

**ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL**  
(FOR EVALUATION OF THE ACT DOCTORAL THESIS)

Año académico (*academic year*): 2019/20

DOCTORANDO (*candidate PHD*): **MARTÍN PÉREZ, TANIA**  
D.N.I./PASAPORTE (*Id.Passport*): \*\*\*\***9731W**  
PROGRAMA DE DOCTORADO (*Academic Committee of the Programme*): **D420-CIENCIAS DE LA SALUD**  
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA (*Department*): **BIOLOGIA DE SISTEMAS**  
TITULACIÓN DE DOCTOR EN (*Phd title*): **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 19/02/20, reunido el tribunal de evaluación, constituido por los miembros que suscriben el presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral **con Mención Internacional** (*In today assessment met the court, consisting of the members who signed this Act, the candidate defended his doctoral thesis with mention as International Doctorate*), elaborada bajo la dirección de (*prepared under the direction of*) JORGE PÉREZ SERRANO // ÁNGEL CRIADO FORNELIO.

Sobre el siguiente tema (*Title of the doctoral thesis*): **NUEVAS APORTACIONES EN LA CARACTERIZACIÓN, CULTIVO Y TRATAMIENTO EN ACANTHAMOEBA SPP**

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>1</sup> de (**no apto, aprobado, notable y sobresaliente**) (*After the defense and defense of the thesis, the court agreed to grant the GLOBAL RATING (fail, pass, good and excellent)*): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, a 19 de FEBRERO de 2019



Fdo. (Signed): .....

Francisco Bolé Fernández

FIRMA DEL ALUMNO (*candidate's signature*),



Fdo. (Signed): José Pedro Benyo

Fdo. (Signed): David Leitsch

Con fecha 24 de FEBRERO de 2020, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



Fdo. (Signed): .....

TANIA MARTÍN PÉREZ

<sup>1</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad. (*The grade may be "fail" "pass" "good" or "excellent". The panel may confer the distinction of "cum laude" if the overall grade is "Excellent" and has been awarded unanimously as such after secret voting.*)

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:  
*(Incidents / Comments)*

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, se  
procede, con fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis en el Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado, con número de páginas: \_\_\_\_\_.

Alcalá de Henares a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_



Pilar de la Vega Gallego  
Fdo. El Funcionario



Dr. D. Pedro de la Villa Polo, Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud.

**INFORMA** que la Tesis Doctoral titulada **NUEVAS APORTACIONES EN LA CARACTERIZACIÓN, CULTIVO Y TRATAMIENTO EN ACANTHAMOEBA SPP**, presentada por Dña. **TANIA MARTÍN PÉREZ**, bajo la dirección del Dr. D. Jorge Pérez Serrano y del Dr. D. Ángel Criado Fornelio, reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal en calidad de Tesis Doctoral con Mención Internacional. Esta Comisión ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 18 de diciembre de 2019.


Fdo.: Pedro de la Villa Polo

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS  
PARA SU PRESENTACIÓN**

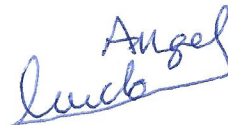
**RD 99/2011**

Los Doctores, **D. Jorge Pérez Serrano** y **D. Ángel Criado Fornelio**, como Directores de la Tesis Doctoral titulada: **“Nuevas aportaciones en la caracterización, cultivo y tratamiento en *Acanthamoeba* spp.”**, realizada por **D<sup>a</sup>. Tania Martín Pérez** en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, **autorizan a su presentación a trámite**, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos,  
firman la presente autorización en Alcalá de Henares a 03  
de Diciembre de 2019



Firmado digitalmente por  
PEREZ SERRANO JORGE -  
[REDACTED]  
Nombre de reconocimiento  
(DN): c=ES,  
serialNumber=IDCES-030924  
93M, givenName=JORGE,  
sn=PEREZ SERRANO,  
cn=PEREZ SERRANO JORGE -  
[REDACTED]  
Fecha: 2019.12.03 21:09:02  
+01'00'



Fdo.: Dr. Jorge Pérez Serrano

Fdo.: Ángel Criado Fornelio



Universidad  
de Alcalá

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**Nuevas aportaciones en la caracterización,  
cultivo y tratamiento en *Acanthamoeba* spp.**



Tania Martín Pérez

2019



“¡Hay que explorar lo inexplorado!”

Russell (Up)





# Agradecimientos

Quisiera reconocer el esfuerzo, el tiempo, la dedicación, el aporte de conocimientos, el buen hacer, la generosidad, de todas las personas que me han acompañado durante esta etapa académica, que culmina con la elaboración de esta tesis, vosotros, sin duda, habéis sido una guía fundamental durante este maravilloso y a la vez, difícil camino.

No puedo olvidar tampoco a las personas que están a ese “otro lado”, las que una vez fuera del laboratorio, me han ayudado en momentos difíciles, los que me han dado fuerzas cuando no las tenía, los que me han dado consejo, por supuesto, han sido los cimientos sobre los que se ha construido todo, los que me han permitido ser la persona que soy ahora.

Sabéis que soy de pocas palabras, pero no puedo despedirme sin dar el reconocimiento que merecen a las siguientes personas:

En primer lugar, dar las gracias a mis directores de tesis y amigos: el Dr. Jorge Pérez Serrano y Dr. Ángel Criado Fornelio: Jorge, gracias por confiar en mi y darme la oportunidad 7 años atrás de poder trabajar e iniciarme de una manera más sería en este apasionante mundo de la parasitología, cuando era simplemente una alumna ¿te acuerdas de las palomas mensajeras y *Haemoproteus*?, gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis, si ahora las cosas me van bien profesionalmente hablando un 90 % es gracias a ti.

Ángel, eres de las personas con las que mejor he congeniado durante estos años, trabajar contigo ha sido un privilegio, sin ti y sin tus ideas tan originales esta tesis hubiese sido mucho más dura. Gracias a tu mujer, Amy, por los deliciosos bollos (sobre todo el brownie) que hace y, que nos alegraban la mañana.

Al Dr. Juan Soliveri de Carranza y Dr. José Luis Copa Patiño, aunque no seáis mis directores de tesis es como si lo fuerais, muchas gracias por vuestros consejos y ayuda en todo lo que he necesitado, a pesar de tener una agenda tan ocupada siempre sacabais tiempo para hablar conmigo.

Como he dicho antes, ha sido un camino que ha dado muchas vueltas, y cuando estaba relacionado con microbiología, ahí estabais vosotros dos para ofrecerme vuestros consejos y apoyo.

Al Dr. Javier Martínez González darte las gracias por tus consejos y por tus críticas. Por no enfadarte con las sorpresas que te preparábamos para tu cumpleaños.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que gracias a ellos los días se hacían más llevaderos. A Irene con quien pase los primeros años de tesis y me inicio en el mundo de las amebas. Además, de pasar muy buenos ratos en el laboratorio. A Cris con la que siempre he podido contar para cualquier cosa y con la que he compartido tiempos difíciles, espero de verdad que las cosas vayan a mejor para ti. Echaré de menos ir de congresos con vosotras dos. A Alba que ha estado presente en todo mi recorrido tanto en los tiempos buenos del principio como en los tiempos difíciles del final. A Andrea la última en llegar pero que pronto paso a ser una más, una lástima que no hayamos podido pasar más tiempo juntas. A Fran porque siempre me sacabas una sonrisa en los momentos malos.

Sole por ayudarme con los trámites administrativos, por ver siempre el lado positivo de las cosas y animarme.

También quiero agradecer a las personas de los CAI de Medicina y Biología que me han ayudado con la tesis siempre amablemente y con una sonrisa: Isa y Cristina de la unidad de Cultivos Celulares, Pilar y Olga de la unidad de Biología Molecular, José y Antonio de la unidad de Microscopia Electrónica, Ángel del Gabinete fotográfico, Juan y Guillermo la unidad de Isotopos Radioactivos. Y, por último, al Dr. José María Orellana Muriana con quien más he coincidido durante estos años, muchas gracias por haber esta presente en esas situaciones disparadas.

Al Dr. Javier de la Mata, Dr. Rafael Gómez, Dr. Javier Sanchez Nieves, Dra. Paula Ortega de los departamentos de Química Orgánica e Inorgánica por su gran ayuda a la hora de que esta tesis saliera adelante. También a Dra. Tania Lozano, Dra. Cornelia Peña, Yael y Paula por sintetizar los dendrímeros y nanopartículas de esta tesis.

Muchas gracias a la Dra. Isabel Fuentes y Dra. Esperanza Rodríguez por permitirme realizar el trabajo de fin de máster en sus grupos de investigación, durante ese año, gracias a vosotras y al resto del equipo del instituto de Salud Pública Carlos III: Begoña Bailo, Aida De Lucio, Dr. Jose María Saugar, Elena Dacal, Dr. David Carmena, Dr. Sonsoles Jiménez Sánchez. Espero que algún día nuestros caminos se vuelvan a cruzar.

Al Dr. José Luis Pérez Díaz por permitirme formar parte de dos proyectos europeos en los cuales me enseñaste otras maneras de hacer ciencia y cómo no hay que investigar. También dar las gracias a las personas que han formado parte de estos proyectos por el cálido recibimiento que me disteis y hacerme sentir una más del equipo desde el primer día: Juan Sánchez García-Casarrubios, Gonzalo Fernández Perea, Mihayl Iliiev Petrov, Javier Corella Romero, Julio César Saavedra González, Rodrigo Ruiz Lucini y Joaquín Navarro Zafra. Y gracias por recibirme otra vez con los brazos abiertos

Gracias al Dr. Manuel Enrique Ávila-Blanco por enseñarme a tener templanza en la investigación.

I would like to thank Dr. Julia Walonich who allow me join to the Molecular Parasitology Lab and to thank Dr. Martina Köhler, Dr. David Leitsch, Edwin Kniha, Susanne Glöckl and Iveta Häfeli for making my first days easier. It was an unforgettable experience.

Y por último y no menos importante, a mi familia y amigos por aguantarme durante estos años que no siempre ha sido fácil. Sobre todo, quiero dar las gracias a mis padres, Víctor y Paqui, sin ellos y sin su esfuerzo esta tesis no habría sido posible, gracias. A mi hermano Víctor por acompañarme a la universidad cuando estaba cerrada, por ayudarme a editar la tesis y por estar a mí lado. Gracias a los 3 por soportarme y por apoyarme en todos los momentos, sé que no ha sido fácil.

A Carlos por ser un ejemplo de tesón y trabajo duro, por siempre animarme a dar lo mejor de mí y por tirar de mí cuando no podía más. Muchas gracias.

A María quiero darte las gracias por aguantar esos meses en los que no tenias noticias de mi porque estaba ocupada con la tesis, gracias por ser tan comprensiva.

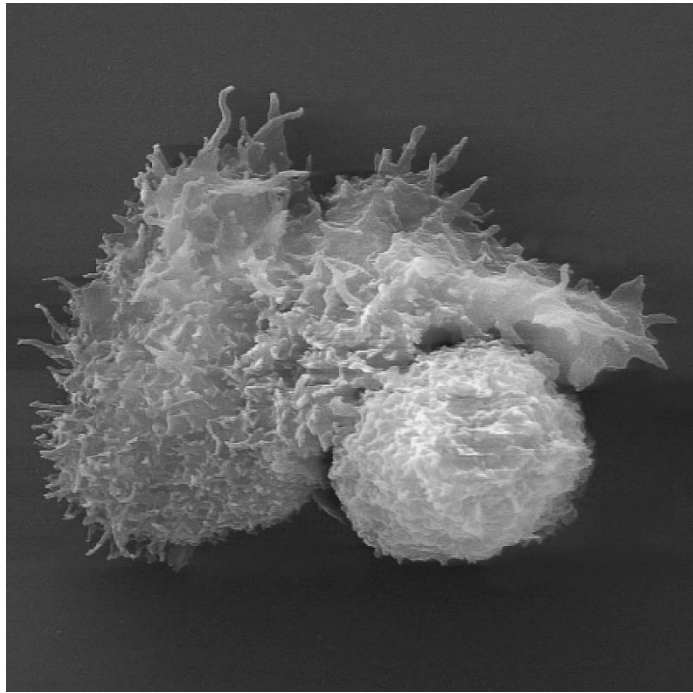
# ÍNDICE

<b>Capítulo 1: El género <i>Acanthamoeba</i></b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPTER ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>OBJECTIVES</b> .....	<b>4</b>
<b>1. EL GÉNERO ACANTHAMOEBA</b> .....	<b>5</b>
1.1. Ciclo biológico.....	6
1.2. Morfología de <i>Acanthamoeba</i> spp: trofozoítos y quistes .....	7
1.3. Taxonomía .....	6
<b>2. ACANTHAMOEBA SPP: PARÁSITO OPORTUNISTA O PARÁSITO EN PROCESO DE ADAPTACIÓN</b> .....	<b>10</b>
2.1. Encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) .....	12
2.1.1. Curso clínico .....	12
2.1.2. Epidemiología .....	12
2.1.3. Diagnóstico .....	12
2.1.4. Tratamiento .....	14
2.2. Queratitis amebiana .....	15
2.2.1. Curso clínico .....	15
2.2.2. Epidemiología .....	15
2.2.3. Diagnóstico .....	17
2.2.4. Tratamiento .....	18
2.3. Amebiasis cutánea.....	19
2.3.1. Curso clínico .....	19
2.3.2. Epidemiología .....	19
2.3.3. Diagnóstico .....	19
2.3.4. Tratamiento .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>

<b>Capítulo 2: Aislamiento y cultivo de aislados de <i>Acanthamoeba</i></b> .....	<b>21</b>
<b>CHAPTER ABSTRACT</b> .....	<b>23</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1. Toma de muestras.....	30
3.2. Aislamiento de las cepas de amebianas.....	31
3.3. Cultivo de las cepas aisladas.....	34
3.4. Estudio del perfil respiratorio como sistema para el cribado de nuevos medios de cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	48
3.5. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen español.....	50
3.6. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen austríaco.....	54
3.7. Medios de enquistamiento.....	56
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
4.1. Toma de muestras.....	59
4.2. Aislamiento de las cepas de amebianas.....	60
4.3. Cultivo de las cepas aisladas.....	62
4.4. Estudio del perfil respiratorio como sistema para el cribado de nuevos medios de mantenimiento de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	63
4.5. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen español.....	68
4.6. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen austríaco.....	74
4.7. Medios de enquistamiento.....	75
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>

<b>Capítulo 3: Identificación molecular y caracterización biológica de aislados clínicos y ambientales de <i>Acanthamoeba</i> spp.</b> .....	<b>79</b>
<b>CHAPTER ABSTRACT</b> .....	<b>81</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>84</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>95</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>96</b>
3.1. Caracterización morfológica de las cepas de <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	96
3.2. Determinación del genotipo de los aislados .....	99
3.3. Evaluación de los factores de patogenicidad indirectos .....	103
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>110</b>
4.1. Caracterización morfológica de las cepas de <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	110
4.2. Determinación del genotipo de los aislados .....	114
4.3. Evaluación de los factores de patogenicidad indirectos .....	116
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>144</b>

<b>Capítulo 4: Tratamiento <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Acanthamoeba</i> spp.</b> .....	<b>145</b>
<b>CHAPTER ABSTRACT</b> .....	<b>147</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>149</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>155</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>156</b>
3.1. Clorhexidina digluconato.....	156
3.2. Dimetilsulfóxido y aceite del árbol de té.....	158
3.3. Nanopartículas, dendrones y dendrímeros.....	161
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>167</b>
4.1. Clorhexidina digluconato.....	167
4.2. Dimetilsulfóxido y aceite del árbol de té.....	168
4.3. Nanopartículas, dendrones y dendrímeros.....	176
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>190</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>191</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>227</b>



# Capítulo 1: El género *Acanthamoeba*





## CHAPTER ABSTRACT

The genus *Acanthamoeba* belongs to free-living amoebae group (FLA). These organisms usually reside in the soil feeding on microorganisms, albeit they may be sometimes opportunistic parasites of vertebrates and humans as well (Page, 1998).

These amoebas have been isolated from a variety of anthropogenic and natural environments, such as water deposits, cooling towers, dialysis equipment, lakes, rivers, soils, among others (De Jonckheere, 1991; Szénási et al., 1998; Barbeau and Buhler, 2001; Khan, 2006; Todd et al., 2015). In addition, they have been isolated from humans' samples, sometimes causing damages in body tissues and others acting just as commensals (De Jonckheere and Michel, 1988; Sadaka and Emam, 2001; Steinberg et al., 2002; Schuster and Visvesvara, 2004; Dickson et al., 2009).

The life cycle of *Acanthamoeba* is direct and shows only two stages: trophozoite and cyst (**Figura 1.2**). The trophozoite (vegetative phase) is the active form, while the cyst is the resistant form. When environmental conditions become adverse for survival, amoeba starts to encyst. If external conditions are adequate, a new trophozoite emerges from the cyst (Khan, 2006).

The size of these protozoa ranges from 15 - 35  $\mu\text{m}$  for trophozoites and 10 - 20  $\mu\text{m}$  for cysts, depending on the species or genotypes of *Acanthamoeba*. An outstanding morphologic feature of the trophozoite in this genus is the presence of acanthopods (very fine pseudopods). Apart of this trait, trophozoites show the standard organelles found in most unicellular organisms and higher eukaryotic cells (Rondanelli et al., 1987). On the other hand, the cyst stage shows a double wall, that may be wrinkled or not. Cysts present spherical or polygonal aspect depending on genotype. Usually, the resistance stage shows ostioles (excystation pores), that are used as way out by trophozoites during the excystation process (Khan, 2006).

The taxonomy of the genus *Acanthamoeba* is controversial. Differential morphological features were formerly based on cyst structure (Pussard and Pons, 1977), but now the trend is to rely on genetic data (sequence of the small ribosomal subunit gene), which seem to be much more reliable to assess phylogenetic relationships. The classic binomial nomenclature is still applied within the genus, but it is considered problematic; hence, up to 20 genetic groups (genotypes T1 to T20) have been proposed as an alternative (Schroeder et al., 2001; Corsaro and Venditti, 2010 and Fuerst et al., 2015).

Some *Acanthamoeba* strains or isolates can be the etiological agents of two diseases: granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and *Acanthamoeba* keratitis (AK). Moreover, they can cause skin infections and, less frequently, disseminated infections, that most times are linked to cases of GAE (Król-Turmińska and Olender, 2017) (**Figura 1.4**).

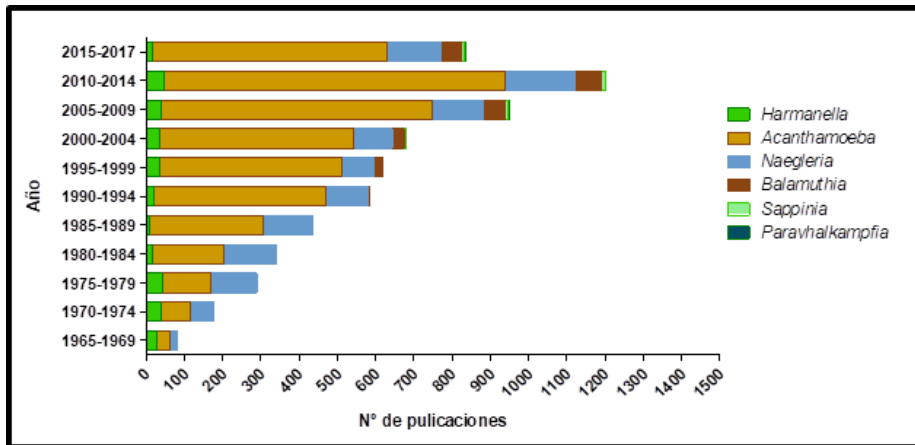
## OBJECTIVES

The aims of this PhD thesis are the following:

1. The design of new universal culture media for *Acanthamoeba* spp. based on the use of some alternative (and at the same time economical) ingredients (Chapter 2).
2. The design of new and fast encystment media, allowing to obtain greater number of cysts than classic media, and in a shorter period of time (Chapter 2).
3. The isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. from clinical and environmental samples (Chapter 3).
4. The comparison of diverse pathogenicity factors among clinical, environmental and culture type collection amoebic strains (Chapter 3).
5. To analyze the effectiveness of the tea tree oil and dimethyl sulfoxide against *Acanthamoeba* trophozoites/cysts, as well as their toxicity on human cell lines (Chapter 4).
6. To search for dendrimers and nanoparticles effective against *Acanthamoeba* trophozoites, and if possible, showing low toxicity against human cell lines (Chapter 4).

## 1. EL GÉNERO *ACANTHAMOEBA*

El género *Acanthamoeba* está incluido en el reino Protistas o Protoctistas según la clasificación de Woese (1977) basada en el análisis de los genes ARNr 16S o 18S, aunque recientemente se ha revisado esta clasificación y se encuadra en el dominio Eucariota (Adl et al., 2012). A este género se le conoce por formar parte del grupo de las amebas de vida libre (AVL), las cuales son parásitos oportunistas (o patógenos oportunistas). Por esta última característica, también se las denomina amebas anfitriónicas (Page, 1988). Algunos de los géneros que constituyen el grupo de las AVL que tienen implicaciones en la salud humana son: *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* y *Parvahalkampfia* (Visvesvara et al., 2007; Visvesvara et al., 2009). En los últimos 50 años, el estudio de estos microorganismos ha aumentado con especial interés en el género *Acanthamoeba* dando lugar a un gran número de artículos en revistas científicas (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Número de artículos científicos publicados de los géneros que componen el grupo de las amebas de vida libre (Información obtenida de Pubmed).

Las especies que constituyen el género *Acanthamoeba*, al ser tanto parásitos como amebas de vida libre, tienen una distribución cosmopolita y han sido aisladas tanto de ambientes naturales como antropogénicos. Algunos de los lugares antropogénicos donde se han aislado estas especies son depósitos de agua, agua mineral embotellada, torres de refrigeración, verduras, instrumentos quirúrgicos, lentes de contacto, unidades de diálisis, etc. (Barbeau y Buhler, 2001; Khan, 2006; Todd et al., 2015). Mientras que, en la naturaleza, se han aislado de muestras de agua de lagos, ríos y suelo (De Jonckheere, 1991; Szénási et al., 1998). También, se han aislado en humanos a partir de muestras de garganta, cavidades nasales e intestino, sin causar daños en estas localizaciones. Sin embargo, cuando se han aislado de tejido cerebral, tejido pulmonar, lesiones cutáneas, corneas y líquido cerebroespinal, sí que se observaban lesiones (De Jonckheere y Michel, 1988; Sadaka y Emam, 2001; Steinberg et al., 2002; Schuster y Visvesvara, 2004; Dickson et al., 2009). Esta amplia distribución es debida a la capacidad del género para tolerar amplios rangos de pH, temperatura y salinidad, además, de ser capaz de enquistarse cuando dichas condiciones son desfavorables.

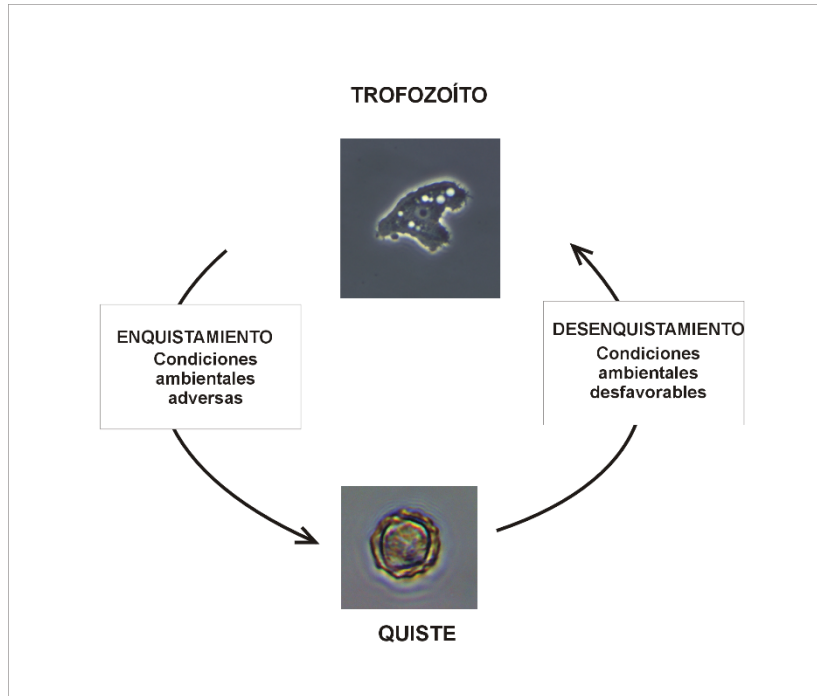
Debido a esta amplia distribución de *Acanthamoeba* spp., se ha detectado un elevado porcentaje de individuos inmunocompetentes que presentan anticuerpos frente a este protozoo, siendo una prueba de la gran exposición que se tiene al mismo (Cursons et al., 1980; Cerva, 1989).

