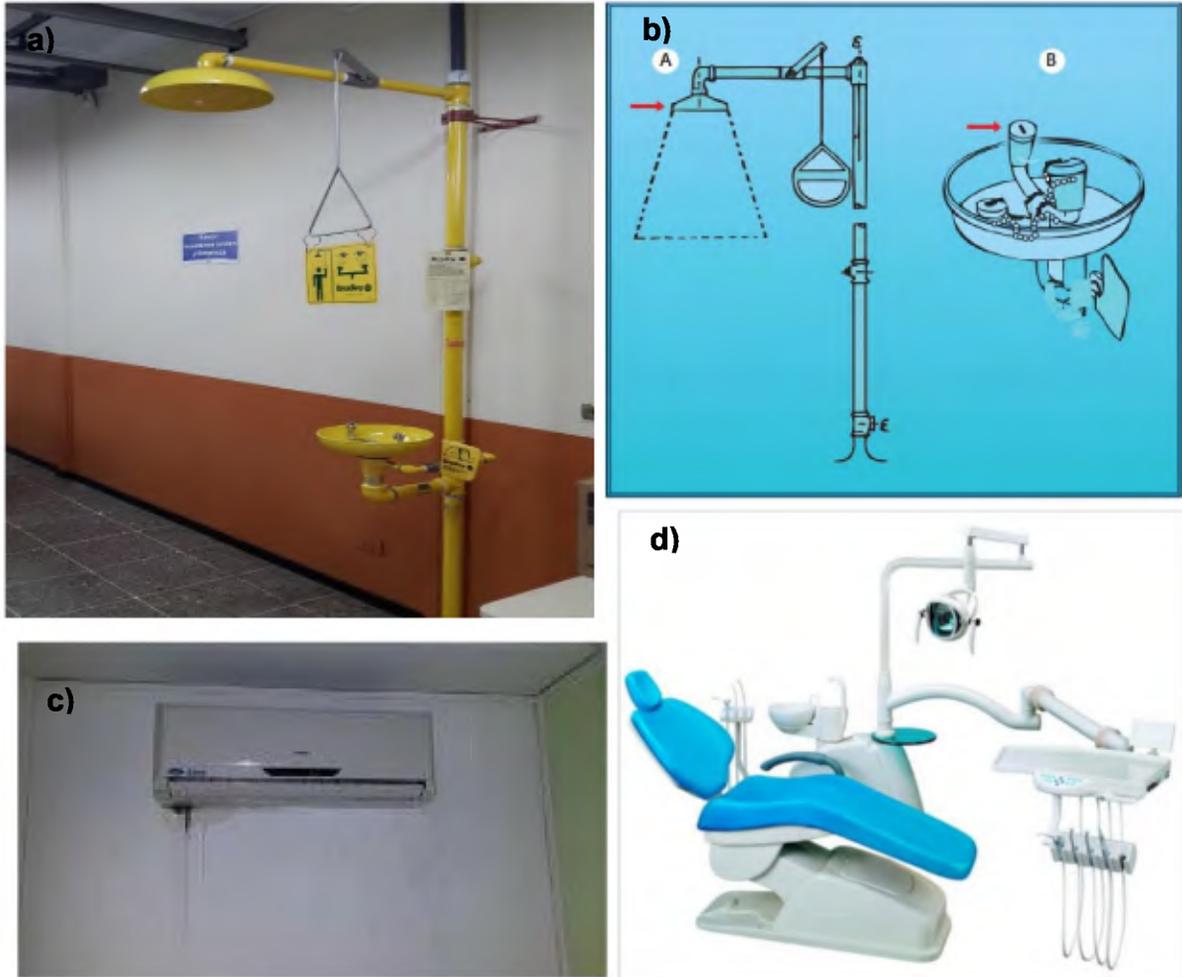
- Reyes-Batlle M., Todd C.D., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Cabello-Vílchez A.M., González A.C., Córdoba-Lanús E., Lindo J.F., Valladares B., Piñero J.E. & Lorenzo- Morales J. 2014. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*, 113: 1383-1388.
- Schuster F.L. & Visvesvara G.S. 2004. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 7: 41–51.
- Schuster F.L. & Visvesvara G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34: 1001-1027.
- Serrano-Luna J., Cervantes-Sandoval I., Calderón J., Navarro-García F., Tsutsumi V. & Shibayama M. 2006. Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 16-23.
- Siang M.M., Yunus Z., Razi A., Mohammad Y.A.R., Ahmad Z. & Toosa H. 2012. The microbiological quality of water from dental unit waterlines in Malaysian Armed Forces dental centres. *Archives of Orofacial Sciences*, 7: 14-20.
- Siddiqui R. & Khan N.A. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5: 1-6.

- Sissons J., Alsam S., Goldsworthy G., Lightfoot M., Jarroll E.L., & Khan N.A. 2006. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BioMed Central Microbiology*, 6: 42.
- Takaoka-Sugihara N., Yamagami S., Yokoo S., Matsubara M. & Yagita K. 2012. Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. *Molecular Vision*, 18: 2221-2228.
- Trabelsi H., Sellami A., Dendana F., Sellami H., Cheikh-Rouhou F., Makni, F. Ben Dhiaa, S. & Ayadi A. 2010. Free-living amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. *Parasite*, 17: 67-70.
- Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Sellami H., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F. & Ayadi A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathologie-Biologie*, 60: 399-405.
- Tyndall R.L., Lyle M.M. & Ironside K.S. 1987. The presence of free-living amoebae in portable and stationary eyewash stations. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 48: 933-934.
- Walochnik J., Obwaller A. & Aspöck H. 2000. Correlations between morphological, molecular biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *American Society for Microbiology*, 66: 4408-4413.

- Weissman B.A. & Mondino B.J. 2002. Risk factors for contact lens associated microbial keratitis. *Contact Lens & Anterior Eye: The Journal of the British Contact Lens Association*, 25: 3-9.
- Yang Z.T., Cao Z.Y. & Panjwani N. 1997. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host parasite interactions. *Infection and Immunity*, 65: 439-445.

ANEXOS

Anexo1



- a) Unidad combinada de emergencia; b) diagrama de una unidad combinada de emergencia: ducha, se señala con una flecha el cabezal de ducha (A) y lava ojos, se señala con flechas el cabezal del lava ojos (B) (tomada de Retana-Moreira & Abrahams-Sandí, 2014); c) aire acondicionado y d) unidad dental.