En el medioambiente, las formas vegetativas se alimentan de bacterias, algas y levaduras mediante fagocitosis, mientras que en los trofozoítos cultivados *in vitro* se alimentan de los nutrientes líquidos mediante pinocitosis (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). En este género, también, aparece una forma especial de fagocitosis denominada “trogocitosis” (Kinnear, 2003). Además, en ocasiones se han observado en la superficie de la ameba unas estructuras parecidas a cráteres que permiten englobar en su interior partículas de mayor tamaño, estas estructuras se denominan “food-cups” o amebostomas (Díaz et al., 1991; Pettit et al., 1996). En ocasiones, las bacterias ingeridas son capaces de permanecer viables en el interior de la ameba estableciendo una relación simbiótica, siendo así la ameba, un reservorio de posibles bacterias patógenas (Siddiqui y Khan, 2013). Algunas de las bacterias que con más frecuencia se han aislado de dentro de *Acanthamoeba* spp. son: *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia* spp. *Vibrio cholerae*, *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* serotipo O157 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Barker y Brown, 1994; Greub y Raoult, 2004; Hadaś et al., 2004; Berger et al., 2006). Esta asociación no afecta a la patogenicidad de la ameba, sin embargo, las bacterias pueden adquirir una mayor virulencia, pérdida de susceptibilidad ante ciertos antibióticos o cambios estructurales (Cirillo et al., 1997; Barker et al., 1995; Hadaś et al., 2004).

A modo de resumen, podemos decir que el género *Acanthamoeba* está compuesto por protozoos que en el medio ambiente son reguladores de las poblaciones microbianas y pueden actuar como reservorio de bacterias patógenas. Debido a su gran ubiquidad pueden entrar en contacto con los seres humanos u otros animales, lo cual puede dar lugar a una parasitosis con patologías muy graves.

## 1.1. Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. es directo y consta de dos fases: trofozoíto y quiste (**Figura 1.2**). El trofozoíto es la forma vegetativa o activa e infecciosa, mientras que el quiste es la forma de resistencia que permite sobrevivir a la ameba cuando las condiciones en las que se encuentra son desfavorables. La forma vegetativa es en la cual la ameba se alimenta y se reproduce por división binaria, aunque algunos autores indican que también podrían presentar algún tipo de reproducción sexual debido a la gran poliploidía que muestran (Lahr et al., 2011; Maciver et al., 2016). Cuando las condiciones ambientales no son favorables, el trofozoíto comienza a enquistarse. Son numerosas las condiciones adversas que provocan el enquistamiento, como la ausencia de alimento, la reducción de la concentración de oxígeno, temperaturas extremas, cambios en la osmolaridad del ambiente, presencia de agentes químicos o desinfectantes (Byers et al., 1991; Khan, 2006). El enquistamiento es un proceso reversible, cuando las condiciones externas vuelven a ser favorables, un nuevo trofozoíto emerge del quiste.



**Figura 1.2.** Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. Trofozoito y quiste de *Acanthamoeba* spp. genotipo T4.

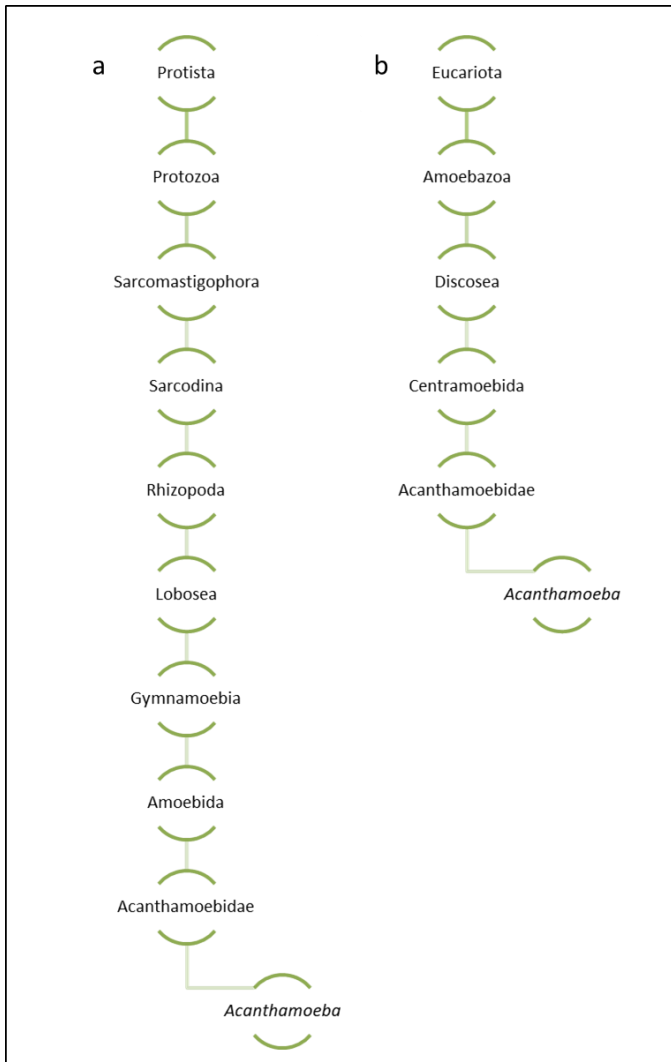
## 1.2. Morfología de *Acanthamoeba* spp.: trofozoítos y quistes

El tamaño de estos protozoos es de 15 - 35  $\mu\text{m}$  en el caso de los trofozoítos, que no tienen una forma definida, y de 10 - 20  $\mu\text{m}$  los quistes, que son esféricos, aunque estos tamaños varían según especie o genotipo. Una de las características más destacables de este género son los acantópodos presentes en el trofozoíto, que son unos pseudópodos muy finos. Los acantópodos permiten al trofozoíto desplazarse, adherirse a superficies y capturar alimento (Khan, 2006). A parte de esta peculiaridad, los trofozoítos presentan los orgánulos que tienen la mayoría de las células eucariotas: membrana celular externa, ribosomas, aparato de Golgi, retículo endoplasmático liso y rugoso, vacuolas, microtúbulos, mitocondrias, así como un núcleo con membrana nuclear y un nucléolo (Rondanelli et al., 1987). Sin embargo, presentan algunas diferencias, como, por ejemplo: las adhesinas de la membrana plasmática que permiten la adhesión a otras células o superficies, un elevado número de mitocondrias con un bajo número de crestas y además poseen una o varias vacuolas contráctiles (Khan, 2015).

Los quistes tienen un único núcleo y una doble pared celular que puede ser ondulada o lisa, la externa se denomina ectoquiste y la interna endoquiste. El endoquiste suele ser esférico, poligonal o estrellado, dependiendo del genotipo. El endoquiste y ectoquiste se unen en los ostiolos. Estos ostiolos se encuentran en la superficie y permiten al trofozoíto salir del quiste en el proceso de desenquistamiento (Khan, 2015).

### 1.3. Taxonomía

La taxonomía del género *Acanthamoeba* a nivel específico es polémica. En una primera clasificación de los eucariotas propuesta por Adl et al., (2005) se establecieron los nombres de los grupos y una síntesis de la estructura de la clasificación, eliminándose grupos polifiléticos, sin embargo, algunos grupos parafiléticos se mantuvieron. Posteriormente, Adl et al. (2012) realizaron una revisión de la clasificación, sobre todo de los protistas, basándose en los análisis filogenéticos de ARNr. De esta manera, la familia Acanthamoebidae paso de estar englobada en el grupo Amoebida al grupo Centramoebida debido a la reorganización de los grupos y eliminación de grupos parafiléticos (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** a. Clasificación parafilética del género *Acanthamoeba*. b. Clasificación monofilética del género *Acanthamoeba*.

Al principio, el nombre de especie (nombre binomial) se basó en diferencias morfológicas y se nombraban según el nombre del investigador que lo aisló, fuente de la que se había aislado y otros motivos que no estaban relacionados ni con características morfológicas que diferenciaban una especie de otra, ni por diferencias genéticas (Khan, 2015). En un intento por organizar las especies de este género, Pussard y Pons (1977) propusieron una clasificación basada en las características morfológicas de los quistes dividiendo al género en tres grupos basados en dos características muy evidentes: tamaño del quiste y el número de brazos del endoquiste. Siguiendo estas indicaciones, el género *Acanthamoeba* estaba formado por 18 especies diferentes, clasificándose:

- Grupo 1. Los quistes de este grupo presentan una separación entre el endoquiste y ectoquiste grande; si poseen menos de 6 brazos, su tamaño es mayor de 18  $\mu\text{m}$ ; si poseen de 6 a 10 brazos, el tamaño es mayor de 25,6  $\mu\text{m}$ ; si tienen de 12 a 14 brazos, su diámetro es mayor a 25  $\mu\text{m}$ .
- Grupo 2. Quistes con una pared externa rugosa, la interna puede ser globosa, ovoide o poligonal siendo el diámetro de los quistes menor de 18  $\mu\text{m}$ .
- Grupo 3. Quistes con las paredes separadas entre sí, la externa es lisa o ligeramente arrugada, mientras que la interna es redondeada y su tamaño es menor a 18  $\mu\text{m}$ .

Esta clasificación fue aceptada por muchos investigadores y se empezó a emplear en la literatura especializada (De Jonckheere, 1987; Page, 1988). Con ello, el número de especies de *Acanthamoeba* se incrementó (**Tabla 1.1**). Posteriormente, varios estudios demostraron que la morfología de los quistes de una misma especie variaba según la composición del medio (Sawyer, 1971; Stratford y Griffiths, 1978). Por lo tanto, esta clasificación no resultaba fiable, además, no permitía asociar la patogenia de una cepa con la especie dado que diferentes aislados de *A. castellanii* podían ser virulentas, poco virulentas o no virulentas. Con el descubrimiento de las técnicas moleculares (Mullis et al., 1987), se iniciaron nuevos intentos de clasificación de las especies de *Acanthamoeba*. Para ello se emplearon diversas técnicas: la “Random amplified polymorphic DNA” (RAPD), patrones de isoenzimas y la secuenciación más análisis filogenético de diferentes genes. Entre los últimos destacan los siguientes: el gen del 16S ARNr mitocondrial, citocromos, los espaciadores de la subunidad pequeña ribosomal (“Internal transcribed spacer” o ITS en inglés) y finalmente el gen 18S ARNr (Kong, 2009; Fuerst et al., 2015). Actualmente, la amplificación y análisis del gen 18S ARNr es la técnica que se emplea para clasificar este género dividiéndolo en 20 genotipos diferentes (T1 - T20). En el capítulo 2 se detallará esta clasificación.

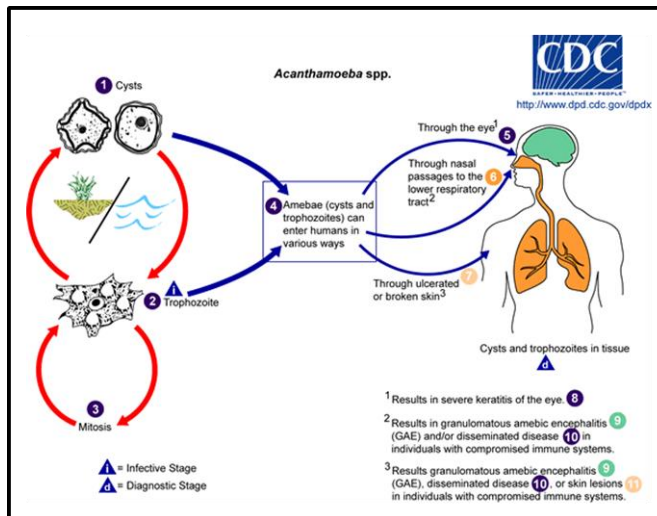
**Tabla 1.1.** Clasificación de las especies de *Acanthamoeba* según la clasificación de Pussard y Pons (1977).

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. divionensis</i>	<i>A. lenticulata</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. griffini</i>	<i>A. palestinensis</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. hatchetti</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. mauritaniensis</i>	
	<i>A. paradivionensis</i>	
	<i>A. polyphaga</i>	
	<i>A. quina</i>	
	<i>A. rhyssodes</i>	
	<i>A. triangularis</i>	



## 2. ACANTHAMOEBA SPP.: PARÁSITO OPORTUNISTA O PÁRASITO EN PROCESO DE ADAPTACIÓN

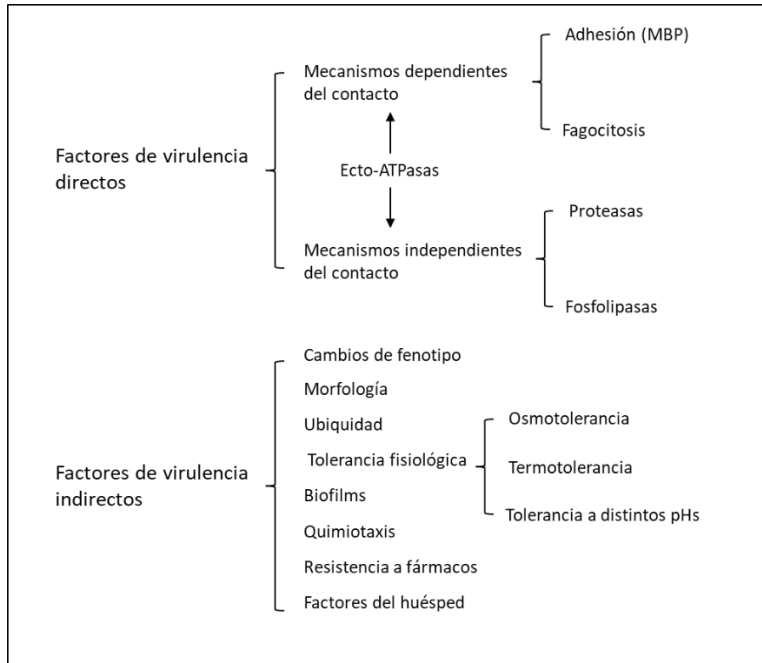
Algunas cepas o aislados de *Acanthamoeba* son capaces de causar patologías en los seres humanos siendo el agente etiológico de principalmente dos enfermedades: encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) y queratitis amebiana (QA). Además, es capaz de causar infecciones cutáneas y, con menor frecuencia, infecciones diseminadas que en la mayoría de los casos aparece junto la encefalitis granulomatosa (Król-Turmińska y Olender, 2017). Para poder causar estas infecciones es necesario que los trofozoítos o quistes entren en el hospedador. Sin embargo, los trofozoítos son la forma infectiva, existiendo tres posibles vías de entrada (**Figura 1.4**): los ojos, las vías respiratorias inferiores o superiores y lesiones de la piel.



**Figura 1.4.** Vías de entrada de *Acanthamoeba* spp. al ser humano y las patologías que causa según la vía de entrada (Imagen tomada del CDC, Atlanta, USA).

Según la vía de entrada, *Acanthamoeba* spp. causará una enfermedad u otra (como muestra la **Figura 1.4**). Si los trofozoítos penetran a través de la córnea, la enfermedad que podría desarrollar el hospedador sería una queratitis amebiana. En el caso de invadir el organismo por las vías respiratorias, pueden desencadenar una encefalitis granulomatosa y/o infección diseminada. Por último, si la entrada es a través de lesiones en la piel, puede causar infecciones cutáneas, encefalitis granulomatosa o infección diseminada. Cuando *Acanthamoeba* spp. invade el organismo mediante las dos últimas rutas, los individuos inmunosuprimidos son los que más probabilidad tiene de desarrollar alguna de las enfermedades descritas anteriormente, mientras que por la primera ruta desarrollan queratitis con una mayor probabilidad aquellas personas que son portadoras de lentes de contacto o presentan daños en la córnea. En la actualidad, se han descrito casos de pacientes con queratitis que ni eran usuarios de lentillas ni mostraban heridas o abrasiones corneales. También, se han descrito casos de encefalitis granulomatosa amebiana, infecciones diseminadas y cutáneas en personas inmunocompetentes (Galarza et al., 2009; Reddy et al., 2011).

La patogenia y patofisiología de *Acanthamoeba* aún no se comprende completamente. La capacidad de unirse a las células del huésped es el primer paso. Una vez que la ameba y la célula hospedadora están en contacto, la interacción desemboca en una serie de efectos, tales como la interferencia de las rutas de señalización intracelulares, fagocitosis y producción de toxinas, lo que provocan la muerte de la célula hospedadora. Otros factores que permiten que esta ameba pueda ser patógena, son los que la permiten sobrevivir en el medio ambiente bajo diversas condiciones. A estas características se las denomina factores de virulencia indirectos (**Figura 1.5**) (Khan, 2015).



**Figura 1.5.** Factores de virulencia directos e indirectos que contribuyen en la patogenia de *Acanthamoeba* spp. (Esquema tomado de Khan, 2015, traducido por Martín-Pérez).

## 2.1. Encefalitis granulomatosa amebiana (EGA)

La encefalitis granulomatosa amebiana es una enfermedad rara que en la mayoría de los casos acaba con la vida del paciente. En las autopsias se observan edemas y hemorragias necróticas con una irritación severa de las meninges y encefalitis. Al observar las biopsias al microscopio, normalmente se observan los quistes en los espacios perivasculares del parénquima, indicando este hecho, que los capilares cerebrales son la vía de entrada al sistema nervioso (Khan, 2015).

### 2.1.1. Curso clínico

Los síntomas clínicos son parecidos a los de una meningitis vírica o bacteriana: dolor de cabeza, fiebre, cambios de comportamiento, hemiparesis, letargia, rigidez de cuello, afasia, ataxia, vómitos, náuseas, aumento de la presión intracraneal. Estos síntomas son debidos a las lesiones necróticas hemorrágicas (Khan, 2015).

### 2.1.2. Epidemiología

La epidemiología de EGA no está clara dado que es una infección secundaria y su diagnóstico es difícil. Khan (2015) propone que el número de casos de pacientes con VIH/SIDA con encefalitis debida a *Acanthamoeba* puede indicar el número aproximado de casos de esta infección. Sin embargo, también se han descritos casos de EGA en pacientes con otras enfermedades como tuberculosis, leucemia, diabetes, hepatitis, linfoma de Hodgkins, lupus... (Feingold et al., 1998; Martínez et al., 2000; Petry et al., 2006; Aichelburg et al., 2008; Maritschnegg et al., 2011; Castillo et al., 2012). Además, de a personas a las cuales se las han realizado un trasplante de órganos (Fung et al., 2008; Permán et al., 2008), y personas inmunocompetentes (Hamide et al., 2002; Reddy et al., 2011; Walochnik et al., 2014). A continuación (**Tabla 1.2**) se muestran los casos descritos de EGA y el genotipo que lo causo (en los casos con los que se identificó el genotipo) publicados en revistas de acceso libre.

### 2.1.3. Diagnóstico

Debido a lo poco común que es la EGA y a que los síntomas son comunes con otras patologías del sistema nervioso central (SNC), la determinación de su etiología es problemática. El diagnóstico puede realizarse a partir de las imágenes obtenidas por resonancia magnética, entre otras, dado que *Acanthamoeba* provoca lesiones en los lóbulos temporal y parietal. Sin embargo, pacientes inmunocomprometidos no muestran este tipo de lesiones (Martínez y Janitschke, 1985; Martínez, 1991; Martínez y Visvesvara, 1997). También, se puede estudiar la presencia de trofozoítos en el líquido cefalorraquídeo o cultivar este líquido en placas de agar para una mejor observación de los mismos, dado que en las preparaciones en fresco estos pueden ser confundidos con macrófagos. A partir del líquido cefalorraquídeo se puede realizar una PCR específica para *Acanthamoeba*. Otra técnica muy empleada es la inmunofluorescencia indirecta, que puede realizarse a partir del suero del paciente o de biopsias en los casos de pacientes inmunosuprimidos, ya que existe un bajo nivel de anticuerpos en suero (Khan, 2015).

**Tabla 1.2.** Revisión bibliográfica de los casos descritos de EGA publicados en revistas de acceso libre.

REFERENCIA	PAÍS	NÚMERO DE CASOS	GENOTIPOS
Bhagwandeem et al., (1974)	Zambia	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Jones et al., (1975)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Ringsted et al., (1976)	Korea del Sur	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Grunnet et al., (1981)	Desconocido	1	<i>A. castellanii</i>
Lalitha et al., (1985)	India	1	<i>A. culbertsoni</i>
Ofori-Kwakye et al., (1986)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Wiley et al., (1987)	EEUU	1	<i>A. culbertsoni</i>
Lahiri et al., (1991)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Di Gregorio et al., (1992)	Italia	1	<i>A. divionensis</i>
Gordon et al., (1992)	EEUU	3	<i>A. castellanii</i> , <i>A. polyphaga</i> y <i>Acanthamoeba</i> sp.
Sharma et al., (1993)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Sangruchi et al., (1994)	Tailandia	2	<i>A. castellanii</i> y <i>A. healyi</i>
Martinez et al., (1997)	Desconocido	3	<i>Acanthamoeba</i> sp, <i>A. culbertsoni</i> y <i>A. castellanii</i>
Feingold et al., (1998)	EEUU	1	<i>A. culbertsoni</i>
Martinez et al., (2000)	España	1	<i>A. castellanii</i>
Singhal et al., (2001)	India	2	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Hamide et al., (2002)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Castellano-Sanchez et al., (2003)	EEUU	1	<i>A. castellanii</i>
Ndiaye et al., (2005)	Senegal	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Mckellar et al., (2006)	EEUU		<i>Acanthamoeba</i> sp. T1
Petry et al., (2006)	Alemania	1	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4
Meersseman et al., (2007)	Bélgica	1	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4
Aichelburg et al., (2008)	Austria	1	<i>Acanthamoeba</i> sp. T2
Fung et al., (2008)	Reino Unido	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Kaushal et al., (2008)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Pemán et al., (2008)	España	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Ranjan et al., (2009)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Saxena et al., (2009)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Sheng et al., (2009)	Taiwam	1	<i>A. castellanii</i>
Lackner et al., (2010)	Austria	1	<i>A. lenticulata</i> T5
Maritschnegg et al., (2011)	Austria	1	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4
Mayer et al., (2011)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Reddy et al., (2011)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Castillo et al., (2012)	Desconocido	1	<i>Acanthamoeba</i> sp
Pietrucha-Dilanchian et al., (2012)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Webster et al., (2012)	Canadá	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Chandra et al., (2014)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Khanna et al., (2014)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Tan et al., (2014)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i>
Walochnik et al., (2014)	Austria	3	<i>Acanthamoeba</i> sp. T2, T5 y T4
Zamora et al., (2014)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Doan et al., (2015)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.

REFERENCIA	PAÍS	NÚMERO DE CASOS	GENOTIPOS
Salameh et al., (2015)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Das et al., (2016)	India	7	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Behera et al., (2016a)	India	6	<i>Acanthamoeba</i> sp. T6
Epperla et al., (2016)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Thamtam et al., (2016)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Zhang et al., (2016)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Wara-Asawapati et al., (2017)	Tailandia	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Geith et al., (2018)	Alemania	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Megha et al., (2018)	India	5	2 T4 / 1 T10 / 2 T11
Nampoothiri et al., (2018)	India	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Sütçü et al., (2018)	Turquía	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.
Voshtina et al., (2018)	EEUU	1	<i>Acanthamoeba</i> sp.

#### 2.1.4. Tratamiento

No hay un tratamiento recomendado para EGA y, además, la mayoría de los casos identificados son *post-mortem*. Por desgracia, la baja eficacia de bastantes agentes anti-amebianos, por su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, hace que el tratamiento sea muy difícil. Los compuestos terapéuticos que actualmente se utilizan son una combinación de quetoconazol, fluconazol, sulfadizina, pentamidina isotionato, anfotericina B, azitromicina, itraconazol o rifampicina. Estos compuestos pueden ser eficaces, pero tienen graves efectos secundarios (Khan, 2015).

## 2.2. Queratitis amebiana

La queratitis es aquella condición en la cual la córnea se inflama. La queratitis amebiana se caracteriza por un intenso dolor y normalmente sólo afecta a un ojo. Los casos de queratitis bilateral se dan únicamente cuando el paciente se infecta los dos ojos a la vez; la transferencia de la infección de un ojo al otro no ha sido comunicada en la literatura (Khan, 2015).

### 2.2.1. Curso clínico

Los síntomas causados por la infección de *Acanthamoeba* son diversos, muchos son inespecíficos, pero los más comunes son fotofobia, dolor ocular, lagrimación, irritación, aparición de un anillo corneal, visión borrosa, etc. (Sengor et al., 2017). En casos extremos, cuando el tratamiento no ha funcionado, los pacientes pierden totalmente la visión y en algunos casos la enucleación es necesaria (Page y Mathers, 2013). El período de incubación es variable, depende de la carga inicial de amebas en la córnea y de otros factores. De hecho, el inicio de la enfermedad es más rápido cuando hay un trauma en la córnea que en las infecciones desarrolladas por el uso de lentillas (García y Bruckner, 1993).

### 2.2.2. Epidemiología

La frecuencia de la queratitis amebiana es variable, desde 0,13 a 3 casos por millón de personas (en países desarrollados). Sin embargo, la prevalencia de QA en portadores de lentes de contacto es mayor, entre 17 a 21 casos por millón (Radford et al., 2002; Walochnik et al., 2014). Por tanto, el uso de lentillas es claramente un factor de riesgo. Cualquier tipo de lentes de contacto puede favorecer la infección debido a que su uso induce cambios en la córnea (sequedad de ojo, hipoxia e hipercapnia). Estas alteraciones provocan una descamación exacerbada de las células epiteliales lo cual facilita la entrada de las amebas y/o bacterias. Normalmente, el uso de lentes de contacto es seguro cuando las medidas higiénicas adoptadas son las adecuadas. Sólo los usuarios con malos hábitos higiénicos están en riesgo (Lindsay et al., 2007). Los problemas se incrementan cuando se usan lentillas de baja calidad, uso de portalentillas durante tiempos prolongados, usar líquido para lentillas durante mucho tiempo o caducado, el uso de productos no recomendados para la limpieza de las lentes de contacto o el uso de agua del grifo (Stapleton et al., 2008; Carnt y Stapleton, 2016; Zimmermann et al., 2016). Aunque en la actualidad, también se han identificado casos de pacientes que no son usuarios de lentes de contacto (Walochnik et al., 2014; Martín-Pérez et al., 2017). A continuación, se muestra (**Tabla 1.3**) una revisión bibliográfica de los casos de QA en los que se ha identificado el genotipo en los últimos 16 años en revistas de acceso libre.

**Tabla 1.3.** Revisión bibliográfica de casos de QA identificados en los últimos 16 años publicados en revistas de acceso libre.

REFERENCIA	PAÍS	NÚMERO SECUENCIAS	GENOTIPOS
De Jonckheere (2003)	Bélgica	15	T4
Sharma et al., (2004)	India	14	T4
Zhang et al., (2004)	China	18	17 T4 / 1 T3
Maghsood et al., (2005)	Irán y Reino Unido	13 + 6	13 T4 / 3 T3 / 3 T1
Spanakos et al., (2006)	Grecia	5	5 T4 / 1 T5
Yera et al., (2006)	Francia	10	7 T4 / 1 T3 / 1 T2+T6 / 1 T11
Ertabaklar et al., (2007)	Turquía	1	T4
Ozkoc et al., (2008)	Turquía	2	T4 / <i>Paravahlkampfia</i>
Yera et al., (2008)	Francia	10	T4
Di Cave et al., (2009)	Italia	14	11 T4 / 3 T15
Booton et al., (2009)	EE. UU.	15	13 T4 / 2 T3
Ledee et al., (2009)	EE. UU.	37	36 T4 / 1 T5
Niyyati et al., (2009)	Irán	15	14 T4 / 1 T4+T11
Ertabaklar et al., (2009)	Turquía	1	T4
Gatti et al., (2010)	Italia	16	T4
Iovieno et al., (2010)	EE. UU.	1	T5
Abe y Kimata (2010)	Japón	7	T4
Zhao et al., (2010)	China	14	T4
Sharifi et al., (2010)	Suecia	13	10 T4 / 1 T3 / 1 T5 / 1 T15
Niyyati et al., (2010)	Irán	1	T3 + <i>Vahlkampfia</i>
Nagyová et al., (2010)	Eslovaquia	5	3 T4 / 1 T3 / 1 T15
Lorenzo-Morales et al., (2011)	España	1	T11
Prashanth et al., (2011)	India	15	T4
Dendana et al., (2013)	Túnez	5	T4
Duarte et al., (2013)	Brasil	4	T4
Risler et al., (2013)	Francia	20	16 T4 / 1 T2 / 2 T3 / 1 T5
Rahman et al., (2013)	Japón	27	23 T4 / 3 T3 / 1 T5
Grün et al., (2014)	Alemania	1	T13
Di Cave et al., (2014)	Italia	55	33 T4 / 11 T3 / 10 T5 / 1 T11
Buerano et al., (2014)	Filipinas	1	T4
González-Robles et al., (2014)	España	1	T3
Arnalich-Montiel et al., (2014)	España	17	14 T4 / 2 T3 / 1 T11 2 coinfecciones con <i>Vahlkampfia</i>
Derda et al., (2015)	Polonia	8	T4
Chomicz et al., (2015)	Polonia	22	T4
Heredero-Bermejo et al., (2015)	España	1	T3
Behera et al., (2016b)	India	18	16 T4 / 2 T10
Wagner et al., (2016)	Venezuela	18	T4
Orosz et al., (2016)	Hungría	7	T4
Hajjalilo et al., (2016)	Irán	18	15 T4 / 1 T9 / 2 T11

REFERENCIA	PAÍS	NÚMERO SECUENCIAS	GENOTIPOS
Omaña-Molina et al., (2016)	México	2	1 T4 / 1 T3
Casero et al., (2017)	Argentina	10	T4
Martín-Pérez et al., (2017)	España	5	4 T4 / 1 T3
Padzik et al., (2017)	Polonia	7	T4
Alves et al., (2018)	Brasil	1	T4
Buchele et al., (2018)	Brasil	1	T4
Fabres et al., (2018)	Brasil	1	T4
Orosz et al., (2018)	Hungría	1	T8
Baltaza et al., (2019)	Polonia	1	T4-
ChaoJiang et al., (2019)	China	9	7 T4 / 1 T3 / 1 T11
Jercic et al., (2019)	Chile	76	73 T4 / 1 T2 / 2 T11
Omaña-Molina et al., (2019)	México	1	T4
Orosz et al., (2019)	Hungría	7	6 T4 / 1 T8

### 2.2.3. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de QA es difícil debido a que los síntomas y signos son muy parecidos a los de virus del herpes simplex, *Pseudomona aeruginosa* e infecciones fúngicas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Estudios recientes han confirmado que el uso de microscopía confocal *in vivo* es una herramienta de diagnóstico rápida, fiable y con una alta sensibilidad en pacientes con una queratitis avanzada (Vaddavalli et al., 2011; Kanavi et al., 2012). Sin embargo, este tipo de diagnóstico requiere que los examinadores estén familiarizados en las características morfológicas de *Acanthamoeba* spp. El diagnóstico directo y que confirma la presencia de este patógeno es mediante el aislamiento, el cual se realiza a través del cultivo de muestras tales como lentillas y raspado corneal en placas de agar cubiertas con *Escherichia coli* muerto (Kilvington et al., 1990; Hay et al., 1995). Estos cultivos se observan al microscopio óptico y permiten la caracterización a nivel de género. El diagnóstico también se puede realizar por identificación molecular a través de PCR (Schroeder et al., 2001) o PCR a tiempo real (RT-PCR) (Qvarnstrom et al., 2006). También, se pueden emplear técnicas basadas en la detección de anticuerpos tales como la inmunofluorescencia indirecta. En este método se emplean anticuerpos específicos contra *Acanthamoeba* spp. Por este motivo, se trata de una técnica poco económica y puede llevar meses aislar anticuerpos (Khan, 2015).

Más recientemente, se ha propuesto el uso del método MALDI-TOF-MS. El sistema está basado en la separación de biomoléculas debido al ratio masa:carga, obteniéndose un patrón o “fingerprint” de las proteínas. Así pues, se puede utilizar una muestra control (en la cual hay *Acanthamoeba* spp.) para compararla con el patrón de una muestra sometida a diagnóstico (Del Chierico et al., 2016).

Sin embargo, de entre todas las técnicas mencionadas anteriormente, las más empleadas son el cultivo y la PCR.



#### 2.2.4. Tratamiento

La mayor causa de fallo en el tratamiento de la queratitis amebiana es la existencia de la forma de resistencia de la ameba (quistes). La pared del quiste es más resistente a la mayoría de los fármacos que se emplean en la actualidad. Por este motivo, el tratamiento de esta infección es problemático (Khan, 2015; Siddiqui et al., 2016a, b). Los productos empleados para el tratamiento local son preferiblemente biguanidas (polihexametil biguanida -PHMB- y chlorhexidina) o diamidinas (propamidina y hexamidina). Los dos tipos de fármacos tienen el mismo modo de actuación, dañando la membrana celular. Dado a su eficacia en el tratamiento, muchos productos comerciales de limpieza de lentillas contienen PHB. Sin embargo, en ocasiones, no tienen actividad contra *Acanthamoeba* (Moon et al., 2016; Tzanetou et al., 2006; Costa de Aguiar et al., 2013; Ustunturk y Zeybek, 2014; Siddiqui et al., 2015). En otros estudios, las soluciones de limpieza sí que han sido eficaces contra *Acanthamoeba* spp. (Shoff et al., 2008; Kilvington y Lonnen, 2009). Debido a esto, se están desarrollando nuevos productos para incrementar la protección de los usuarios de lentes de contacto. De ahí, que se hayan probado un elevado número de compuestos químicos y naturales. Los avances más recientes en este campo parecen indicar que los dendrímeros catiónicos (Heredero-Bermejo et al., 2015, 2016, 2018) y el aceite del árbol del té (Hadaś et al., 2017) pueden ser útiles como profilaxis o quimioterapia contra la queratitis.

La administración vía oral de compuestos como el voriconazol ha sido efectiva en algunos casos (Tu et al., 2010; Gupta et al., 2011; Arnalich-Montiel et al., 2012), pero es una terapia larga y no siempre conlleva buenos resultados.

## 2.3. Amebiasis cutánea

### 2.3.1. Curso clínico

La amebiasis cutánea se caracteriza por la presencia de nódulos eritromatosos o úlceras en la piel. La primera manifestación de esta enfermedad es la aparición de papulo-nódulos que drenan material purulento y que se transforman en úlceras que no se curan (Helton et al., 1993; Murakawa et al., 1995; Chandrasekar et al., 1997).

### 2.3.2. Epidemiología

Las infecciones cutáneas causadas por *Acanthamoeba* son más comunes en pacientes con SIDA, con o sin infecciones en el SNC. También hay casos en los que se ha desarrollado en pacientes inmunosuprimidos (bien naturalmente o bajo terapia inmunosupresora) que padecen una encefalitis amebiana pero no están infectados por VIH (Slater et al., 1994; Duluol et al., 1996; Casper et al., 1999). Se desconoce si las lesiones cutáneas son el foco primario de la infección o si son el resultado de la diseminación vía sanguínea desde otras ubicaciones tales como el tracto respiratorio o el SNC (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). A diferencia de la EGA y la QA, no se ha realizado una revisión de los casos descritos y el genotipo al que pertenecen los aislados dado que los casos descritos en la literatura, los pacientes no manifiestan amebiasis cutánea únicamente, sino que va relacionada con EGA.

### 2.3.3. Diagnóstico

Las muestras obtenidas a partir de las lesiones cutáneas se pueden cultivar en placas de agar cubiertas de la bacteria *E. coli* muerta. También se pueden realizar estudios histológicos a partir de las biopsias de las lesiones. Además, se puede hacer diagnóstico molecular mediante RFLP y PCR (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

### 2.3.4. Tratamiento

Actualmente no hay pautas en el tratamiento de esta infección. Los pacientes con amebiasis cutánea han sido tratados con muy diversos fármacos. Helton et al., (1993) realizó con éxito un tratamiento en un paciente que también padecía SIDA usando 5-fluorocitosina. Otros autores han descrito tratamientos con pentamidina, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, metrodinazol y anfotericina B, siendo estos compuestos ineficaces frente a la infección (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

### 3. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral son:

1. Diseño de medios de cultivos universales para *Acanthamoeba* spp. basados en nuevos ingredientes (a ser posible más económicos que los actualmente empleados) para trofozoítos y quistes del género *Acanthamoeba* (Capítulo 2).
2. Diseño de medios de enquistamiento que permitan obtener un mayor número de quistes de *Acanthamoeba* en el menor tiempo posible (Capítulo 2).
3. Aislamiento y caracterización molecular de *Acanthamoeba* spp., procedentes de muestras clínicas y ambientales (Capítulo 3).
4. Comparación de los factores de patogenicidad presentes en diversas cepas de *Acanthamoeba*, aisladas de muestras clínicas, ambientales y también de cepas provenientes de las colecciones de cultivo tipo (Capítulo 3).
5. Análisis de la efectividad del aceite del árbol de té y dimetilsulfóxido frente a trofozoítos/quistes de *Acanthamoeba*, así como su toxicidad en líneas celulares humanas (Capítulo 4).
6. Búsqueda de dendrímeros y nanopartículas eficaces frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* y con baja toxicidad frente a líneas celulares humanas (Capítulo 4).



## Capítulo 2: Aislamiento y cultivo de aislados de *Acanthamoeba*



## CHAPTER ABSTRACT

**Introduction:** The culture of *Acanthamoeba* spp. may be performed under xenic (bacteria are used as nutrients) or axenic (the nutrient sources are sugars and proteins) conditions (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). The former (axenic) are usually liquid and can be defined or undefined. Among them, the most used medium is PYG, a non-defined media, basically containing peptone, yeast extract and glucose (Jensen et al., 1970). During the last years, most clinical strains have been successfully cultivated in that medium. However, some strains require more nutrients to grow, like fetal bovine serum (FBS) (Chan et al., 2011; Lakhundi et al., 2014), mannitol (Costa et al., 2010) or bactocastone (Heredero-Bermejo et al., 2012). CERVA medium (Cerva, 1969) is composed of bactocastone and FBS and initially was designed to grow *Naegleria* species, albeit it has been successfully used to grow some *Acanthamoeba* strains as well (Heredero-Bermejo et al., 2015). In addition, some other culture media were successfully tested for amoebic growth (**Tabla 2.1**). Despite the availability of diverse culture media, the existence of some amoebic strains fastidious to grow has been reported (De Jonckheere, 1980; Hiti et al., 2001; Nagyová et al., 2010; Martín-Pérez et al., 2017). Such circumstance hampers the characterization of these strains and the ability of conducting drug sensitivity tests. Therefore, finding suitable universal growth media for *Acanthamoeba* species is required.

Drug sensitivity tests are also carried out with cysts since they are more resistant than trophozoites. The encystment occurs when some external conditions are unfavorable for subsistence, including temperature, pH or osmolarity changes, the presence of chemical compounds or lack of nutrients (Byers et al., 1980; Cordingley et al., 1996; Lee et al., 2012; Turner et al., 1997). Moreover, some media destined to obtain cysts have been designed by diverse authors (**Tabla 2.2**).

**Objectives:** The aim of this chapter is the isolation of *Acanthamoeba* strains from both clinical and environmental samples, as well as the design of new culture and encystment media.

**Materials and Methods:** During the years 2013 and 2015, patients' samples (contact lens, contact lens solutions or corneal scrap) were received in the Parasitology Service of the Instituto de Salud Pública Carlos III (ISCIII). These samples were inoculated into agar plates seeded with heat-killed *E. coli*. Furthermore, water samples were collected from different locations in three water dams in Castilla la Mancha (El Vicario, Presa Verde and Pareja). These water samples were obtained during the four seasons of the year 2016. The aim of such sampling schedule was to study the temporal evolution of natural amoeba populations (**Figura 2.1**). To isolate free-living amoebae, the water sample was filtered, and the filter was placed in agar plates with heat-killed *E. coli*.

When amoebic growth was observed, the trophozoites or cysts obtained were transferred to another agar plate to eliminate bacteria, yeast and fungus, and subsequently incubated at 25, 32 and 37 °C for determination the optimal temperature growth. Once, the optimal growth temperature was set and the contaminant flora was eliminated, the strains were cloned.

The cloned populations were seed in two axenic media, namely PYG supplemented with 2 % bactocastone and CERVA. In the cases where the isolates didn't grow in either of these media, some commercial media were tested: Brain Heart Infusion (BHI), Nutrient Mixture F-10 (HAM),

Grace's Insect Medium, Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) and Tryptic Soy Broth (TSB). Moreover, 80 culture media were empirically designed. These were based on economical ingredients that could be found in local supermarkets (Mercadona, Alcampo and Billa). Some of the new proposed ingredients with positive performance in culture were the following: lactose-free milk, egg yolk, diverse meat broths, fish broth, *Spirulina* and *Fucus* capsules. More details on media composition can be found in tables **Tabla 2.6 to 2.9**.

Evaluation of amoebic growth for the assayed amoeba strains was done based on both respiratory profiles (**Figura 2.2**) and microscopic observations. To accurately evaluate these experiments, the respiratory profile of one amoebic strain (selected as model system) was determined by oxygen sensitive microplates (OCR microplates), both under optimal and suboptimal growth conditions. In this way, possible correlation between growth and respiratory profiles could be eventually established. Once this information was available, only favorable media (according OCR data) would be selected for further assays with other amoebic isolates, thus avoiding cumbersome counting work.

Finally, encystment media based in soil extract from rhodic-chromic luvisol soil samples (obtained in a *Quercus coccifera* stand near to our laboratory and *Quercus petraea* stand in a Viennese park) were tested in 4 *Acanthamoeba* strains and compared with Neff medium.

**Results:** Amoeba was present in more than 80 % of the clinical samples (5 out of 6 strains) were able to grow in standard media, while only 9.6 % (5/52) of the environmental samples were positive for amoebic growth (**Tabla 2.13** and **Figura 2.4**). All of the isolates grew in either PYG or CERVA, or even both, except the clinical isolate ISCIII-UAH 66/14 (**Tabla 2.14**). Some respiratory profiles (RP or PR in Spanish) were obtained in the model strain (namely, numbers 1, 2 and 3) were correlated with optimal growth and 100 % of viable trophozoites (**Figura 2.5**, **Figura 2.6** and **Figura 2.10**). The rest of PRs were associated with poor amoebic growth (**Figura 2.7**, **Figura 2.8**, **Figura 2.9** and **Figura 2.11**). The PR observed in the alternative culture media designed in this Thesis work are showed in **Tabla 2.15**. The most promising media were 27, 30, 35, 39, 63, 69, 78, 79 and 80 (**Figura 2.13**). The media number 39 and 80 contained universally available ingredients and induced good amoebic growth; therefore, they were selected for further evaluation using all the amoebic strains maintained in the Parasitology laboratory of Universidad de Alcalá (UAH). All these strains (including a fastidious one, named ISCIII-UAH 66/14) grew well in both media (**Tabla 2.17** and **Figura 2.14**). Unfortunately, such good results were not obtained when these media were prepared with Austrian ingredients and tested in the strains belonging to the Molecular Parasitology laboratory of the Medical University of Vienna (**Tabla 2.18**).

The new encystment media for *Acanthamoeba* spp. assayed in the present Thesis (based on soil extracts) showed different encystment rate (**Figura 2.17**). In the majority of the cases presented a higher number of cyst than the Neff medium.

**Conclusions:**

1. In general, most environmental and clinic isolates grew well in the standard *Acanthamoeba* media, except one fastidious clinical isolate
2. It seems that there is no seasonality in the growth of the amoebic populations studied in the dams's samples. However, results are inconclusive due to the low number of positive samples found.
3. The amoebic respiratory profiles type 1 and 2 are related to a high number of viable trophozoites, as assessed by parallel manual counting assays.
4. Some of the new culture media (namely, 39 and 80), made of alternative ingredients, allowed to grow all the *Acanthamoeba* strains tested in Alcalá de Henares, including the fastidious clinic isolate was able to grow in the two new culture media (39 and 80).
5. Media 39 and 80 cannot be considered universal for *Acanthamoeba* since the number of experiments with other genotypes or species is limited. Problems found when growing Austrian strains indicates that alternative ingredients must be screened in each laboratory.
6. The new encystment media, based on soil extracts, showed higher or similar performance than the standard medium (Neff medium).



## 1. INTRODUCCIÓN

Los protozoos del género *Acanthamoeba* se han aislado de ambientes naturales y antropogénicos: depósitos de agua, piscinas, lagos, conductos de ventilación, suelo, entre otros muchos (De Jonckheere, 1991; Lorenzo-Morales et al., 2006; Todd et al., 2015). También se han aislado de muestras clínicas tales como raspados corneales, tejido cerebral, lesiones cutáneas y líquido cefalorraquídeo (Steinberg et al., 2002; Schuster y Visvesvara, 2004; Martín-Pérez et al., 2017). Además, se ha conseguido en casi todos los casos su cultivo y mantenimiento en el laboratorio.

El cultivo de *Acanthamoeba* spp. puede ser de dos tipos: 1) cultivos xénicos en los cuales se emplean bacterias como nutrientes ya que los trofozoítos se alimentan de bacterias, levaduras y otros microorganismos que puedan estar presentes en el medioambiente (Marciano-Cabral y Cabral, 2003); y 2) cultivos axénicos en los cuales no se emplean bacterias, sino que los medios tienen una composición definida o compleja.

En el caso de los cultivos xénicos, las bacterias (vivas o muertas) generalmente, se añaden a una placa de agar, habiéndose usado con este fin *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *Escherichia coli*, entre otras (Schuster, 2002).

Los medios axénicos para el cultivo de amebas de vida libre son líquidos y se puede clasificar en definidos y no definidos. El medio más empleado es el conocido como PYG, un medio no definido compuesto por peptona, extracto de levadura y glucosa en distintas proporciones (Jensen et al., 1970).

Los medios definidos se diseñaron para el crecimiento de ciertas especies de amebas que presentaban dificultades manifiestas para su crecimiento, así como para conocer los requerimientos nutricionales de este género (Schuster, 2002). Por ejemplo, el medio de Adam (1959) fue diseñado para el crecimiento de la cepa Neff, aunque también permite el crecimiento de otras cepas, este medio está compuesto por 18 aminoácidos, acetato como fuente de carbono y dos vitaminas (vitamina B12 y tiamina). Posteriormente, Band (1961) indicó que para el crecimiento óptimo se necesita biotina. Así pues, en 1962 (Band, 1962) formuló un nuevo medio que contenía 7 aminoácidos, glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono, vitamina B12, tiamina y biotina para el cultivo de *A. rhyodes*. Adam y Blewett (1967) estudiaron el crecimiento de distintas cepas de *A. castellanii* en función de la fuente de carbono (sucralosa, melibiosa, manitol y rafinosa). No obstante, todos estos medios solo permitían un crecimiento amebiano lento (Schuster, 2002). Por este motivo, Byers et al., (1980) diseñaron dos medios definidos denominados DGM-21A y DGM-21B que permitían un crecimiento rápido con mayor densidad final de trofozoítos que en los otros casos. Además, indicaron que la glucosa era necesaria para obtener un crecimiento rápido, mientras que el acetato tenía un mínimo efecto sobre la velocidad del mismo.

Weekers et al., (1996) emplearon fermentadores con aireación para potenciar el crecimiento de *A. castellanii* en PYG. Sin embargo, se observó que llegado a determinado punto los cultivos dejaban de crecer, sin que pudiera explicarse por un aumento de pH o la disminución de niveles de glucosa. Así pues, concluyeron que se debía a algún producto de excreción emitido por *Acanthamoeba*, como previamente había sugerido Pigon (1970).

En los últimos años, los aislados de muestras clínicas se han cultivado con éxito en el medio PYG, que en un principio fue diseñado para los aislados de origen ambiental. De Jonckheere (1980) propuso un medio de cultivo compuesto por caseína, glucosa y extracto de levadura incubado a 37 °C como indicador de virulencia. Sin embargo, algunas cepas necesitan medios más ricos, por lo que al medio PYG se le ha enriquecido con suero fetal bovino (SFB) (Chan et al., 2011; Lakhundi et al., 2014), con manitol (Costa et al., 2010) y con bactocasitona (Heredero-Bermejo et al., 2012). El medio CERVA (Cerva, 1969) compuesto por bactocasitona y SFB fue diseñado para el crecimiento de las especies del género *Naegleria*, aunque también permite el crecimiento de cepas de *Acanthamoeba* procedentes de muestras clínicas (Heredero-Bermejo et al., 2015). Otros medios de cultivo se han probado con éxito para el crecimiento de trofozoítos de *Acanthamoeba* (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Revisión de medios axénicos empleados con menor frecuencia para el crecimiento de *Acanthamoeba* spp.

REFERENCIA	ESPECIE DE <i>ACANTHAMOEBEA</i>	MEDIO DE CULTIVO
Ingalls y Brent (1983)	<i>A. polyphaga</i>	Medio definido
Shukla et al., (1989 y 1990)	<i>A. culbertsoni</i>	Medio definido
Buck y Rosenthal (1996)	<i>A. castellanii</i>	Medio neutralizante Dey-Engley
Penland y Wilhelmus, (1997)	Aislados clínicos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Tryptic Soy Agar (TSA)
Penland y Wilhelmus, (1998)	Aislados clínicos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Buffered charcoal-yeast extract agar
López et al., (2000)	Aislados patógenos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Medio Page
La Scola y Raoult (2001)	<i>A. castellanii</i>	Medio ATCC354 con 7 g/l de glucosa
Abd et al., (2003)	<i>A. castellanii</i>	Medio ATCC nº 712
Da Silva y da Rosa (2003)	<i>Acanthamoeba</i> spp.	Medio modificado Giazzi-Pavlova
Rahdar et al., (2012)	Aislados de <i>Acanthamoeba</i> spp. con un crecimiento fastidioso	Medio Keister TYI-S-33 modificado
Taneja et al., (2013)	Aislados patógenos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Brain-heart infusion (BHI) y caldo tioglicolato
Chomicz et al., (2014)	Aislados patógenos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Medio BSC
Kennedy et al., (2014)	Aislados ambientales de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Combinación del medio PYG y medio ATCC nº 712
Peretz et al., (2015)	Aislados de <i>Acanthamoeba</i> spp. con un crecimiento fastidioso	Medio Keister TYI-S-33 modificado

A pesar de existir bastantes medios de cultivo descritos para este género, en ocasiones se encuentran aislados que no crecen en los medios axénicos más habituales (De Jonckheere, 1980; Hiti et al., 2001; Nagyová et al., 2010; Martín-Pérez et al., 2017). El cultivo axénico es esencial para realizar estudios de cribado de fármacos y el estudio de los factores de patogenicidad indirectos. Por estos motivos, se siguen diseñando nuevos medios de cultivo, con la finalidad de encontrar, si es posible, un medio de cultivo universal para todos los genotipos del género.

Los ensayos de cribado de fármacos, no sólo se realizan con trofozoítos, sino también con quistes, ya que esta forma biológica más resistente, se encuentra habitualmente en la córnea de pacientes infectados por este parásito. Así pues, la búsqueda de medios que favorezcan el enquistamiento ha sido una línea nada desdeñable de investigación en este parásito. Byers et al., (1980) indicaron que el enquistamiento se induce cuando se omite la fuente de carbono. También, cuando las condiciones no son favorables tales como cambio en la temperatura ambiental, pH, osmolaridad, presencia de agentes químicos y toxinas, condiciones de anaerobiosis parciales (Cordingley et al., 1996; Lee et al., 2012; Turner et al., 1997). Se han diseñado algunos medios que favorecen el enquistamiento (**Tabla 2.2**).

**Tabla 2.2.** Revisión de medios de enquistamiento de *Acanthamoeba* spp.

REFERENCIA	MEDIO DE ENQUISTAMIENTO
Griffiths y Hughes, 1968	Solución de MgCl <sub>2</sub>
Neff y Neff, 1969	Medio Neff de enquistamiento (NEM)
McMillen et al., 1974	Medio McMillen
Hirukawa et al., 1998	Medio Tris
Dudley et al., 2005	RPMI 1640 suplementado con 8 % de glucosa

Sin embargo, la opción más empleada para obtener formas de resistencia es el agotamiento de nutrientes del medio. El problema en este caso es que se necesita un tiempo prolongado para la obtención de un gran número de quistes.

## 2. OBJETIVOS

En este capítulo se establece como objetivo general el **aislamiento, cultivo y enquistamiento de cepas de *Acanthamoeba* obtenidas a partir de muestras clínicas y ambientales**. Este objetivo se ha dividido en los siguientes apartados:

1. Aislamiento de cepas de *Acanthamoeba* a partir de muestras clínicas y ambientales.
2. Optimización del medio y de las condiciones de cultivo que permitan un buen crecimiento y mantenimiento de las cepas aisladas.
3. Diseño de medios de cultivo universales, es decir, que permitan el crecimiento de cualquier aislado independientemente del genotipo al que pertenezca.
4. Diseño de medios de enquistamiento que favorezcan un enquistamiento más rápido y con un mayor número de quistes que los medios convencionales.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Toma de muestras

Las muestras estudiadas son de origen clínico y ambiental. Las de origen clínico proceden de pacientes humanos susceptibles de padecer queratitis amebiana, tanto usuarios de lentes de contacto como no portadores de estas. Las muestras de estos pacientes llegaron al Centro de Diagnóstico Parasitológico del Instituto de Salud Pública Carlos III (ISCIH – Laboratorio Dra. Isabel Fuentes), siendo estas muestras líquido de lentillas, lentillas y/o raspado corneal.

Las muestras ambientales se recogieron de limnoembalses de cola de la comunidad autónoma Castilla y la Mancha. El muestreo se realizó en aguas de tres limnoembalses: 1) El Vicario (39°03'32.8"N, 3°59'48.2"W) que se encuentra ubicado en la provincia de Ciudad Real, 2) La Presa Verde (39°23'48.5"N+4°14'52.8"W) ubicado también en la provincia de Ciudad Real, 3) Pareja (40°32'59.1"N+2°42'34.5"W) que se encuentra al sur de la provincia de Guadalajara. Se recogió 1 L de agua de diferentes puntos y profundidades dependiendo del embalse. En el caso del embalse El Vicario (**Figura 2.1a**), las muestras se cogieron en la presa (superficie, 3 y 6 m de profundidad), en la zona media (superficie y a 3 m de profundidad), en la zona de la cola (superficie) y en el río Bañuelos (superficie). En la Presa Verde (**Figura 2.1b**), se tomaron muestras de la presa (superficie y a 2 m) y del río Bullaque (superficie). Y, por último, del limnoembalse de Pareja (**Figura 2.1c**), se muestreo en la presa (superficie, 2, 5 y 8 m de profundidad), en la cola (superficie) y en el río Ompólveda (superficie).

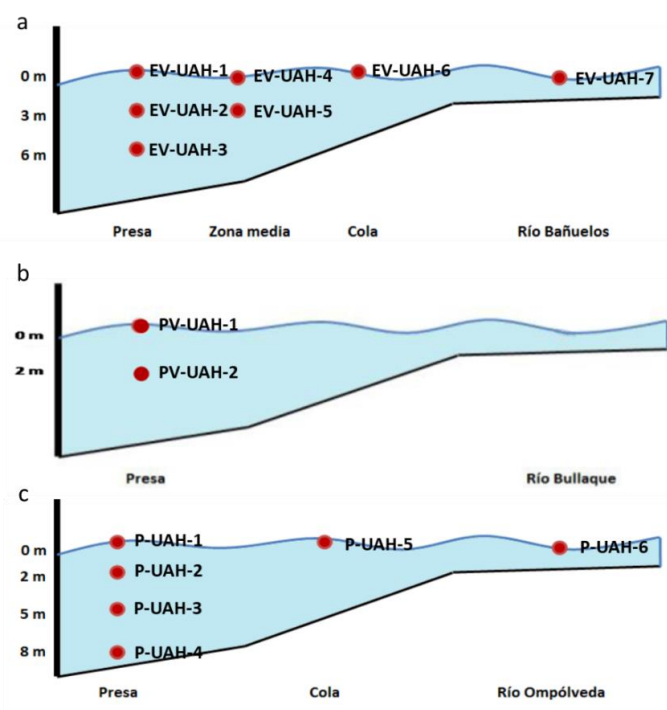


Figura 2.1. Esquema del muestreo en los limnoembalses. a. El vicario. b. Presa Verde. c. Pareja.

El concepto de limnoembalse de cola abarca a los embalses pequeños, individualizados de la dinámica hidrológica y de explotación del embalse principal, que están diseñados para mantener una lámina de agua a nivel constante (Molina-Navarro et al., 2010). La construcción de este tipo de embalse es una iniciativa innovadora cuya finalidad es la reducción, y en los mejores casos, la desaparición de los efectos negativos de los embalses. Tanto la construcción del embalse de El Vicario como el de Presa Verde tienen principalmente la finalidad de crear un hábitat para las aves acuáticas. Sin embargo, el de Pareja tiene funciones ambientales y recreativas. Y cómo se ha indicado en el capítulo 1, el género *Acanthamoeba* está presente en aguas recreativas y estas pueden ser una vía de entrada al hospedador (Schuster y Visvesvara, 2004). Por lo tanto, se estudió la presencia de amebas de vida libre en estos limnoembalses en distintos puntos, a distintas profundidades y en las 4 estaciones del año para poder determinar si existe un riesgo potencial al bañarse en estas aguas.

### 3.2. Aislamiento de las cepas amebianas

El aislamiento de cepas consiste en la separación de las amebas de vida libre del resto de microorganismos presentes en la muestra.

En el caso de las muestras clínicas (líquido de lentillas, lentillas, raspado corneal), estas se cultivaron en placas de agar al 2 % cuya superficie contiene *Escherichia coli* muerto por calor, las placas se incuban durante 1 mes a 28 °C y se observaron diariamente la evolución del cultivo. Cuando se encontró crecimiento amebiano, se realizó un pase a otra placa de agar. Este pase se realizó transfiriendo trofozoítos y/o quistes, evitando la posible flora acompañante de bacterias, levaduras y hongos, a otra placa de agar y se incubó a 25, 32 y 37 °C para determinar la temperatura óptima de crecimiento. Para mayor facilidad, esta transferencia se realizó cortando un trozo del agar con un bisturí. Una vez que se eliminó la presencia del resto de microorganismos, se procedió a la clonación de la cepa amebiana. La clonación consiste en obtener una población de amebas a partir de un único trofozoíto o quiste, para ello se transfiere un trozo de agar con un único trofozoíto o quiste a otra placa de agar, realizándose todo ello bajo la observación de lupa binocular (Motic).

En el caso de las muestras procedentes de limnoembalses, 500 ml del agua recogida en los diferentes puntos se filtró con un filtro de nitrocelulosa con diámetro de poro de 3 µm, mediante una rampa de filtración Microfil®. Cada punto de muestreo se filtró 3 veces, los filtros obtenidos se cultivaron en placas de agar con *E. coli* muerto a diferentes temperaturas (25, 32 y 37 °C), en los casos en los cuales el volumen de agua recogido era menor, sólo se filtró una vez y el filtro se recortó en 3 trozos, cada parte se sembró en placas de agar con *E. coli* muerto a 3 temperaturas diferentes. Y como en el caso de las muestras clínicas, se procedió a eliminar la contaminación de otros microorganismos realizando subcultivos, y por último se obtuvo una población clonal.

## Material y reactivos empleados

- Placas Petri.
- Agar-agar (Scharlaou, AG00200250).
- Nutrient broth (Scharlab, 02-140-500).
- *Escherichia coli* CECT 515.
- Autoclave.
- Sistema de filtración (Millipore, Microfil®).
- Filtros de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 3 µm (Sartorius stedim, 11302-47-ACN).
- Bisturí.
- Lupa binocular (Motic, SMY-168 SERIES).
- Campana de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A).
- Kitasato.
- Bomba de vacío.

## Metodología

### Preparación de placas de agar al 2 % con una suspensión *E. coli* muerto.

1. Preparar el medio Nutrient Broth siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Sembrar *E. coli* CECT 515 en el medio Nutrient Broth: recoger el inóculo de microorganismo de una placa con un asa de siembra que se sumerge en el caldo. Incubar a 37 °C durante 24 h.
3. Autoclavar durante 20 min a 121 °C el cultivo de *E. coli* para matarlo.
4. Preparar agar al 2 %. Pesar 10 g de agar-agar en 500 ml de agua destilada. Autoclavar 20 min a 121 °C. Atemperar el agar a 60 °C, y disponerlo en placas en la campana de flujo laminar.
5. Añadir 200 µl del cultivo de *E. coli* autoclavado a las placas una vez que estas se han solidificado.
6. Extender la solución de *E. coli* por la superficie de la placa y dejar secar en la campana de flujo laminar.
7. Conservar a 4 °C hasta su uso.

### Preparación de muestras clínicas para aislar las cepas amebianas.

1. Centrifugar a 800 x g durante 10 min las muestras procedentes de los hospitales, en caso de ser raspado corneal o líquido de lentillas. En el caso de que la muestra recibida sea unas lentillas, sembrarlas directamente en la placa de agar al 2 % con *E. coli* muerto.
2. En una campana de flujo laminar, retirar el sobrenadante, dejando aproximadamente 40 µl en los cuales se resuspende el pellet.
3. Sembrar en placas de agar al 2 % con *E. coli* muerto y dejar secar en una campana de flujo laminar.
4. Incubar las placas a 28 °C hasta observar crecimiento amebiano en lupa binocular durante 30 días.

**Filtración de agua de limnoembalses para aislar las cepas amebianas.**

1. Filtrar 500 ml de agua mediante una rampa de filtración (Millipore) en una campana de flujo laminar. La rampa de filtración se conecta a un Kitasato en el cual se almacena el agua filtrada mediante vacío, ya que el otro extremo del Kitasato está unido a una bomba de vacío.
2. Esterilizar el porta-filtros de acero inoxidable que tiene la rampa de filtrado.
3. Colocar un filtro de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 3  $\mu\text{m}$  en el porta-filtros. Encima del filtro, colocar el embudo de filtración Microfil® Filtration System (previamente esterilizado en autoclave).
4. Añadir 500 ml de agua en el embudo de filtración y activar la rampa de filtrado. De tal forma que todas las partículas mayores de 3  $\mu\text{m}$  quedan retenidas en el filtro de nitrocelulosa, mientras que el agua con las partículas menores de 3  $\mu\text{m}$  pasan al Kitasato.
5. Retirar el embudo de filtración y disponer el filtro de nitrocelulosa con la cara que ha retenido las partículas boca abajo sobre las placas de agar 2 % con *E. coli* que son incubadas a 25, 32 y 37 °C. Descartar el agua del Kitasato.

**Aislamiento y obtención de una población clonal.**

1. Seleccionar una parte de cultivo que no contenga o contenga una mínima contaminación de otros microorganismos, tales como bacterias y/u hongos, cuando se observe crecimiento amebiano. Transferir esa pequeña porción de agar (cortada con un bisturí estéril) a otra placa de agar al 2 % con *E. coli*. Repetir el paso anterior tantas veces como sea necesario para eliminar el resto de los microorganismos.
2. Una vez que se tiene un cultivo monoxénico, es decir, el aislado amebiano con *E. coli* muerto, se procede a obtener un cultivo clonal. Para obtención de un cultivo clonal, cortar un fragmento de agar que contiene en su superficie un trofozoíto o un quiste y sembrarlo en otra placa de agar.
3. El trofozoíto se reproduce asexualmente, obteniendo así una población que proviene de una única célula. En el caso del quiste, este se desenquista y el trofozoíto se divide asexualmente.



### 3.3. Cultivo de las cepas aisladas

A partir de las poblaciones clonales de las diferentes cepas aisladas se realizaron cultivos xénicos en los medios PYG suplementado con un 2 % de bactocastona y CERVA, en los casos en los cuales estos aislados no crecieron en ninguno de esos dos medios, se probaron más medios de cultivos comerciales tales como Brain Heart Infusion (BHI), Nutrient Mixture F-10 (HAM), Grace's Insect Medium, Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) y Tryptic Soy Broth (TSB) (Martín-Pérez et al., 2018).

Además, se diseñaron diferentes medios compuestos por ingredientes económicos y que se pueden encontrar en algunos supermercados locales (Mercadona, Alcampo y Billa), tales como caldos diversos en tetra-brick (cocido, pescado, pollo, etc...) cerveza, leche desnatada sin lactosa y suplementos alimentarios como escamas de levadura y cápsulas de algas liofilizadas (*Spirulina* sola o *Spirulina* y *Fucus* combinadas).

El crecimiento de los aislados se comprobó mediante microscopía óptica o mediante unas placas multipocillo que permiten evaluar la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (Heredero-Bermejo et al., 2015). Las placas OCR tipo LT (Oxoprobics Bioscience), tienen adheridos en el fondo de cada pocillo una biopelícula que contiene una sonda que en presencia de oxígeno está desactivada y no emite fluorescencia. Esta sonda se activa cuando el oxígeno se va consumiendo, de manera que comienza a emitir fluorescencia que puede ser registrada por un lector de fluorescencia a tiempo real o TRF (Time-Resolved Fluorescence) (Figura 2.2).

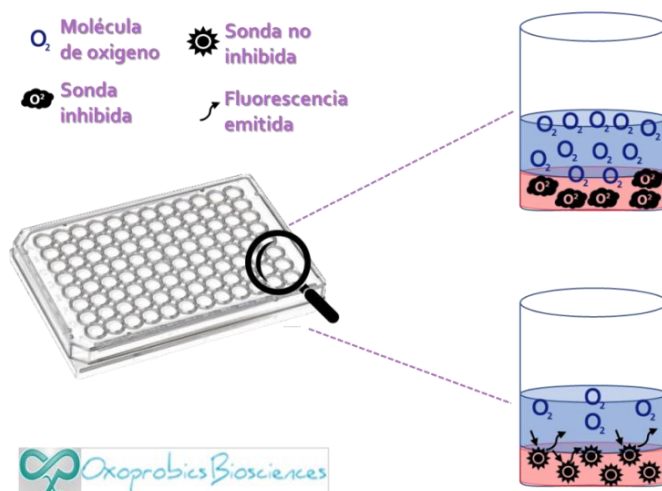


Figura 2.2. Esquema explicativo de las placas sensibles a oxígeno (OCR).

Las lecturas de fluorescencia pueden transformarse en concentración de O<sub>2</sub> usando la ecuación de Stern-Volmer (Olry et al., 2007; Criado-Fornelio et al., 2017). El cálculo de las concentraciones de oxígeno basadas en fluorescencia se obtiene calculando en primer lugar la constante Ksv:

$$K_{sv} = \frac{\text{Fluorescencia máxima}}{\text{Fluorescencia base}} - \frac{1}{\text{Concentración de O}_2 \text{ en el aire}}$$

Una vez calculada la constante, se calcula la concentración de oxígeno con la siguiente fórmula:

$$[O_2] = \left[ \frac{\frac{\text{Fluorescencia máxima}}{\text{Fluorescencia base}}}{\frac{\text{Fluorescencia problema}}{\text{Fluorescencia base}}} \right] - \frac{1}{K_{sv}}$$

Por ejemplo, si la fluorescencia máxima es de 300.000, la base es de 200 y la fluorescencia que ha emitido el pocillo problema es 400 a tiempo 0, siendo la concentración de O<sub>2</sub> presente en el aire de 0,209 g/l, se obtendría:

$$K_{sv} = \frac{300.000}{200} - \frac{1}{0,209} = 7.127$$

$$[O_2] = \left[ \frac{\frac{300.000}{200}}{\frac{400}{200}} \right] - \frac{1}{7127} = 0,105 \text{ mM}$$

Por tanto, la concentración de O<sub>2</sub> en el pocillo problema es de 0,105 mM o 105 nM.

### Material y reactivos empleados

- Microscopio invertido (Motic AE21).
- Lector de fluorescencia a TRF (VICTOR®).
- Bisturí.
- Flasks de cultivo celular T25 cm<sup>2</sup>.
- Pipetas estériles de 10 ml.
- Aparato auxiliar de pipeteado Accu-jet®.
- Filtros de nitrocelulosa de 0,45 μm (Millipore Corporation).
- Filtros de peonza de 0,22 μm (Maine Manufacturing).
- Papel de filtro.
- Tubos falcon de 50 ml estériles con faldón.
- Tubos falcon de 50 ml estériles sin faldón.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Tubos de 100 ml estériles.
- Placas de 96 pocillos OCR tipo LT (Oxoprobics Bioscience).
- Aceite mineral (Sigma, M5904).

- Sulfato cúprico (Oxoprobics Bioscience).
- Sulfato sódico (Oxoprobics Bioscience).
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Peptona proteasa (Becton and Dickinson, 211693).
- Cloruro sódico (NaCl) (Panreac, 131659.1211).
- Extracto de levadura (Scharlab, 202607079500).
- Bactocasitona (Becton and Dickinson, 225930).
- Glucosa (SIGMA, G7021).
- Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Panreac, 141679.1211).
- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Panreac, 141509.1211).
- Mix de antibióticos: 10.000 unidades de penicilina y 1 mg/ml de estreptomicina (Sigma, P4333).
- Suero fetal bovino (SFB) (SIGMA, F7524).
- Brain Heart Infusion (BHI) (Scharlab, 02-599-500).
- Nutrient Mixture F-10 (HAM) (Sigma, N6635).
- Grace's Insect Medium (Sigma-Aldrich, G8142).
- Dulbelcco's modified eagle's medium (DEMEM) (Sigma-Aldrich, D6429).
- Tryptic Soy Broth (TSB) (Scharlab, 02-200-500).
- Medio Luria-Bertoni (Usb, 75851).
- Ácido 4-(2-hidroxietil-1-piperazino-etanosulfónico, abreviatura estándar: HEPES (Sigma, H-3375).
- Solución salina amortiguada por fosfatos de Dulbecco a 10x (PBS) (Sigma, D1408).
- Solución salina.
- Extracto de malta (Scharlab, 01-0111-500).
- Caldo de cocido (Auchan®).
- Cerveza sin alcohol (Damm®).
- Zumo de uva (Mosto Greip®).
- Leche UHT desnatada sin lactosa (KAIKU®).
- Caldo de pescado (Aneto®).
- Caldo de puchero (Aneto®).
- Caldo de pollo (Aneto®).
- Caldo casero de pollo: 400 g de cuarto trasero de pollo, 75 g de zanahorias, 175 g de patatas, 130 g de cebollas y 750 ml de agua del grifo.
- Caldo casero de mejillón: 1 kg de mejillones con la concha, 85 g de cebollas y 500 ml de agua del grifo.
- Leche de soja (Vivesoy® de Pascual).
- Suplemento alimenticio de extracto de levadura (Vive+®).
- Suplemento alimenticio de extracto de *Spirulina* (Vive+®).
- Pastillas de *Fucus* y *Spirulina* (Deliplus®).
- Huevos de gallina (Guillén, Paterna, Valencia, España).
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma, L3771) al 10 %.

## Metodología

### Preparación del medio PYG suplementado con 2 % bactocasitona.

1. Pesar los siguientes compuestos en una balanza (**Tabla 2.3**):

**Tabla 2.3.** Composición del medio PYG+B. Los compuestos aparecen en g para preparar 1 L.

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona proteasa	10
Extracto de levadura	10
Bactocasitona	20
NaCl	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,69

2. Añadir estos compuestos a un matraz y añadir 910 ml de agua destilada.
3. Comprobar que el pH se encuentra entre 6,5 y 7,5. En el caso que no lo esté, ajustarlo en ese rango.
4. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
5. Esperar a que el medio se atempere.
6. Preparar 80 ml de glucosa al 6,25 %: 80 ml de agua destilada con 5 g de glucosa.
7. Filtrar la solución de glucosa con un filtro estéril de 0,22 µm para esterilizarla y añadirla al matraz.
8. Añadir al matraz 10 ml de la mezcla de antibióticos, previamente filtrados con un filtro de 0,22 µm.
9. Alícuotar en tubos falcons de 50 ml con faldón y congelar a -20 °C hasta su uso.

### Preparación del medio CERVA.

1. Añadir estos compuestos a un matraz y añadir 890 ml de agua destilada (**Tabla 2.4**)

**Tabla 2.4.** Composición del medio CERVA. Los compuestos aparecen en g para preparar 1 L.

Compuesto	Cantidad (g)
Bactocasitona	20

2. Comprobar que el pH se encuentra entre el 6,5 y 7,5. En el caso que no lo este, ajustarlo en ese rango.
3. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
4. Esperar a que el medio se atempere.
5. Añadir 100 ml de SFB previamente descomplementado y filtrado (para descomplementarlo hay que calentar el SFB a 56 °C durante 30 min).
6. Añadir al matraz 10 ml de la mezcla de antibióticos.

7. Alícuotar en tubos falcons de 50 ml con faldón y congelar a -20 °C hasta su uso.

#### **Preparación del medio BHI.**

1. Añadir 37 g de BHI y 950 ml de agua destilada.
2. Ajustar el pH del medio a 7.
3. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
4. Esperar a que el medio se atempere.
5. Añadir al matraz 5 ml de la mezcla de antibióticos.
6. Alícuotar en tubos falcons de 50 ml con faldón y conservar a 4 °C.

#### **Preparación del medio Nutrient Mixture F-10 (HAM).**

1. Este medio se vende preparado y estéril. Sólo hay que añadirle la mezcla de antibióticos al 1 %.
2. Alícuotar y conservar a 4 °C hasta su uso.

#### **Preparación del medio Grace's Insect Medium.**

1. Este medio se vende preparado y estéril. Sólo hay que añadirle la mezcla de antibióticos al 1 %.
2. Alícuotar y conservar a 4 °C hasta su uso.

#### **Preparación del medio Dulbecco's modified eagle's medium (DEMEM).**

1. Este medio se vende preparado y estéril. Sólo hay que añadirle la mezcla de antibióticos al 1 %.
2. Alícuotar y conservar a 4 °C hasta su uso.

#### **Preparación del medio Tryptic Soy Broth (TSB)**

1. Añadir 30 g de TSB y 1 L de agua destilada.
2. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
3. Esperar a que el medio se atempere.
4. Añadir al matraz 10 ml de la mezcla de antibióticos.
5. Alícuotar en tubos falcons de 50 ml con faldón y conservar a 4 °C.

#### **Preparación del medio Luria-Bertoni.**

1. Añadir 15 g de Luria-Bertoni y 1 L de agua destilada.
2. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
3. Esperar a que el medio se atempere.
4. Añadir al matraz 10 ml de la mezcla de antibióticos.
5. Alícuotar en tubos falcons de 50 ml con faldón y conservar a 4 °C.

**Preparación del buffer HEPES 0,2 M (solución 20x).**

1. Añadir 2,38 g de HEPES, 40 ml de agua destilada y una lenteja de NaOH.
2. Comprobar que el pH está próximo a 7,4. Sino lo está ajustarlo con adición de más NaOH.
3. Enrasar hasta los 50 ml con agua destilada.
4. Filtrar con un filtro con un diámetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilizar.
5. Alícuotar en tubos de 15 ml o eppendorf de 1,5 ml y congelar a - 20 °C hasta su uso.

**Preparación de PBS 1x.**

1. Añadir 450 ml de agua destilada en un matraz.
2. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
3. Esperar a que el medio se atempere.
4. Añadir al matraz 50 ml de PBS 10 x.
5. Alícuotar en tubos de 100 ml y almacenar a 4 °C hasta su uso.

**Preparación de solución salina.**

1. Añadir 9 g de NaCl y 950 ml de agua destilada.
2. Comprobar que el pH está próximo a 7,5. Sino lo está ajustarlo.
3. Enrasar hasta 1 L con agua destilada.
4. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
5. Esperar a que el medio se atempere.
6. Alícuotar en tubos de 100 ml y almacenar a temperatura ambiente.

**Preparación de leche UHT desnatada sin lactosa clarificada diluida al 15 % (LSL).**

1. En la cabina de flujo laminar, abrir el brick de leche, flamear ligeramente la boquilla de plástico antes de verter la leche.
2. Añadir 7,5 ml de leche en un tubo falcon de 50 ml sin faldón.
3. Añadir agua destilada hasta los 50 ml. Agitar brevemente.
4. Centrifugar a 2.000 x g (4.000 rpm) durante 10 min. Descartar el pellet y trabajar con el sobrenadante evitando recoger el sobrenadante graso.
5. Centrifugar a 10.000 x g (14.000 rpm) durante 15 min. Recoger el sobrenadante.
6. Filtrar el sobrenadante con un filtro con diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .
7. Centrifugar el filtrado a 10.000 x g (14.000 rpm) durante 15 min.
8. Recuperar y filtrar el sobrenadante por un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .
9. Alícuotar en tubos de 15 ml y almacenar a - 20 °C hasta su uso.

**Preparación de Luria-Bertoni con extracto de malta (LBM 2x).**

1. Pesar los siguientes compuestos en una balanza (**Tabla 2.5**):

**Tabla 2.5.** Composición del medio LBM 2x. Los compuestos aparecen en g necesarios para preparar 1 L.

Compuesto	Cantidad (g)
Medio Luria-Bertoni sin sal	30
NaCl	10
Extracto de malta	40

2. Añadir estos compuestos a un matraz y añadir agua destilada hasta los 1 L.
3. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
4. Alícuotar en tubos falcons de 50 ml con faldón y almacenar a 4 °C hasta su uso.

**Clarificación de los caldos de pollo o pescado.**

1. En la cabina de flujo laminar, abrir el brick del caldo, flamear ligeramente la esquina de cartón y flamear también las tijeras con las que se corta el brick.
2. Añadir 50 ml en un tubo falcon de 50 ml sin faldón.
3. Centrifugar a 2.000  $\times$  g (4.000 rpm) durante 10 min. Descartar el pellet y recoger el sobrenadante evitando el sobrenadante graso.
4. Centrifugar a 10.000  $\times$  g (14.000 rpm) durante 15 min. Recoger el sobrenadante.
5. Filtrar el sobrenadante con un filtro con un diámetro de poro de 0,45  $\mu$ m.
6. Centrifugar el filtrado a 10.000  $\times$  g (14.000 rpm) durante 15 min.
7. Recuperar el sobrenadante y filtrarlo por un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22  $\mu$ m.
8. Alícuotar en tubos de 15 ml y almacenar a - 20 °C hasta su uso.

**Preparación de leche de soja clarificada diluida al 45 % (LS).**

1. En la cabina de flujo laminar, abrir el brick de leche de soja, flamear ligeramente la boquilla de plástico antes de verter la leche.
2. Añadir aproximadamente 22,5 ml de leche de soja en un tubo falcon de 50 ml sin faldón.
3. Centrifugar a 2.000  $\times$  g (4.000 rpm) durante 10 min. Descartar el pellet y recoger el sobrenadante evitando el sobrenadante graso.
4. Centrifugar a 10.000  $\times$  g (14.000 rpm) durante 15 min. Recoger el sobrenadante.
5. Pasar el sobrenadante por un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,45  $\mu$ m.
6. Centrifugar el filtrado a 10.000  $\times$  g (14.000 rpm) durante 15 min.
7. Recuperar el sobrenadante y filtrar por un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22  $\mu$ m.
8. Alícuotar en tubos de 15 ml y almacenar a - 20 °C hasta su uso.

**Preparación del suplemento alimenticio de extracto de levadura en escamas.**

1. Pesar 2,5 g de escamas de levadura en una balanza y pasarlas a un tubo falcon de 50 ml sin faldón.
2. Añadir 50 ml de agua destilada estéril para obtener una concentración final 5 mg/ml.
3. Agitar durante 10 min a temperatura ambiente en un agitador a 50 rpm.
4. Centrifugar a 10.000 x g (14.000 rpm) durante 15 min.
5. Recuperar el sobrenadante y filtrarlo por un filtro estéril con diámetro de poro de 0,22 µm.
6. Alícuotar en tubos falcon de 50 ml con faldón y almacenar a 4 °C hasta su uso.

**Preparación del extracto de *Spirulina* (Vive+®).**

1. En la cabina de flujo laminar, con cuidado de no tocar nunca el contenido, abrir dos cápsulas y verter el polvo liofilizado en un tubo estéril de boca ancha (normalmente un falcon de 50 ml sin faldón).
2. Añadir 14 ml de agua destilada estéril, siendo la concentración final de 50 mg/ml.
3. Agitar durante 10 min a temperatura ambiente en un agitador a 50 rpm.
4. Transferir el líquido a un tubo estéril y centrifugar a 10.000 x g (14.000 rpm) durante 10 min.
5. Retirar el sobrenadante y filtrarlo con un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22 µm para esterilizar.
6. Alícuotar y almacenar a - 20 °C hasta su uso.

**Preparación del extracto de *Fucus* y *Spirulina* (Deliplus).**

1. En la cabina de flujo laminar, abrir dos cápsulas y verter el polvo que hay en el interior a un tubo falcon sin faldón de 50 ml, de forma similar a lo indicado en el apartado anterior.
2. Añadir 14 ml de agua destilada estéril, siendo la concentración final de 1,79 mg/ml de *Fucus* y 50 mg/ml de *Spirulina*.
3. Agitar durante 10 min a temperatura ambiente en un agitador a 50 rpm.
4. Transferir el líquido a un tubo estéril y centrifugar a 10.000 x g (14.000 rpm) durante 10 min.
5. Retirar el sobrenadante y filtrarlo con un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22 µm para esterilizar.
6. Alícuotar y congelar a - 20 °C hasta su uso.



**Preparación de la clara de huevo de gallina.**

1. En la cabina de flujo laminar, limpiar la superficie del huevo (preferiblemente de la clase S o M) con papel impregnado en etanol al 70 %.
2. Flamear ligeramente el huevo en la zona donde se va a romper.
3. Romper el huevo y verterlo en una placa Petri estéril.
4. Retirar 0,5 ml de clara usando puntas de boca ancha (Finntip®, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) o bien puntas recortadas en el laboratorio, y añadirla a un tubo estéril que contiene 0,5 ml de solución fisiológica salina.
5. Centrifugar a 10.000 x g (14.000 rpm) durante 10 min.
6. Retirar el sobrenadante y filtrarlo con un filtro estéril con diámetro de poro de 0,22 µm para esterilizar.
7. Alícuotar y almacenar a 4 °C hasta su uso.

**Preparación de la yema de huevo de gallina.**

1. En la cabina de flujo laminar, limpiar la superficie del huevo (clase S o M) con papel impregnado en etanol al 70 %.
2. Flamear ligeramente el huevo en la zona donde se va a romper.
3. Romper el huevo y verterlo en una placa Petri estéril.
4. Retirar 0,5 ml de yema (evitando coger el blastodermo) usando puntas de boca ancha (Finntip®, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) o bien puntas recortadas en el laboratorio, y añadirla a un tubo estéril que contiene 0,5 ml de solución fisiológica salina.
5. Centrifugar a 10.000 x g (14.000 rpm) durante 10 min.
6. Retirar el sobrenadante evitando la pequeña capa flotante y filtrarlo con un filtro estéril con diámetro de poro de 0,22 µm para esterilizar.
7. Alícuotar y almacenar a 4 °C hasta su uso.

**Preparación de la cerveza sin alcohol.**

1. Abrir la botella de cerveza en una cabina de flujo laminar. Flamear la boca y añadir 40 ml de cerveza en un tubo falcon de 50 ml estéril.
2. Antes de añadir la cerveza sin alcohol a cualquier medio de cultivo, hay que eliminar el gas carbónico. Por este motivo no se cierra a fondo el tapón a rosca del tubo falcon y se deja a 4 °C durante una noche para permitir la eliminación gradual del gas carbónico.

**Composición de los medios 1 a 80.**

La composición detallada de los 80 medios de cultivo empleados se presenta en las **Tabla 2.6** a **Tabla 2.9**:



**Tabla 2.7.** Composición de los medios 22 - 42. Los ingredientes aparecen en  $\mu\text{l}$  para preparar 1 ml de medio. Los caldos y la leche sin lactosa fueron clarificados antes de su inclusión en el medio. LSL: leche UHT desnatada sin lactosa clarificada diluida al 15%. LBM: Medio Luria-Bertoni con extracto de malta.

Ingredientes	Medios																				
	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HEPES 0,2 M	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Mix de antibióticos	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Caldo de cocido	0	0	170	255	0	0	0	170	210	255	0	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caldo de puchero	170	255	0	0	170	210	255	0	0	0	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60
Caldo de pescado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	170	255	0	0	0	0	0	0	60
Caldo de pollo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	170	255	300	350	400	60	85
LBM	170	255	170	255	170	210	255	170	210	255	170	170	170	255	170	210	210	210	210	170	255
LSL	0	0	0	0	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330
dH <sub>2</sub> O estéril	600	430	600	430	270	190	100	270	190	100	320	320	270	100	270	145	100	50	0	260	100

**Tabla 2.8.** Composición de los medios 43 - 65. Los ingredientes aparecen en µl para preparar 1 ml de medio. Los caldos, la espirulina, la levadura, la leche de soja y la leche sin lactosa fueron clarificados antes de su inclusión en el medio. LSL: leche UHT desnatada sin lactosa clarificada diluida al 15 %. LBM: Medio Luria-Bertoni con extracto de malta.

Ingredientes	Medios																						
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
HEPES 0,2M	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Mix antibióticos	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Caldo de pollo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	350	350	350	350	350	0	0
Caldo de cocido	310	200	200	300	155	155	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caldo casero de pollo	0	0	0	0	0	0	0	300	400	500	0	0	0	0	300	200	0	0	0	0	0	0	0
Caldo casero de mejillones	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	300	400	100	200	0	0	0	0	0	0	0
Extracto de levadura	310	490	200	155	300	155	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spirulina</i>	310	250	200	155	155	300	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LBM	0	0	0	0	0	0	0	210	210	155	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210
Leche soja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	220	165	125	110	55	220	110
LSL	0	0	330	330	330	330	330	330	330	285	330	330	330	330	330	330	0	0	0	0	0	330	330
dH <sub>2</sub> O estéril	10	0	10	0	0	0	10	100	0	0	300	200	100	0	0	0	160	215	255	270	325	180	290

**Tabla 2.9.** Composición de los medios 66 - 80. Los ingredientes aparecen en  $\mu\text{l}$  para preparar 1 ml de medio. El caldo, los componentes de huevo y la mezcla *Fucus + Spirulina* fueron clarificados antes de su inclusión en el medio. LBM: Medio Luria-Bertoni con extracto de malta.

Ingredientes	Medios														
	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
HEPES 0,2 M	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Mix antibióticos	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Caldo de pollo	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350
LBM	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210
Yema de huevo	200	150	100	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	30
Clara de huevo	0	0	0	0	200	150	100	50	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spirulina + Fucus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	300	200	100	50	25	15	25
$\text{dH}_2\text{O}$ estéril	180	230	280	350	180	230	280	330	80	180	280	330	355	345	325

**Cultivo en medio axénico de las cepas clonadas y observación al microscopio óptico.**

1. Transferir, de un cultivo clonal en placa de agar con *E. coli* muerto, un fragmento de agar a los flask T25 cm<sup>2</sup> con los distintos medios e incubar a la temperatura adecuada. A los dos días de la incubación, observar si hay crecimiento amebiano:
  - En el caso de observarse trofozoítos en el flask, observar periódicamente para comprobar que se dividen y se establece un cultivo en confluencia.
  - En el caso de no observarse trofozoítos en el flask a los dos días tras su inoculación, observar el flask durante 2 semanas. Si en dos semanas no se observa crecimiento, se concluye que el aislado no crece en ese medio de cultivo.

**Cultivo en medio axénico de las cepas clonadas y observación por OCR.**

1. Añadir 5 ml de PBS 1x y lavar la superficie del agar de un cultivo clonal. De esta forma, los trofozoítos y quistes se desprenden del agar y quedarán resuspendidos en PBS 1x.
2. Retirar el PBS 1x y transferir a un tubo de 15 ml estéril.
3. Retirar una alícuota del tubo y mezclarla en proporción 1:1 con rojo Congo al 0,2 %; es decir, si se retiran 15 µl de la solución de PBS 1x y se mezclan con 15 µl de rojo Congo al 0,2 %.
4. Colocar la mezcla en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y contar el número de trofozoítos presentes en 4 de los cuadrados. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1 µl:

$$\frac{\text{cél}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cél. contadas}}{\text{superficie} * \text{profundidad} * \text{dilución}} \\ \frac{\text{cél}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cuadrados contados}}{\text{n}^\circ \text{ de cuadrados contados}}$$

$$\frac{\text{cél}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cél. contadas}}{16 * 0,2 * 1/2} \\ \frac{\text{cél}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cél. contadas}}{4}$$

5. Ajustar el número de trofozoítos a 10<sup>5</sup> en PBS 1x.
6. Añadir 10 µl de la solución de 10<sup>5</sup> trofozoítos/µl a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de OCR.
7. Añadir 90 µl del medio a estudiar.
8. Sellar cada pocillo con 100 µl de aceite mineral para evitar el intercambio de oxígeno.
9. Incluir en la placa multipocillo sulfato cúprico a una concentración final en el pocillo de 0,1 mg/ml como control negativo y sulfito sódico a una concentración final en el pocillo de 0,01 mg/ml como control positivo.
10. Incubar la placa multipocillo en el lector de placas VICTOR® que está programado para obtener dos lecturas por pocillo cada hora durante 72 h. La fluorescencia (excitación a 340 nm / emisión a 642 nm) fue leída con un retraso de 30 y 70 µs.
11. Transformar las absorbancias obtenidas a consumo de O<sub>2</sub> mediante la ecuación de Stern-Volmer.

### 3.4. Estudio del perfil respiratorio como sistema para el cribado de nuevos medios de cultivo de *Acanthamoeba* spp.

Estos estudios se realizaron para determinar el perfil respiratorio que tienen las cepas en condiciones de cultivo óptima y subóptima mediante placas de OCR y recuento manual. Los medios de cultivo que se emplearon en este tipo de estudio fueron el medio CERVA diluido a 0,75; 0,5; 0,25 y 0,12x, como control negativo se usó PBS 1x.

También, se estudió el perfil respiratorio de *A. griffini* MYP2004 cultivado en los medios de cultivo preparados a partir de ingredientes tales como zumo de uva, caldos, leche sin lactosa, etc... (Medios 1 - 80) con las placas de OCR.

#### Material y reactivos empleados

- Microscopio invertido (Motic AE21).
- Lector de fluorescencia de tipo TRF (VICTOR®).
- Flask de cultivo celulares T75 cm<sup>2</sup>.
- Pipetas estériles de 10 ml.
- Aparato auxiliar de pipeteado Accu-jet®.
- Tubos falcon de 50 ml estériles con faldón.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Placas de 96 pocillos tipo LT (Oxoprobics Bioscience).
- Placas de 24 pocillos.
- Aceite mineral (Sigma, M5904).
- Sulfato cúprico (Oxoprobics Bioscience).
- Sulfito sódico (Oxoprobics Bioscience).
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Medio CERVA.
- *Acanthamoeba griffini* MYP2004 (Heredero-Bermejo et al., 2015).

#### Metodología

##### Ensayo de estudio del perfil respiratorio usando las placas OCR.

1. Realizar diluciones seriadas en agua destilada estéril del medio CERVA: 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,12 y 0,06x.
2. Emplear como inóculo un cultivo de *A. griffini* MYP2004 en fase de crecimiento exponencial.
3. Desprender los trofozoítos del frasco de cultivo mediante choque frío. Para ello, colocar el flask sobre hielo picado durante 10 min.
4. Retirar una alícuota del flask y mezclar en proporción 1:1 con rojo Congo al 0,2 %.
5. Colocar la mezcla en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y contar el número de trofozoítos.
6. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1 µl y ajustar el número de trofozoítos a 10<sup>5</sup> en PBS 1x.

7. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de la solución de  $10^5$  trofozoítos/ $\mu\text{l}$  a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de OCR tipo LT (Oxoprobics Bioscience). Se debe mantener la microplaca en hielo picado durante la preparación para que el crecimiento sea sincrónico en todos los pocillos.
8. Añadir 90  $\mu\text{l}$  del medio a estudiar.
9. Sellar cada pocillo con 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral para evitar el intercambio de oxígeno.
10. Incluir en la placa multipocillo sulfato cúprico a una concentración final en el pocillo de 0,1 mg/ml como control negativo y sulfito sódico a una concentración final en el pocillo de 0,01 mg/ml como control positivo.
11. Incubar la placa multipocillo en el lector de placas VICTOR® que está programado para obtener dos lecturas por pocillo cada hora durante 72 h. La fluorescencia (excitación a 340 nm / emisión a 642 nm) fue leída con un retraso de 30 y 70 microsegundos.
12. Transformar la fluorescencia obtenida a concentración de  $\text{O}_2$  mediante la ecuación de Stern-Volmer.

#### **Estudio de viabilidad mediante recuento manual.**

1. Realizar diluciones seriadas en agua destilada estéril del medio CERVA: 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,12 y 0,06x.
2. Emplear cultivos de *A. griffini* MYP2004 en crecimiento exponencial.
3. Despender los trofozoítos del frasco de cultivo mediante choque frío. Para ello se coloca el flask sobre hielo picado durante 10 min.
4. Retirar una alícuota del flask mezclado en proporción 1:1 con rojo Congo.
5. Colocar la mezcla en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y contar el número de trofozoítos.
6. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1  $\mu\text{l}$  y ajustar el número de trofozoítos a  $10^5$  en PBS 1x.
7. Añadir 60  $\mu\text{l}$  de la solución de  $10^5$  trofozoítos/ $\mu\text{l}$  a cada pocillo de una placa de 24 pocillos.
8. Añadir 540  $\mu\text{l}$  del medio a estudiar.
9. Incubar la placa a la temperatura de crecimiento correspondiente de la cepa.
10. Realizar recuento manual a las 24 horas, 3 y 7 días. Para ello, despegar los trofozoítos de los pocillos mediante choque térmico (frío). Retirar una alícuota que se mezcla con rojo Congo a una proporción 1:1 y contar las amebas en la cámara de recuento.

#### **Estudio del perfil respiratorio en los distintos medios usando las placas OCR.**

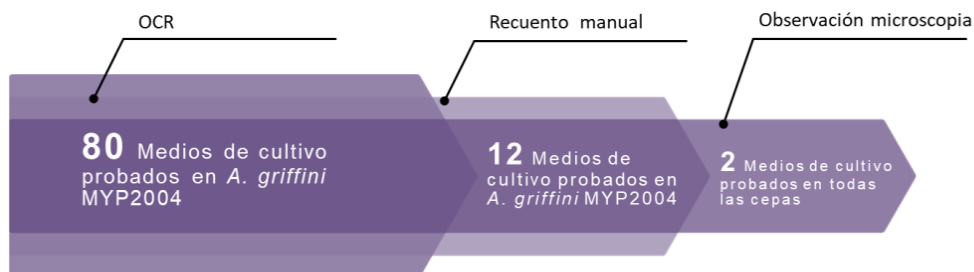
1. Preparar los medios 1 - 80, tal y como se han descrito previamente.
2. Emplear un cultivo de *A. griffini* MYP2004 en crecimiento exponencial.
3. Desprender los trofozoítos del frasco de cultivo mediante choque frío. Para ello, colocar el flask sobre hielo picado durante 10 min.
4. Retirar una alícuota del flask y mezclar en proporción 1:1 con rojo Congo.
5. Colocar la mezcla en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y contar el número de trofozoítos.
6. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1  $\mu\text{l}$  y ajustar el número de trofozoítos a  $10^5$  en PBS 1x.



7. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de la solución de  $10^5$  trofozoítos/ $\mu\text{l}$  a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de OCR. Se debe mantener la microplaca en hielo picado durante la preparación para que el crecimiento sea sincrónico en todos los pocillos.
8. Añadir 90  $\mu\text{l}$  del medio a estudiar.
9. Sellar cada pocillo con 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral para evitar el intercambio de oxígeno.
10. Incluir en la placa multipocillo sulfato cúprico a una concentración final en el pocillo de 0,1 mg/ml como control negativo y sulfito sódico a una concentración final en el pocillo de 0,01 mg/ml como control positivo.
11. Incubar la placa multipocillo en el lector de placas VICTOR® que esta programado para obtener dos lecturas por pocillo cada hora durante 72 h. La fluorescencia (excitación a 340 nm / emisión a 642 nm) fue leída con un retraso de 30 y 70 microsegundos.
12. Transformar la fluorescencia obtenida a concentración de  $\text{O}_2$  mediante la ecuación de Stern-Volmer.

### 3.5. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen español

Una vez conocido el perfil respiratorio de *A. griffini* MYP2003 cultivada en los medios de cultivo del 1 al 80, se estudió por recuento manual el crecimiento de 12 de esos medios (Figura 2.3). De esos 12, se seleccionaron los dos óptimos para estudiar el crecimiento de las cepas que no crecían en los medios habituales, y también de las cepas que sí crecían en los medios habituales, y así determinar si estos medios se pueden usar como medio universal para todas las cepas amebianas.



**Figura 2.3.** Esquema de la metodología empleada en el estudio de los medios de cultivo 1 al 80.

También se estudió la forma de conservar los medios de cultivo, es decir, el efecto de refrigeración y/o congelación y el número de ciclos que se pueden congelar sin que se vea afectado el rendimiento del medio. En el caso de uno de los medios alternativos que mostraba crecimiento óptimo (concretamente el número 39), se hizo una prueba en la cual se eliminó el buffer HEPES del conjunto de ingredientes. Esto nos indicaría si este componente era esencial para la buena marcha del cultivo.

## Material y reactivos empleados

- Microscopio invertido (Motic AE21).
- Lector de fluorescencia de tipo TRF (VICTOR®).
- Bisturí.
- Flask de cultivo celulares T25 cm<sup>2</sup>.
- Pipetas estériles de 10 ml.
- Aparato auxiliar de pipeteado Accu-jet®.
- Tubos falcon de 50 ml estériles con faldón.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Placas de 96 pocillos tipo LT (Oxoprobics Bioscience).
- Placas de 24 pocillos.
- Aceite mineral (Sigma, M5904).
- Sulfato cúprico (Oxoprobics Bioscience).
- Sulfito sódico (Oxoprobics Bioscience).
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Medio PYG.
- Medio CERVA.
- Medios 1 - 80.

## Metodología

### Estudios con placas OCR sobre el efecto de la refrigeración/congelación en los medios de cultivo alternativos.

1. Preparar los medios 39 y 80, tal y como se han descrito previamente. Realizar alícuotas de cada uno en tres tubos diferentes. Usar directamente uno de los tubos, mantener en la nevera durante 2 semanas otro de los tubos, y, el tercero, mantenerlo en el congelador durante 2 semanas, pero descongelándolo y volviéndolo a congelar 6 veces.
2. Emplear un cultivo de *A. griffini* MYP2004 en crecimiento exponencial.
3. Desprender los trofozoítos del frasco de cultivo mediante choque frío. Para ello, colocar el flask sobre hielo picado durante 10 min.
4. Retirar una alícuota del flask mezclarlo 1:1 con rojo Congo.
5. Colocar la mezcla en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y contar el número de trofozoítos.
6. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1  $\mu$ l y ajustar el número de trofozoítos a  $10^5$  en PBS 1x.
7. Añadir 10  $\mu$ l de la solución de  $10^5$  trofozoítos/ $\mu$ l a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de OCR. Se debe mantener la microplaca en hielo picado durante la preparación para que el crecimiento sea sincrónico en todos los pocillos.
8. Añadir 90  $\mu$ l del medio a estudiar.
9. Sellar cada pocillo con 100  $\mu$ l de aceite mineral para evitar el intercambio de oxígeno.
10. Incluir en la placa multipocillo sulfato cúprico a una concentración final en el pocillo de 0,1 mg/ml como control negativo y sulfito sódico a una concentración final en el pocillo de 0,01 mg/ml como control positivo.

11. Incubar la placa multipocillo en el lector de placas VICTOR® que está programado para obtener dos lecturas por pocillo cada hora durante 72 h. La fluorescencia (excitación a 340 nm / emisión a 642 nm) fue leída con un retraso de 30 y 70 microsegundos.
12. Transformar la fluorescencia obtenida a concentración de O<sub>2</sub> mediante la ecuación de Stern-Volmer.

#### **Estudios con placas OCR sobre el efecto de la ausencia de buffer HEPES en los mismos.**

1. Preparar el medio 39, tal y como se ha descrito previamente, pero sin añadir el buffer HEPES.
2. Preparar las placas de forma similar a lo expuesto en el apartado anterior.

#### **Ensayos de viabilidad por recuento manual.**

1. Estudio del crecimiento de *A. griffini* MYP2004 en los medios 5, 10, 27, 30, 35, 39, 54, 63, 69, 74, 78, 79 y 80.
2. Desprender los trofozoítos del frasco de cultivo mediante choque frío. Para ello, colocar el flask sobre hielo picado durante 10 min.
3. Retirar una alícuota y mezclar en proporción 1:1 con rojo Congo.
4. Colocar la mezcla en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y contar el número de trofozoítos.
5. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1 µl y ajustar el número de trofozoítos a 10<sup>5</sup> en PBS 1x.
6. Añadir 60 µl de la solución de 10<sup>5</sup> trofozoítos/µl a cada pocillo de una placa de 24 pocillos.
7. Añadir 540 µl del medio a estudiar.
8. Incubar la placa a la temperatura de crecimiento correspondiente de cada cepa.
9. Realizar el recuento manual a las 24 h, 3 y 7 días. Para ello, despegar los trofozoítos de los pocillos mediante choque frío, retirar una alícuota que se mezcla con rojo Congo y se cuenta en la cámara de recuento.

**Ensayos de crecimiento en los medios 39 y 80.**

1. Estudio del crecimiento en los medios 39 y 80 de las cepas que se muestran en la **Tabla 2.10**.
2. Emplear como inóculo los trofozoítos en fase de crecimiento exponencial. Despegar los protozoos del flask mediante choque térmico (frío). En el caso de la cepa ISCIII-UAH 64/13 se parte de un cultivo clonal en placa de agar con *E. coli* muerto, añadir 5 ml de PBS 1x y lavar la superficie del agar. De esta forma, los trofozoítos y quistes se desprenden del agar y quedan suspendidos en PBS 1x.
3. Retirar una alícuota y mezclar en proporción 1:1 con rojo Congo al 0,2 %. Colocar la mezcla en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal y contar el número de trofozoítos.
4. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1  $\mu$ l y ajustar el número de trofozoítos a  $10^5$  en PBS 1x.
5. Añadir 60  $\mu$ l de la solución de  $10^5$  trofozoítos/ $\mu$ l a cada pocillo de una placa de 24 pocillos.
6. Añadir 540  $\mu$ l del medio a estudiar.
7. Incubar la placa a la temperatura de crecimiento correspondiente de cada cepa.
8. Visualizar si hay crecimiento con la ayuda de un microscopio invertido al día 1, 3, 6 y 7 desde la inoculación.
9. Retirar cada semana el medio y añadir medio fresco, y observar el crecimiento mediante microscopio. Realizar este proceso durante 1 mes.

**Tabla 2.10.** Cepas empleadas en el ensayo de crecimiento en los medios 39 y 80 preparados con ingredientes provenientes de productos alimenticios elaborados en España.

ID CEPA	GENOTIPO Y ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA
ATCC - 30234	T4 - <i>A. castellanii</i>	PYG + 2% Bactositona / 25 °C
CCAP - 1501/1A	T4 - <i>A. castellanii</i>	PYG + 2% Bactositona / 25 °C
ATCC - 30171	<i>A. culbertsoni</i>	CERVA / 25 °C
CCAP - 1501/9	<i>A. astronyxis</i>	PYG + 2% Bactositona / 32 °C
2961	<i>A. polyphaga</i>	PYG + 2% Bactositona / 32 °C
BYB2017	T2	CERVA / 25 °C
MYP 2004	T3 - <i>A. griffini</i>	CERVA / 37 °C
ISCIII-UAH 64/13	T4B	CERVA / 32 °C
ISCIII-UAH 85/13	T4A	CERVA / 32 °C
ISCIII-UAH 66/14	T3	No / 37 °C
ISCIII-UAH 161/15	T4	CERVA / 32 °C
EV-UAH-P6	T4	PYG + 2% Bactositona / 32 °C
EV-UAH-V7	T4	PYG + 2% Bactositona / 32 °C
P-UAH-O3	T2	PYG + 2% Bactositona / 32 °C
PV-UAH-V2	T2	CERVA / 32 °C

### 3.6. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen austríaco

Se estudió la reproducibilidad del cultivo de distintos aislados de *Acanthamoeba* spp. usando los medios 39 y 80, pero preparados con ingredientes austríacos para determinar si estos medios eran una herramienta eficaz para el mantenimiento de aislados amebianos en otros países, donde habría que utilizar marcas de ingredientes alternativos distintos a los españoles.

#### Material y reactivos empleados

- Microscopio invertido (Zeiss, Axiophot).
- Bisturí.
- Placas Petri.
- Flask de cultivo celulares T25 cm<sup>2</sup>.
- Pipetas estériles de 10 ml.
- Aparato auxiliar de pipeteado (Integra Pipetboy).
- Filtros de peonza o de jeringa de 0,22 µm (Sartorius).
- Filtros de peonza o de jeringa de 1,20 µm (Sartorius).
- Filtros de peonza o de jeringa de 5 µm (Sartorius).
- Tubos falcon de 50 ml estériles con faldón.
- Tubos falcon de 50 ml estériles sin faldón.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Agar (Oxoid, LP0011).
- Cloruro sódico (NaCl) (Merck, 1064040500).
- Extracto de levadura (BD, BD211929).
- Glucosa (Merck, 108342).
- Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck, RES20908-A702X).
- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck, P5655-100G).
- Mix de antibióticos.
- Medio Luria-Bertoni (Usb, 75851).
- Ácido 4-(2-hidroxietil-1-piperazino-etanosulfónico (HEPES) (Sigma, H-3375)
- Solución salina amortiguada por fosfatos de Dulbecco a 10x (PBS) (Sigma, D1408).
- Solución salina.
- Extracto de malta (Merck, 105391).
- Pastillas de *Fucus* y *Spirulina* (Deliplus®).
- Huevos de gallina (BILLA).
- Leche sin lactosa baja en grasa (Schärdinger).
- Pastillas de caldo de pollo (Maggi): Se disolvieron 25 g en 100 ml.
- HCl 1M.

## Metodología

### Ensayos de crecimiento en los medios 39 y 80 realizados con ingredientes de origen austriaco.

1. Estudio del crecimiento en los medios 39 y 80 de cepas pertenecientes a la colección del laboratorio de Parasitología Molecular de Medizinische Universität Wien, algunas de estas cepas no son cultivables en medios axénicos como se indica en la **Tabla 2.11**:

**Tabla 2.11.** Lista de cepas empleadas en el ensayo de crecimiento en los medios 39 y 80 preparados con ingredientes austriacos.

ID CEPA	GENOTIPO Y ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA
Zoo 8	T11 – <i>Acanthamoeba</i> sp.	No / 25 °C
118 M <sub>1</sub>	T5 – <i>A. lenticulata</i>	No / 25 °C
Bud9	T12 – <i>Acanthamoeba</i> sp.	No / 25 °C
Pb 40	T – <i>A. comandoni</i>	No / 25 °C
A1PW	<i>Paravahlkampfia ustiana</i>	No / 25 °C
Bud4	<i>Naegleria</i> sp.	No / 25 °C
HC	<i>Harmanella cantabrigiensis</i>	No / 25 °C
Nek 15	T3 – <i>Acanthamoeba</i> sp.	No / 25 °C
AFR 4/15	T13 – <i>Acanthamoeba</i> sp.	No / 25 °C
Casino	T15 – <i>Acanthamoeba</i> sp.	No / 25 °C
Wir 17	T4 – <i>Acanthamoeba</i> sp.	PYG / 25 °C
Neh 17	<i>Acanthamoeba</i> sp.	No / 25 °C
Neff	T4 – <i>A. castellanii</i>	PYG / 25 °C
Str17	T4 – <i>Acanthamoeba</i> sp.	PYG / 25 °C

2. En Austria se utilizaron como inóculo quistes de *Acanthamoeba* spp. en lugar de trofozoítos. Añadir 5 ml de HCl 1 M a un cultivo clonal en placa de agar con *E. coli* vivo, y lavar la superficie del agar. De esta forma, los trofozoítos y quistes se desprenden del agar, los trofozoítos se eliminan con HCl.
3. Centrifugar 10 min a 100 x g. Resuspender el pellet en 5 ml de PBS 1x. Realizar dos lavados con PBS 1x.
4. Retirar una alícuota y realizar el recuento de quistes en la cámara Fuchs-Rosenthal.
5. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de quistes que hay en 1 µl y ajustar el número de quistes a 10<sup>3</sup> en PBS 1x.
6. Añadir 60 µl de la solución de 10<sup>3</sup> quistes/µl a cada pocillo de una placa de 24 pocillos.
7. Añadir 540 µl del medio a estudiar.
8. Incubar la placa a la temperatura de crecimiento correspondiente de cada cepa.
9. Visualizar si hay crecimiento con la ayuda de un microscopio invertido al día 1, 3, 6 y 7 desde la inoculación.
10. Retirar el medio de los pocillos cada semana y añadir medio fresco, el crecimiento se observa mediante microscopio. Se realiza durante 3 semanas.

### 3.7. Medios de enquistamiento

En la actualidad, la producción de quistes mediante medios de enquistamiento o por agotamiento de nutrientes del medio, es muy lenta, este proceso puede durar al menos 3 semanas y el número de quistes obtenido suele ser bajo. Por estos motivos, se propuso estudiar y diseñar medios de enquistamiento con mayor rendimiento, es decir, que primero promovieran la multiplicación de los trofozoítos de manera rápida para posteriormente enquistarse. Para ello, se comparó mediante recuento manual y visualización al microscopio el medio de enquistamiento Neff con medios que contienen extractos de suelo.

Se estudió la capacidad de enquistamiento de los medios SWE, SLBM, ScervaE y SpygE preparados a partir de suelo luvisol ródico-crómico obtenido de una zona con *Quercus coccifera* y *Q. petraea*. Estos medios se estudiaron en la cepa *A. castellanii* ATCC 30234, Neff y Str17 (excepto el medio ScervaE), *A. griffini* MYP2004 (excepto el medio SpygE).

#### Material y reactivos empleados

- Microscopio invertido (Motic AE21).
- Flask de cultivo celulares T25 cm<sup>2</sup>.
- Pipetas estériles de 10 ml.
- Aparato auxiliar de pipeteado (Accu-jet® e Integra Pipetboy).
- Tubos falcon de 50 ml estériles con faldón.
- Tubos falcon de 50 ml estériles sin faldón.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Placas de 24 pocillos.
- Filtros de peonza o de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm (Sartorius).
- Papel de filtro.
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- PBS 1X.
- Medio PYG.
- Medio CERVA.
- Medio Luria-Bertoni con extracto de malta.
- Medio Neff.
- Medio SWE.
- Medio SLBM.
- Medio ScervaE.
- Medio SpygE.
- Suelo luvisol ródico-crómico obtenido de una zona con *Quercus coccifera* en Alcalá de Henares (España) y suelo luvisol ródico-crómico obtenido de una zona con *Quercus petraea* en Viena (Austria).
- Cepas amebianas: *A. castellanii* ATCC 30234, Neff, Str17 y *A. griffini* MYP2004

## Metodología

### Preparación del medio Neff.

1. Añadir estos compuestos a un matraz para preparar 1 L (**Tabla 2.12**)

**Tabla 2.12.** Composición del medio de enquistamiento Neff. Los compuestos están en g para preparar 1 L.

Compuesto	Cantidad (g)
Amendiol	2,105
KCl	7,45
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,97
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06
NaHCO <sub>3</sub>	0,085

2. Ajustar el pH a 8,8.
3. Autoclavar durante 20 min a 121 °C.
4. Conservar a 4 °C durante 2 semanas.

### Preparación del medio SWE.

1. Tamizar el suelo pasándolo por un tamiz granulométrico con un diámetro de malla de 1 mm.
2. Mezclar este suelo con agua estéril destilada en una proporción 1:1 en tubos falcon sin faldón.
3. Colocar los tubos en un agitador orbital para su agitación a 50 rpm durante 10 min.
4. Centrifugar la mezcla a 2.000 *x g* durante 10 min.
5. Filtrar el sobrenadante con papel de filtro.
6. Centrifugar este filtrado durante 5 min a 10.000 *x g*.
7. Esterilizar el sobrenadante con un filtro de peonza o de jeringa con un diámetro de poro de 0,22 µm.
8. Conservar a 4 °C.

### Preparación del medio SLBM.

1. Tamizar el suelo pasándolo por un tamiz granulométrico con un diámetro de malla de 1 mm.
2. Mezclar este suelo con medio Luria-Bertani con extracto de malta en una proporción 1:1 en tubos falcon sin faldón.
3. Colocar los tubos en un agitador orbital para su agitación a 50 rpm durante 10 min.
4. Centrifugar la mezcla a 2.000 *x g* durante 10 min.
5. Filtrar el sobrenadante con papel de filtro.
6. Centrifugar este filtrado durante 5 min a 10.000 *x g*.
7. Esterilizar el sobrenadante con un filtro de peonza o de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm.
8. Conservar a 4 °C.



**Preparación del medio ScervaE.**

1. Tamizar el suelo pasándolo por un tamiz granulométrico con un diámetro de malla de 1 mm.
2. Mezclar este suelo con el medio CERVA en una proporción 1:1 en tubos falcon sin faldón.
3. Colocar los tubos en un agitador orbital para su agitación a 50 rpm durante 10 min.
4. Centrifugar la mezcla a 2.000 x g durante 10 min.
5. Filtrar el sobrenadante con papel de filtro.
6. Centrifugar este filtrado durante 5 min a 10.000 x g.
7. Esterilizar el sobrenadante con un filtro de peonza o de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm.
8. Conservar a 4 °C.

**Preparación del medio SpygE.**

1. Tamizar el suelo pasándolo por un tamiz granulométrico con un diámetro de malla de 1 mm.
2. Mezclar este suelo con el medio PYG + bactocasiona en una proporción 1:1 en tubos falcon sin faldón.
3. Colocar los tubos en un agitador orbital para su agitación a 50 rpm durante 10 min.
4. Centrifugar la mezcla a 2.000 x g durante 10 min.
5. Filtrar el sobrenadante con papel de filtro.
6. Centrifugar este filtrado durante 5 min a 10.000 x g.
7. Esterilizar el sobrenadante con un filtro de peonza o de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm.
8. Conservar a 4 °C.

**Ensayo de enquistamiento.**

1. Emplear cultivos en crecimiento exponencial. Despegar los trofozoítos de estos cultivos por choque frío.
2. Centrifugar 10 min a 100 x g. Resuspender el pellet en 5 ml de PBS 1x. Realizar dos lavados con PBS 1x.
3. Retirar una alícuota y realizar el recuento de quistes en la cámara Fuchs-Rosenthal.
4. Aplicar la fórmula de la cámara para determinar el número de trofozoítos que hay en 1 µl y ajustar el número de trofozoítos a 10<sup>5</sup> en PBS 1x.
5. Añadir 60 µl de la solución de 10<sup>5</sup> trofozoítos/µl a cada pocillo de una placa de 24 pocillos.
6. Añadir 540 µl del medio a estudiar.
7. Incubar la placa a la temperatura de crecimiento correspondiente de cada cepa.
8. Visualizar si hay enquistamiento con la ayuda de un microscopio invertido al día 1, 3 y 7 desde la inoculación.
9. Realizar recuento manual en cada uno de los tiempos establecidos. Para ello, retirar una alícuota y realizar el recuento de número de trofozoítos y quistes en la cámara Fuchs-Rosenthal.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Toma de muestras

Durante los años 2013 - 2015 se recibieron en el Instituto de Salud Pública Carlos III 6 muestras procedentes de pacientes con una alta sospecha de padecer queratitis amebiana. Estas 6 muestras fueron cedidas al laboratorio de Parasitología de la Universidad de Alcalá. Tres de las muestras pertenecían a pacientes no usuarios de lentes de contacto y las otras 3, a pacientes portadores de lentillas (**Tabla 2.13**).

**Tabla 2.13.** Lista de muestras clínicas obtenidas durante los años 2013 - 2015, con indicación de pertenencia o no al grupo de portadores de lentes de contacto.

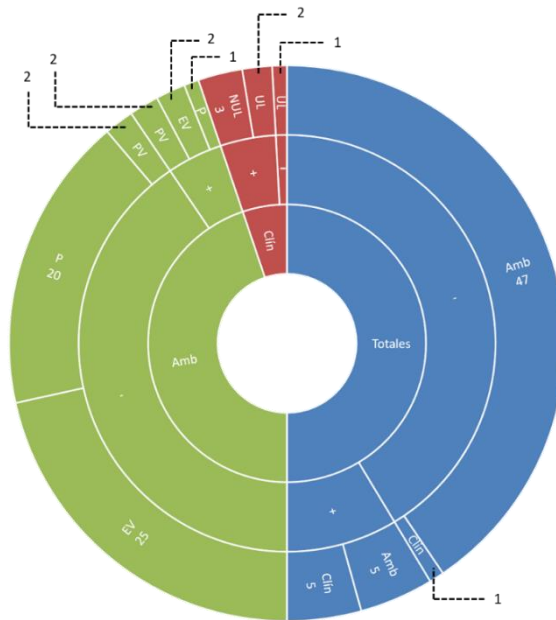
<i>ID Cepa</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Portador de lentillas</i>	<i>Positivo</i>
<i>ISCIU-UAH 6/13</i>	Exudado corneal	No	No
<i>ISCIU-UAH 64/13</i>	Líquido de lentillas	Sí	Sí
<i>ISCIU-UAH 85/13</i>	Exudado corneal	No	Sí
<i>ISCIU-UAH 66/14</i>	Líquido de lentillas	Sí	Sí
<i>ISCIU-UAH 161/15</i>	Exudado corneal	No	Sí
<i>ISCIU-UAH 163/15</i>	Exudado corneal	No	Sí

El número de muestras recibidas durante dos años en el Instituto de Salud Pública Carlos III fue bajo, debido a que la queratitis amebiana no es una enfermedad de declaración obligatoria en España (BOE, 2015 Real Decreto 2210/1995.). Además, es una patología poco conocida entre el colectivo médico, de sintomatología similar a la causada por el virus Herpes simple o algunos adenovirus (Khan, 2006). Todos estos factores contribuyen a que pocos pacientes sean diagnosticados de queratitis amebiana y por ende que lleguen pocas muestras al ISCIU.

De los limnoembalses de la Comunidad de Castilla y La Mancha, se tomaron un total de 52 muestras. De estas 52 muestras, 27 se tomaron en el embalse El Vicario, recogiendo 7 muestras en cada estación del año, excepto en otoño que sólo se obtuvieron 6 muestras. Cada estación del año, se tomaron muestras de distintos puntos del embalse, denominándolas EV-UAH-xy, siendo "x" un número del 1 al 7 que indica en que zonas del embalse se tomó (**Figura 2.1**). Por su parte, la "y" indica la estación del año en que se muestreó, siendo invierno la letra "I", primavera la letra "P", verano la letra "V" y otoño, la letra "O". De la Presa Verde sólo recogieron 4 muestras: dos en primavera (PV-UAH-1P y PV-UAH-2P) y otras dos en verano (PV-UAH-1V y PV-UAH-2V). El limnoembalse de Pareja se muestreó 21 veces: 5 en primavera (P-UAH-xP), verano (P-UAH-xV) y otoño (P-UAH-xO), mientras que en invierno se recogieron 6 muestras (P-UAH-xI).

## 4.2. Aislamiento de cepas amebianas

Se consiguieron aislar amebas de un total de 10 muestras (17,24 %), de las cuales 5 son procedentes de pacientes y las otras 5 de limnoembalses (**Figura 2.4**). El porcentaje de muestras positivas es mayor en las de origen clínico (83,33 %) que en las de origen ambiental (9,61 %). Sin embargo, estas cifras no quieren decir que sea más frecuente aislar amebas de vida libre en pacientes que en el ambiente, sino que las muestras recibidas del ISCIII habían sido enviadas por hospitales de diferentes partes de España con alta sospecha de ser positivas. En cambio, en los limnoembalses no se había realizado ningún estudio previo.



**Figura 2.4.** Esquema y número de las muestras recogidas. -: muestras negativas; +: muestras positivas; Amb: muestras ambientales; Clín: muestras clínicas; NUL: muestras procedentes de pacientes no usuarios de lentillas; UL: muestras procedentes de pacientes usuarios de lentillas; EV: limnoembalse El Vicario; P: limnoembalse de Pareja; PV: limnoembalse de Presa Verde.

De las 5 muestras positivas de origen clínico, 3 proceden de pacientes no portadores de lentillas (ISCIII-UAH 85/13, ISCIII-UAH 161/15 e ISCIII-UAH 163/15) y las otras dos, sí que pertenecen a pacientes usuarios de lentes de contacto (ISCIII-UAH 64/13 e ISCIII-UAH 66/14). Esto está en contradicción con la bibliografía existente, donde son más frecuente los casos de queratitis amebiana en personas que usan lentillas (Pacella et al., 2013), pero el número de muestras que se han analizado es bajo y no es representativo. No hay estudios previos ni revisiones bibliográficas de los casos de queratitis amebiana en España, como se ha realizado en otros países como Austria (Walochnik et al., 2014) y en naciones como Hong-Kong (Lam et al., 2002) y Escocia (Seal et al., 1999). Es por eso por lo que se desconoce la incidencia de la queratitis amebiana en nuestro país. Además, en los casos estudiados en este trabajo no se tiene

información de si estos pacientes tenían algún daño en la córnea o si habían estado expuestos a una fuente de riesgo. Por el contrario, sí que se han descrito casos de pacientes portadores de lentillas y no portadores con queratitis amebiana en España, con caracterización de las cepas aisladas de estos casos (Lorenzo-Morales et al., 2007; Lorenzo-Morales et al., 2011; Magnet et al., 2012; Arance-Gil et al., 2014; Heredero-Bermejo et al., 2014). Gomes et al., (2016) realizaron un estudio en las lentillas y soluciones de limpieza de lentillas en individuos sanos en Madrid. En la investigación se encontró ADN de *Acanthamoeba* spp. en el 49,2 %, pero sólo se consiguió un aislado en una sola muestra y ninguno de los individuos presentaba síntomas de queratitis, por lo que, este último estudio no presenta resultados relevantes en la incidencia de queratitis amebiana. Es necesario que se desarrollen estudios exhaustivos con la colaboración del colectivo sanitario, que notifiquen todos los casos de queratitis amebianas y envíen las muestras al ISCIII para que se realice una caracterización de las amebas presentes en dichas muestras. Este tipo de estrategia se intentó llevar a cabo con el proyecto FIS PI13/01106 “Protozoonosis emergentes: nuevo desarrollo de técnicas de diagnóstico, epidemiología molecular y aproximaciones terapéuticas”, pero desgraciadamente no se consiguió que el colectivo sanitario informara de dichos casos, es más, sólo unos pocos hospitales colaboraron.

De los limnoembalses de la Comunidad de Castilla y La Mancha, se tomaron un total de 52 muestras de las cuales 5 se consiguieron aislar en cultivo xénico. De estas cinco, dos se aislaron del embalse El Vicario en primavera (EV-UAH-6P) y verano (EV-UAH-7V). Otras dos fueron aisladas de Presa Verde, ambas en verano (PV-UAH-1V y PV-UAH-2V). La última, se aisló del limnoembalse de Pareja, en otoño (P-UAH-3O). Todas las cepas aisladas se recogieron de la superficie, excepto PV-UAH-2V y P-UAH-3O que se recogieron a 2 y 5 m de profundidad, respectivamente. Las cepas aisladas pertenecían a muestras recogidas en las estaciones de primavera, verano y otoño, siendo verano la estación en la que más cepas se aislaron. En estudios previos realizados en España, se han aislado AVL de fuentes públicas de agua de consumo humano (Paniagua et al., 1990), de aguas termales de balneario (Penas-Ares et al., 1993), de estuarios (Lloves et al., 1996), de torres de refrigeración (Heredero-Bermejo et al., 2012), de agua del grifo, de agua del mar (Lorenzo-Morales et al., 2005a), de aguas procedentes de plantas de tratamiento de agua potable y de aguas residuales (Magnet et al., 2012; Magnet et al., 2013) e incluso del suelo (Lorenzo-Morales et al., 2005b; Reyes-Batlle et al., 2014; Reyes-Batlle et al., 2016).

La influencia de factores climáticos sobre la presencia del género *Acanthamoeba* en diferentes lagos de EE.UU. fue estudiada por John y Howard (1995), observándose una correlación entre las estaciones y el crecimiento de *Acanthamoeba* spp., siendo mayores las poblaciones amebianas en primavera y principios de verano. En Madrid, Magnet et al., (2013) estudiaron la estacionalidad de *Acanthamoeba* spp. en aguas de plantas de tratamiento de agua potable y de aguas residuales. A diferencia del estudio de John y Howard, los autores españoles no encontraron relación entre la presencia de amebas y las estaciones del año. En el caso de los embalses de Castilla La Mancha estudiados en el presente trabajo de tesis doctoral, sí que se observa una estacionalidad, siendo primavera y verano las estaciones del año donde más puntos fueron positivos, aunque hay que resaltar que el número de aislados es bajo y, por tanto, esta relación puede no ser representativa.

### 4.3. Cultivo de las cepas aisladas

Las diez cepas amebianas que se aislaron, y posteriormente clonaron (obtención de una población a partir de un único trofozoíto o quiste), se cultivaron en medios líquidos axénicos. Los medios que se emplearon fueron el medio PYG suplementado con 2 % de bactocasitona y el medio CERVA, ya que estos medios son los que se usan habitualmente en el laboratorio de Parasitología de la UAH porque en un estudio previo de Heredero-Bermejo et al., (2012) se demostró que eran los que mejor rendimiento mostraban.

De las 10 cepas, 9 crecieron en los medios axénicos, ya sea en ambos medios o sólo en uno (**Tabla 2.14**).

**Tabla 2.14.** Crecimiento en los medios axénicos de las cepas aisladas de muestras clínicas y ambientales.

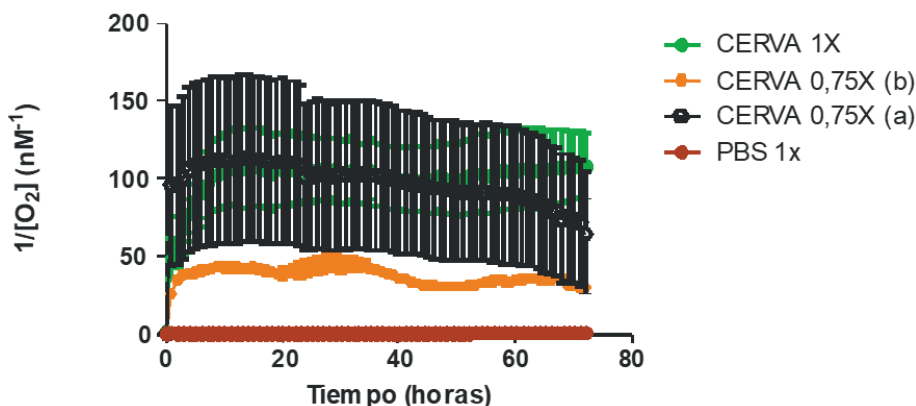
Cepa	Medio PYG+B	Medio CERVA
ISCIU-UAH 64/13	Sí	Sí
ISCIU-UAH 85/13	Sí	Sí
ISCIU-UAH 66/14	No	No
ISCIU-UAH 161/15	No	Sí
ISCIU-UAH 163/15	Sí	No
EV-UAH-6P	Sí	No
EV-UAH-7V	Sí	No
PV-UAH-1V	No	Sí
PV-UAH-2V	No	Sí
M-UAH-30	No	Sí

La cepa ISCIU-UAH 66/14 no creció en ninguno de los medios que se usan habitualmente en el laboratorio. En la bibliografía se han descrito más cepas de *Acanthamoeba* que no crecen en medios axénicos, o como las hemos denominado cepas fastidiosas (De Jonckheere, 1980; Hiti et al., 2001; Nagyová et al., 2010; Martín-Pérez et al., 2017). En la mayoría de los casos, el cultivo de estas cepas se mantiene en medios xénicos (placas de agar cubiertas de *E. coli*) que dificulta la realización de estudios de caracterización, de citopatogenia y de sensibilidad a fármacos. Por ello, se intentó cultivar el aislado ISCIU-UAH 66/14 en otros medios axénicos empleados en el cultivo de microorganismos procariontes o eucariotes tales como BHI, HAM, Grace's Insect Medium, DMEM y TSB (Martín-Pérez et al., 2017).

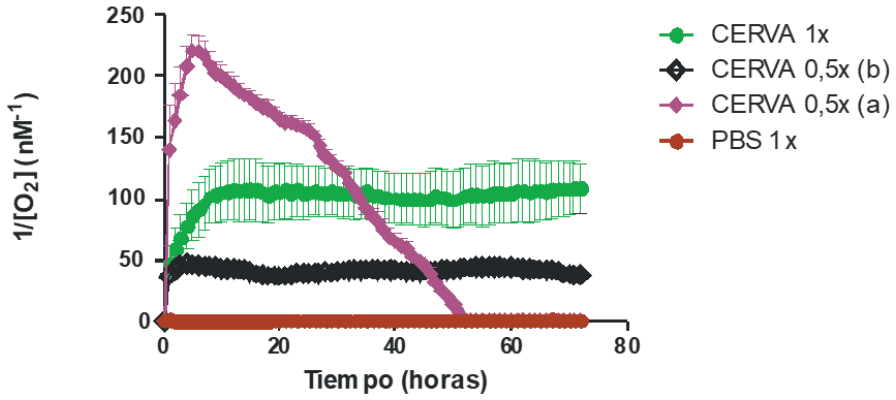
Desafortunadamente, el aislado no creció en ninguno de estos medios. Así pues, se diseñaron empíricamente medios de cultivo indefinidos basados en leche, caldo de pollo, caldo de pescado, huevo y otros ingredientes habituales en los supermercados. Estos medios se nombraron medio 1, medio 2, medio 3 y así sucesivamente, hasta el medio número 80 (Martín-Pérez et al., 2018) y se probó su eficacia (**Figura 2.3**).

#### 4.4. Estudio del perfil respiratorio como sistema para el cribado de nuevos medios de cultivo de *Acanthamoeba* spp.

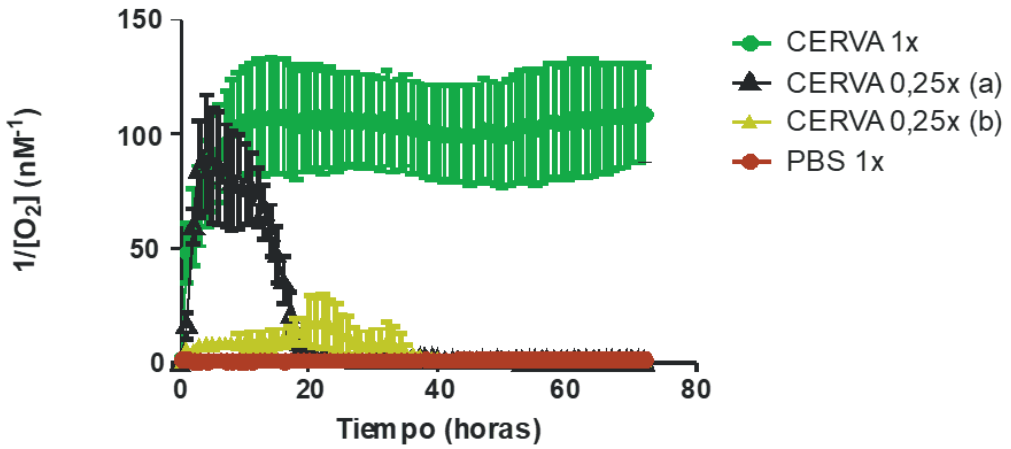
Para determinar si la cepa de difícil crecimiento crecía en los nuevos medios diseñados, de forma previa se realizó un estudio de viabilidad de la cepa *A. griffini* MYP2004 usando placas OCR como herramienta para constatar su desarrollo. Para saber si un perfil respiratorio determinado está asociado a un medio que permite un buen crecimiento, fue preciso conocer los perfiles respiratorios obtenidos en el medio estándar (CERVA) pero en distintas condiciones. Para ello se usó tanto el medio completo, como diluido con agua destilada, con el fin de simular condiciones óptimas y subóptimas de crecimiento. Paralelamente se realizaron estudios de viabilidad por recuento manual. En base a todos estos datos, se intentó identificar los perfiles respiratorios asociados a crecimiento óptimo. En la práctica, el estudio consistió en cultivar *A. griffini* MYP2004 en el medio CERVA puro o diluido al 0,75; 0,5; 0,25; 0,12 o 0,06x y correlacionar el crecimiento observado por placas OCR (Figura 2.5 a Figura 2.9) con el observado por recuento manual (Figura 2.10).



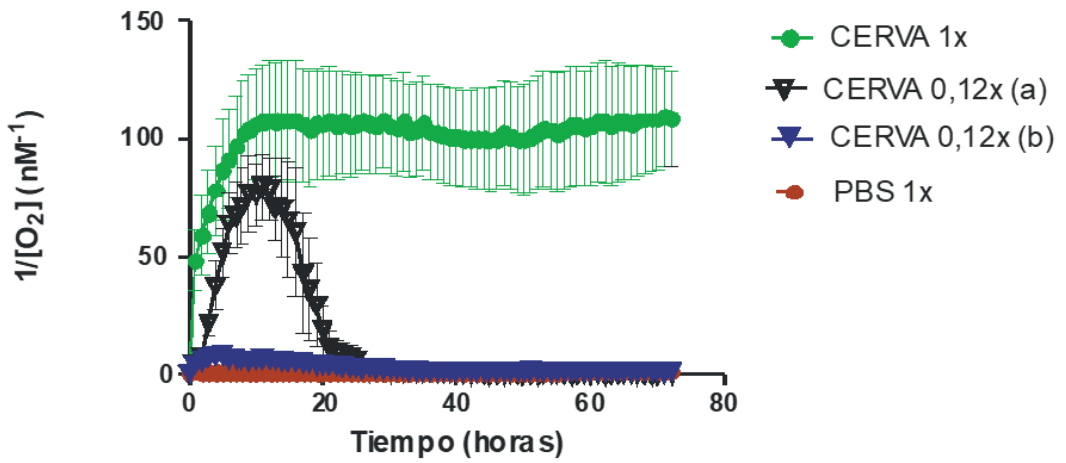
**Figura 2.5.** Respiración de *A. griffini* MYP2004 cultivada en medio CERVA a dilución 0,75x. Los datos de fluorescencia se han convertido en  $[1/O_2]$ .



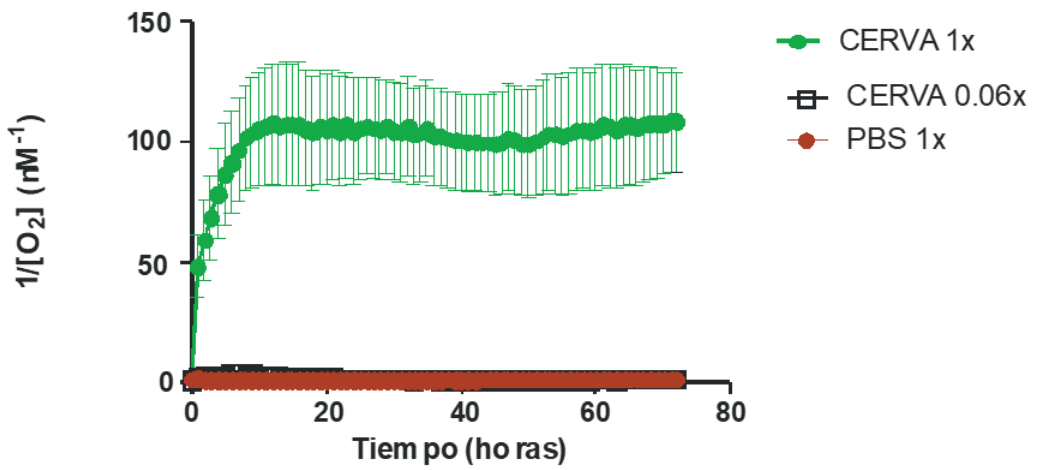
**Figura 2.6.** Respiración de *A. griffini* MYP2004 en medio CERVA a dilución 0,5x. Los datos de fluorescencia se han convertido en  $[1/O_2]$ .



**Figura 2.7.** Respiración de *A. griffini* MYP2004 cultivada en medio CERVA a dilución 0,25x. Los datos de fluorescencia se han convertido en  $[1/O_2]$ .

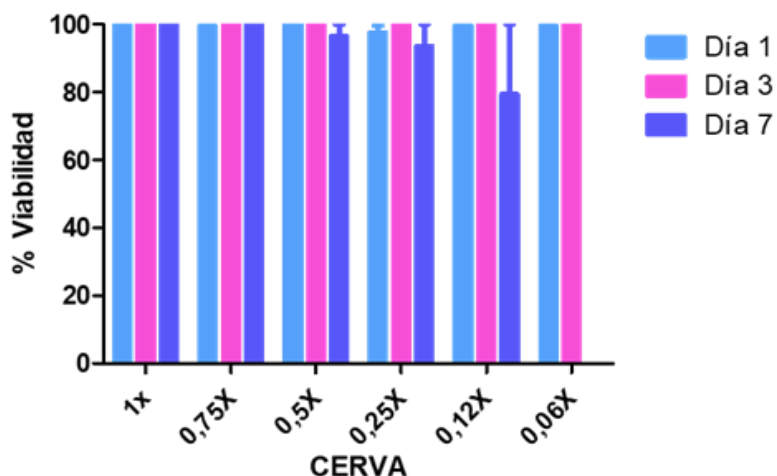


**Figura 2.8.** Respiración de *A. griffini* MYP2004 cultivada en medio CERVA a dilución 0,12x. Los datos de fluorescencia se han convertido en  $[1/O_2]$ .



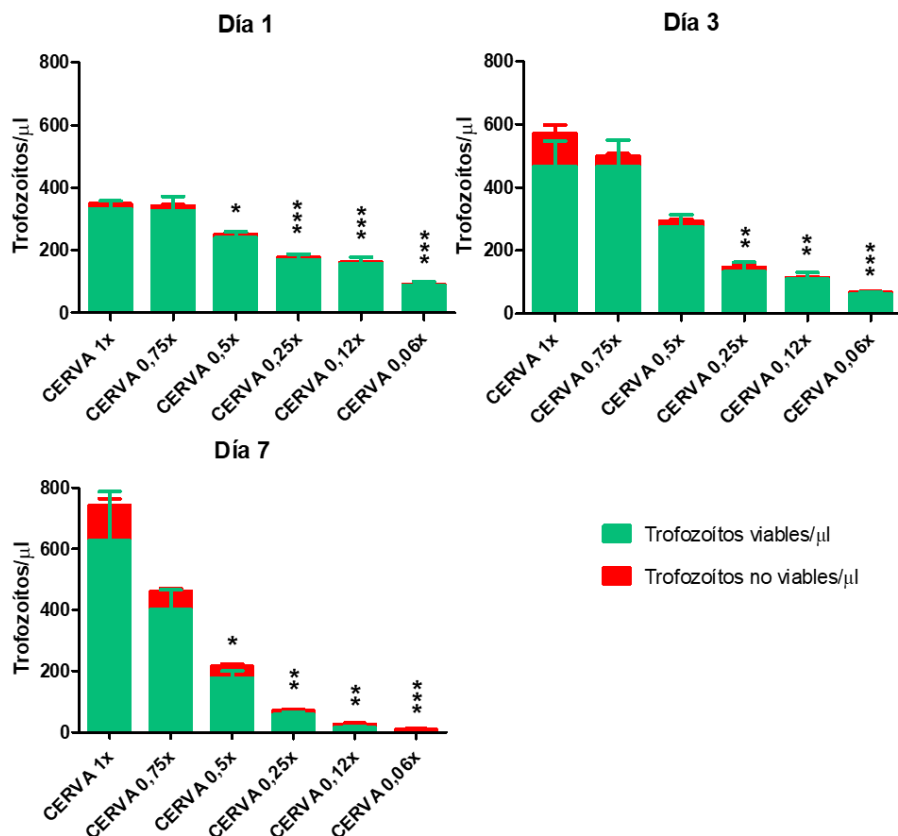
**Figura 2.9.** Respiración de *A. griffini* MYP2004 cultivada en medio CERVA a dilución 0.6x. Los datos de fluorescencia se han convertido en  $[1/O_2]$ .





**Figura 2.10.** Porcentaje de viabilidad de *A. griffini* MYP2004 cultivada en medio CERVA a distintas concentraciones.

*A. griffini* MYP2004 cultivado en CERVA 1x mostró un consumo de oxígeno que aumentaba exponencialmente. A este tipo de perfil se le denominó perfil respiratorio 1 (PR1). Cuando se cultivó en concentraciones bajas como 0,75x y 0,5x aparecieron unas curvas de respiración incrementadas (PR2a y PR3a) o disminuidas (PR2b y PR3b) y ambos tipos de perfiles mostraron una disminución del consumo de oxígeno a las 60 - 65 horas. Como es de esperar, el recuento manual reveló que el crecimiento de *A. griffini* MYP2004 era menor en los medios 0,75x y 0,5x comparados con el CERVA 1x, apareciendo en este último un mayor número de trofozoítos (**Figura 2.11**), pero el porcentaje de trofozoítos viables es el mismo (**Figura 2.10**). No obstante, a los 7 días de cultivo se observó un número de trofozoítos similar en los medios 1x y 0,75x ( $P > 0,1$ ). Cuando se cultivaron las amebas en medios pobres en nutrientes, como 0,25x y 0,12x, se observaron dos tipos de perfiles respiratorios: el primero, un incremento rápido en el consumo de oxígeno seguido de una disminución a nivel basal en 24 - 30 h (PR4); y el segundo, un consumo lento seguido de una fase estacionaria y finalmente un decrecimiento llegando a niveles basales en 45 h (PR5). El recuento manual reveló una disminución del número de trofozoítos a estas concentraciones ( $p < 0,005$ ). En la concentración 0,06x se observó un único perfil respiratorio (PR6), donde el consumo de oxígeno fue similar al obtenido en el control negativo (PBS 1x), excepto al inicio de la incubación que fue ligeramente mayor. A los 7 días de incubación a esta concentración, no se observaron trofozoítos viables.



**Figura 2.11.** Recuento manual del número de trofozoítos viables y no viables de *A. griffini* MYP2004 por  $\mu\text{l}$  cultivados a distintas concentraciones de CERVA. a. Número de trofozoítos en el primer día de cultivo. b. Número de trofozoítos en el tercer día de cultivo. c. Número de trofozoítos en el séptimo día de cultivo. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ; \*\*\*:  $p < 0,0005$ .

Con estos resultados, se determinó que los perfiles respiratorios que corresponden a un crecimiento óptimo son el PR1, PR2a y PR2b. Conociendo estos datos, se cultivó *A. griffini* MYP2004 en los medios de cultivo del 1 al 80 y se evaluó su perfil respiratorio por OCR (**Tabla 2.15**). Como puede verse, un total de 17 medios se corresponden al PR1 y 10 al PR2 y, cómo se observó con el medio CERVA, estos perfiles se corresponden a un crecimiento óptimo de la cepa. No existe en la literatura científica ningún trabajo que estudie el perfil respiratorio del género *Acanthamoeba* dependiendo de las condiciones de cultivo, los estudios de crecimiento en los medios de cultivo están basados en el recuento manual (Heredero-Bermejo et al., 2012) o simplemente por observación microscópica (Bacon et al., 1993; Lorenzo-Morales et al., 2005a, b; Behera et al., 2016).

**Tabla 2.15.** Perfiles respiratorios de *A. griffini* MYP2004 cultivada en los medios de cultivo del 1 al 80.

<b>Perfil respiratorio</b>	<b>Medios de cultivo</b>
1	26, 27, 29, 30, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 50, 51, 53, 69, 78, 79 y 80.
2	34, 61, 62, 63, 64, 65, 70, 71, 72 y 73.
3	6, 7, 8, 22, 23, 24, 25, 28, 31, 32, 33, 36, 41, 49, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 66, 67, 68, 75, 76 y 77.
4	4, 5 y 17.
5	10, 12, 43, 44, 45, 46, 47 y 48.
6	1, 2, 3, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 57 y 74.

#### **4.5. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen español**

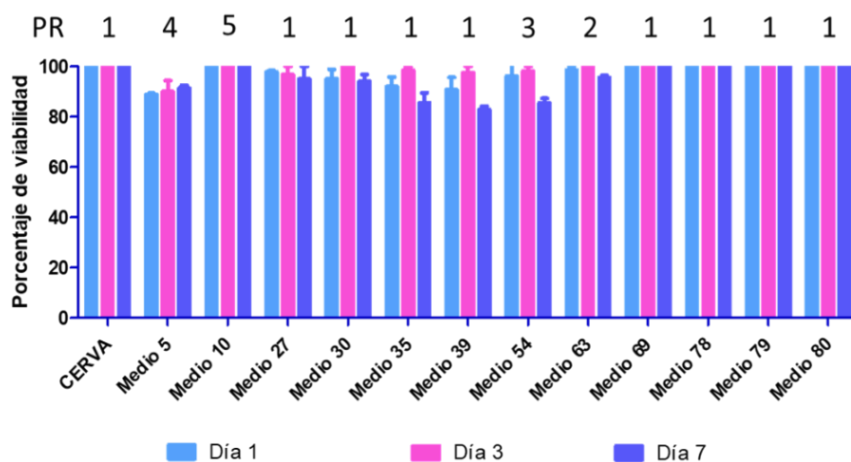
Este estudio se dividió a su vez en cuatro estudios: 1) determinación por recuento manual del número de trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 que crecieron en 12 medios de cultivo seleccionados en base a su perfil respiratorio. 2) evaluación del crecimiento por observación microscópica de 15 aislados de *Acanthamoeba* spp. en los 2 medios de cultivo que presentaron un mayor número de trofozoítos. 3) validación de la forma de conservación de los 2 medios de cultivo que presentaron mayor rendimiento. 4) importancia del buffer HEPES en los medios alternativos.

Los medios de cultivo que se seleccionaron no correspondían únicamente a los del PR1 y PR2, sino también de otros perfiles para corroborar que esos perfiles respiratorios corresponden a un crecimiento pobre de los aislados. Los medios que se evaluaron por recuento manual fueron los siguientes (**Tabla 2.6**):

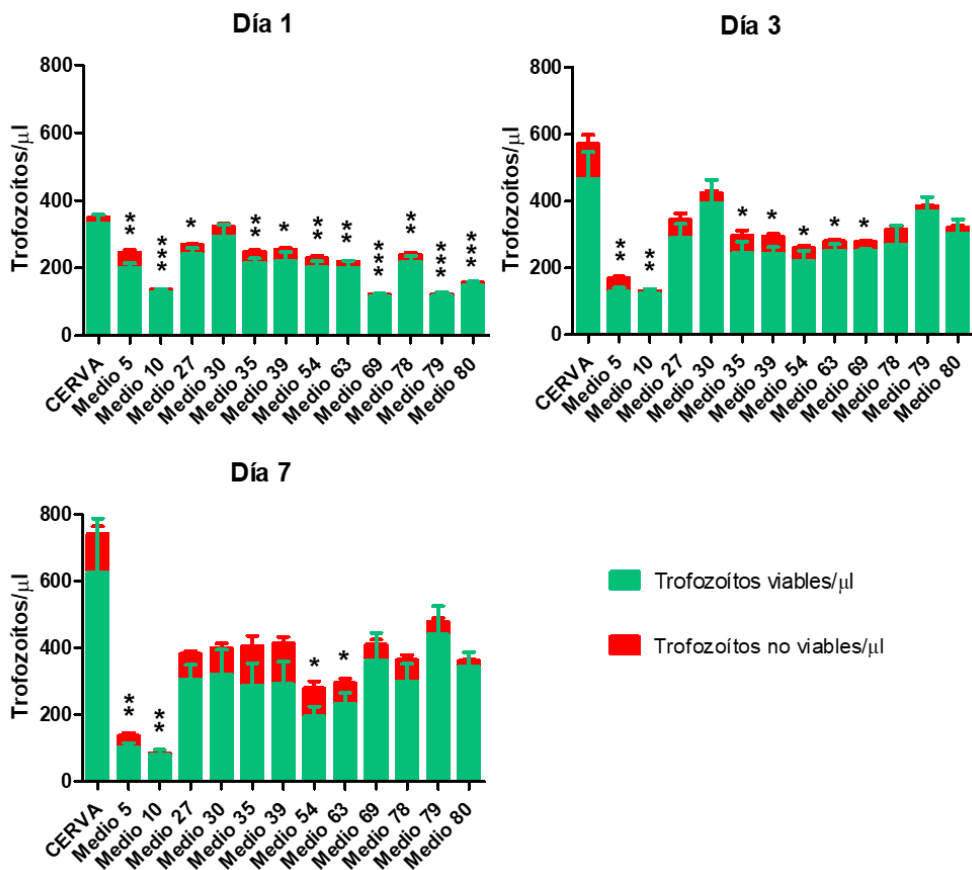
**Tabla 2.16.** Medios de cultivo seleccionados para su evaluación por recuento manual.

<b>Perfil respiratorio</b>	<b>Medios de cultivo</b>
1	27, 30, 35, 39, 69, 78, 79 y 80.
2	63.
3	54.
4	5.
5	10.

Como se observa en la **Tabla 2.16**, no se estudiaron todos los medios que tienen un perfil respiratorio de tipo 1 y 2, esto es debido a que algunos de los medios son iguales, lo único que cambia son las concentraciones de los componentes. Por ejemplo, el medio 26 y 27, sólo se estudió el medio 27, la diferencia entre ambos radica en la concentración del caldo de puchero y de LBM. El mismo caso, se da para los medios del 36 al 39, la diferencia entre ellos son las concentraciones del caldo de pollo y LBM. En los recuentos realizados se observó que los medios con PR1 permiten el crecimiento y división de mayor número de trofozoítos (**Figura 2.12** y **Figura 2.13**) siendo los óptimos el medio 39 y 80.



**Figura 2.12.** Porcentaje de viabilidad de trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 cultivada en distintos medios.

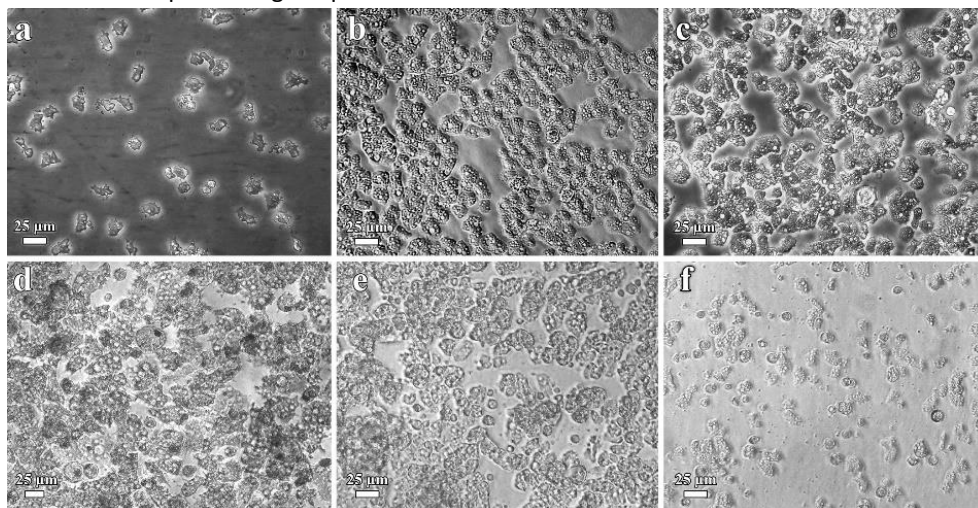


**Figura 2.13.** Recuento manual del número de trofozoitos viables y no viables de *A. griffini* MYP2004 por  $\mu\text{l}$  cultivados en distintos medios. **a.** Número de trofozoitos en el primer día de cultivo. **b.** Número de trofozoitos en el tercer día de cultivo. **c.** Número de trofozoitos en el séptimo día de cultivo. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ; \*\*\*:  $p < 0,0005$ .

Comparando los perfiles respiratorios y el recuento manual realizado a los 7 días, se concluyó que los medios con PR1 mostraron similar porcentaje de viabilidad y número de trofozoítos que los obtenidos en el medio CERVA 1x ( $P>0,1$ ), mientras que los PR2 y PR3 (medio 54 y 63) mostraron un crecimiento reducido comparado con el control ( $p<0,05$ ). En los medios con perfiles respiratorios 4 y 5 se observó una rápida pérdida de viabilidad y disminución de número de trofozoítos ( $p<0,01$ ).

El crecimiento de *A. griffini* MYP2004 en los diferentes medios de cultivo que contienen caldos comerciales combinado con LBM y LSL (medios 26, 27, 29, 30, 35, 37, 38, 39, 40 y 42) mostraron un perfil respiratorio de tipo 1, igual que el medio CERVA sin diluir. Los medios que contienen caldo de pollo casero (medios 50, 51 y 52) mostraron un rendimiento similar a los medios que contienen caldo de pollo comercial (medios 37 - 42). Al contrario, los medios preparados con caldo de mejillón (medios 53 - 58) mostraron menos rendimiento que los medios que contenían caldos de carne y verduras. Por otro lado, los medios 69, 78, 79 y 80 preparados con combinaciones de yema de huevo y extracto de *Spirulina/Fucus* en vez de ser preparados con LSL, también permiten un crecimiento óptimo de *A. griffini* MYP2004.

Dado que los medios 39 y 80 presentaron un mejor rendimiento, se cultivaron en ellas todas las cepas del laboratorio de Parasitología de la UAH, incluida la cepa (ICSIII-UAH 66/14). Esta cepa presentó crecimiento a 32 °C en estos dos medios, el desenquistamiento se produjo en el primer día de cultivo y se estableció el crecimiento a los 4 - 6 días desde la inoculación. Si a los 2 - 3 días, el medio no se renovaba, este aislado tendía a enquistarse de nuevo. Respecto, al resto de cepas que se cultivan en los medios habituales, se observó también crecimiento en los medios 39 y 80 (Tabla 2.17 y Figura 2.14), si a los 7 días no se cambiaba el medio de cultivo, estos aislados tendían a enquistarse igual que en los medios habituales.

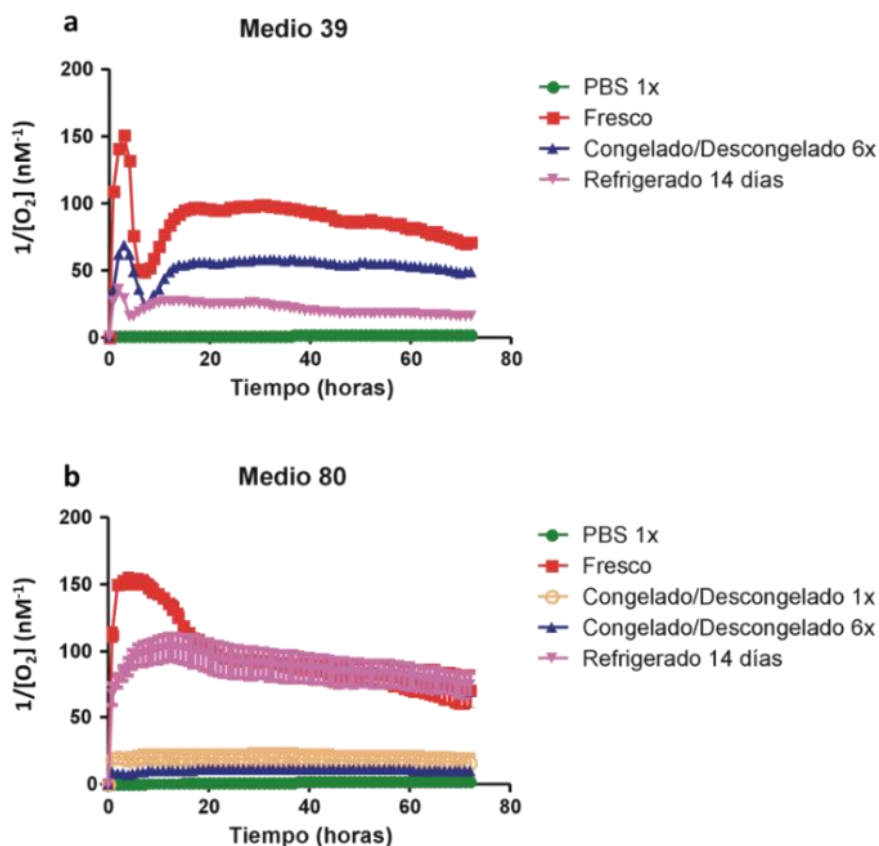


**Figura 2.14.** Fotografías tomadas al microscopio de contraste de fases a 200x de distintas cepas de *Acanthamoeba*. **a.** Trofozoítos de ISCSIIIUAH 66/14 en el medio 39. **b.** Trofozoítos de *A. castellanii* CCAP 1501/1A cultivados en el medio 39. **c.** Trofozoítos de *A. castellanii* CCAP 1501/1A cultivados en el medio 80. **d.** Trofozoítos de *A. astronyxis* CCAP 1501/9 cultivados en el medio 80. **e.** Trofozoítos de la cepa BYB2017 cultivados en el medio 39. **f.** Trofozoítos de EV-UAH-P6 cultivados en el medio 39.

**Tabla 2.17.** Crecimiento de las cepas disponibles en el laboratorio de Parasitología de la uah en el medio 39 y 80. Siendo -: No se observa crecimiento. +: 10 - 25 % de monocapa. ++: 25 - 50 % de monocapa. +++: 50 - 90 % de monocapa. ++++: monocapa en total confluencia. Q: Se observan quistes.

	Medio 39										Medio 80						
	Día 1	Día 3	Día 6	Día 7	Día 10	Día 15	Día 20	Día 27	Día 1	Día 3	Día 6	Día 7	Día 10	Día 15	Día 20	Día 27	
<i>A. castellanii</i> CCAP 1501/1A	+++	++++	++	+++	++	++/Q	+/Q	Q	+++	++++	++	++	++/Q	+	Q	Q	
<i>A. culbertsoni</i> ATCC 30171	+++	++	+/Q	+	++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
BYB2017	+++	+++	+/Q	++/Q	Q	+	++	Q	+++	+++	++	+++	+/Q	+/Q	++/Q	+/Q	
<i>A. astronyxis</i> CCAP 1501/9	+++	++++	+++	++++	+++	++/Q	Q	Q	+++	+++	+++	+++	+++	+/Q	++	+	
<i>A. polyphaga</i> 2961	+++	++	+++	+++	+++	++/Q	+++	++/Q	+++	+++	+++	+++	+/Q	+/Q	++/Q	+++	
ISCIH-UAH 85/13	+++	++	+++	+++	+++	++/Q	+++	Q	+++	+++	+++	+++	+/Q	+/Q	++	Q	
ISCIH-UAH 64/13	+++	++	+++	+++	+++	+++	Q	Q	+++	+++	+++	+/Q	Q	+++	+++	Q	
ISCIH-UAH 66/14	+	++/Q	+/Q	Q	Q	Q	Q	Q	+	++/Q	+/Q	Q	Q	Q	Q	Q	
ISCIH-UAH 161/15	++	+++	+++	++/Q	++/Q	++/Q	+/Q	Q	+++	+++	+++	+/Q	+/Q	+/Q	++	Q	
EV-UAH-V7	+++	+++	++	+++	Q	+/Q	+/Q	Q	+++	+++	+++	+++	+/Q	+/Q	Q	Q	
EV-UAH-P6	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+/Q	+/Q	+/Q	+/Q	
P-UAH-03	+++	+++	+++	++/Q	++/Q	+/Q	Q	Q	+++	+++	+++	+++	+/Q	+/Q	+/Q	Q	
PV-UAH-V2	++	+	+	+	Q	Q	+/Q	Q	++	++	+/Q	+/Q	Q	Q	+/Q	Q	

Se estudió además la forma óptima de conservar los dos medios seleccionados. Para ello se congelaron (a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y descongelaron 6 veces. De manera alternativa, también se mantuvieron refrigerados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante dos semanas. El medio 39 que contiene caldo de pollo, LBM y LFSM no se vio afectado por la congelación mientras que, al conservarlo a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se observó una disminución de crecimiento. En el caso del medio 80, que contiene yema de huevo y extractos de algas, mostró un mayor rendimiento cuando se mantiene en refrigeración durante 2 semanas que en congelación (Figura 2.15).



**Figura 2.15.** Perfil respiratorio *A. griffini* MYP2004 ( $\text{nM}^{-1}$ ). **a.** Consumo de oxígeno de *A. griffini* MYP2004 cultivada en el medio 39 fresco, congelado-descongelado 6 veces y refrigerado durante 14 días. **b.** Consumo de oxígeno de *A. griffini* MYP2004 cultivada en el medio 80 fresco, congelado-descongelado 6 veces y refrigerado durante 14 días.



Se preparó el medio 39 a partir de dos lotes diferentes de caldo comercial y de LSL. Estos dos medios, no mostraron ninguna diferencia en el crecimiento de *A. griffini* MYP2004 (Figura 2.16). También, se preparó el medio 39 sin buffer HEPES para determinar la importancia del mismo. El medio 39 sin buffer HEPES no permite el crecimiento de trofozoítos, lo cual indica que este componente es esencial para el crecimiento amebiano (Figura 2.16).

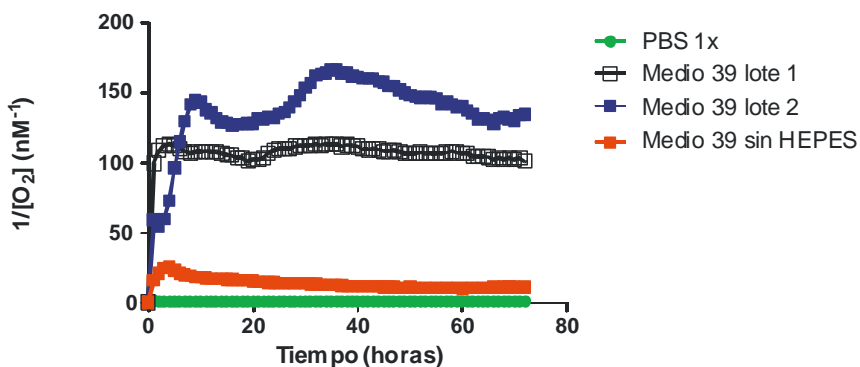


Figura 2.16. Perfil respiratorio de *A. griffini* MYP2004 ( $nM^{-1}$ ) cultivada en dos lotes del medio 39 y del medio 39 sin buffer HEPES.

#### 4.6. Estudio de los medios de cultivo realizados con ingredientes provenientes de productos alimenticios de origen austríaco

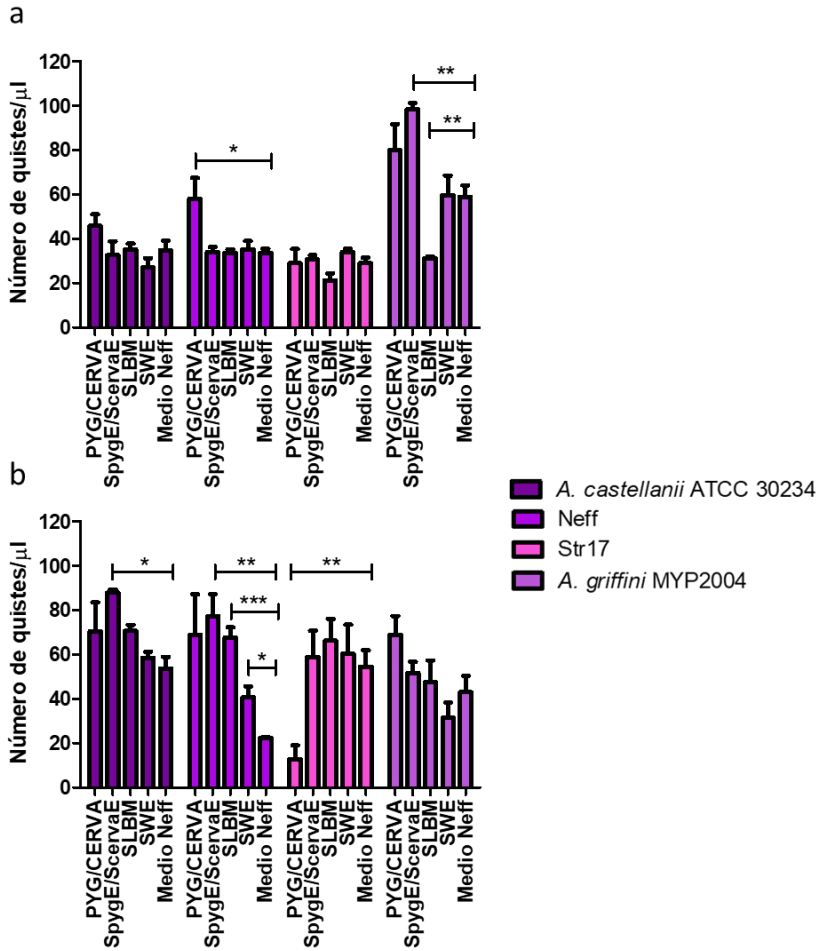
Los medios 39 y 80, se prepararon con ingredientes austríacos para verificar si estos medios se podían preparar en cualquier parte del mundo. En la **Tabla 2.18** se muestra el crecimiento observado microscópicamente de los aislados disponibles en el laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad Médica de Viena. Todos los aislados estudiados son fastidiosos (excepto 3 cepas), es decir, no crecen en los medios habituales. Las cepas que crecen en el medio PYG son Wir 17, Neff y Str17, pero solo se observó crecimiento de la cepa Neff en los medios 39 y 80. Respecto, a las cepas fastidiosas solo la cepa Casino creció en ambos medios, presentando un mejor crecimiento en el medio 39. La falta de crecimiento en el resto de las cepas no puede atribuirse a la poca idoneidad de los ingredientes austríacos dado que si fuera por este motivo no hubiese crecido ninguna de las cepas. Lamentablemente, los resultados sugieren que los medios 39 y 80 preparados con caldo granulado "Maggi" austríaco no son equivalentes a los preparados con caldos en tetrabrik disponibles en España. Esto podría ser debido al alto contenido en sal de los caldos en cubitos o granulados. Finalmente, la interpretación más pesimista sería que los dos medios no son tan universales como para permitir siempre el crecimiento de los aislados de amebas de vida libre. Sin embargo, no se llegó a probar la preparación de caldo de pollo casero en el laboratorio austríaco, por lo que la no universalidad de los medios 39 y 80 no se ha llegado a demostrar con total seguridad. En cualquier caso, se deberían seguir buscando y diseñando medios de cultivo axénico para estas cepas fastidiosas.

**Tabla 2.18.** Crecimiento de las cepas disponibles en el laboratorio de Parasitología de MedUni en el medio 39 y 80. Siendo -: No se observa crecimiento. +: 10 - 25 % de monocapa. ++: 25 - 50 % de monocapa. +++: 50 - 90 % de monocapa.

	Medio 39			Medio 80		
	Día 1	Día 7	Día 10	Día 1	Día 7	Día 10
Zoo 8	Q	Q	+	Q	Q	-
118 M <sub>1</sub>	Q	-	-	Q	Q	-
Bud9	Q	Q	-	Q	Q	-
Pb 40	Q	Q	-	Q	-	-
A1PW	Q	Q	-	Q	Q	-
Bud4	Q	-	-	Q	-	-
HC	Q	-	-	Q	Q	-
Nek 15	Q	-	-	Q	-	-
AFR 4/15	Q	-	-	Q	Q	-
Casino	+	+	+	Q	Q	+
Wir 17	Q	-	-	Q	Q	-
Neh 17	Q	Q	Q	Q	-	-
Neff	Q	+	+	Q	+	+
Str17	Q	Q	-	Q	Q	-

#### 4.7. Medios de enquistamiento

Los medios de enquistamiento probados están basados en extractos de tierra. En la **Figura 2.17** se muestran el número de quistes presentes a los 7 días de incubación en cada uno de los medios estudiados y en los distintos aislados de *Acanthamoeba* sp. Se puede observar que el número de quistes obtenidos con cada medio varía dependiendo de la cepa en la que se ha estudiado y del tipo de tierra empleada. En general, se forman más quistes en los medios preparados con extractos de suelo austriaco. El número de quistes obtenidos de *A. castellanii* ATCC 30234 fue mayor en los medios preparados a partir de extractos de suelo austriaco, entre estos se forman más quistes en el medio SpyGE; en cuanto a los medios preparados con extracto de suelo español, el número de quistes formados en cada medio fue muy similar. En la cepa Neff, igual que en *A. castellanii* ATCC 30234, se observaron más quistes en el medio SpyGE con extracto de suelo austriaco; en cuando a los medios preparados a partir de extracto de suelo español, el número de quistes obtenidos fue menor al que se obtuvieron por agotamiento de nutrientes en el medio PYG. En la cepa Str17 se observaron un número similar de quistes en los medios con extracto de suelo español y por agotamiento de nutrientes en el medio PYG; en el medio SLBM con extracto de suelo austriaco, se observaron un mayor número de quistes que en el resto de los medios. En cuanto a la cepa *A. griffini* MYP2004, se observó mayor número de quistes obteniéndose con el medio ScervaE preparado con extracto de suelo español, mientras que en los medios con suelo austriaco se observaron menos quistes que los formados por agotamiento de nutrientes en el medio CERVA.



**Figura 2.17.** Número de quistes obtenidos a los 7 días de incubación en los medios de enquistamiento de *A. castellanii* ATCC 30234, Neff, Str17 y *A. griffini* MYP2004. **a.** Medios de enquistamiento preparados con extractos de suelo español. **b.** Medios de enquistamiento preparados con extractos de suelo austriaco. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ; \*\*\*:  $p < 0,0005$ .

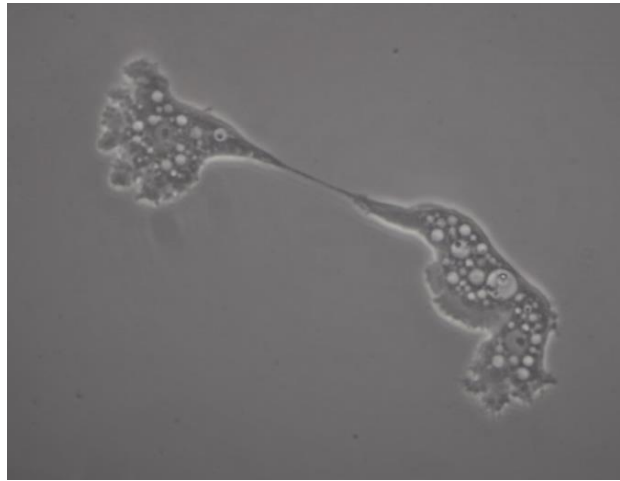
Comparando el medio Neff con los medios de extractos de tierra, en la mayoría de los casos el número de quistes obtenidos fue similar, salvo con la cepa Neff que se observaron menos quistes que los obtenidos con los medios preparados con suelo austriaco.

Por todo ello, podríamos sugerir que los medios basados en extractos de suelo son capaces de inducir el enquistamiento, pero con resultados irregulares. En ocasiones, superan en rendimiento del medio Neff y sin embargo en otras ocasiones son similares o inferiores a éste. Esto implica que, si en algún momento se aíslan cepas que no se enquistan bien en medio Neff, una alternativa interesante sería realizar ensayos de enquistamiento en diversos medios con extractos de suelo, como los testados en este trabajo.

## 5. CONCLUSIONES

1. Las cepas aisladas de muestras clínicas y ambientales son capaces de crecer en los medios habituales, salvo una de las cepas clínicas.
2. No se puede concluir que exista estacionalidad en el crecimiento de poblaciones amebianas en los limnoembalses estudiados, debido a que el número de muestras positivas es muy bajo, y, por tanto, no son representativas.
3. Los perfiles respiratorios de *Acanthamoeba* denominados tipo 1 y 2 se corresponden con un elevado número de trofozoítos viables, cuando se comparan con los datos obtenidos por recuento manual.
4. Algunos medios con ingredientes alternativos (concretamente los identificados con los números 39 y 80) permiten un crecimiento óptimo de cepas amebianas, incluyendo la cepa fastidiosa ISCIU-UAH 66/14.
5. No se puede concluir si los medios 39 y 80 son universales para todos los aislados de amebas de vida libre, debido a los limitados experimentos realizados en otros laboratorios y aislados.
6. Los medios de enquistamiento basados en extractos de suelo permiten la obtención de un número de quistes similar (o a veces algo superior) a los hallados tras la incubación en el medio de enquistamiento estándar (Neff).





Capítulo 3: Identificación  
molecular y  
caracterización biológica  
de aislados clínicos y  
ambientales de  
*Acanthamoeba* spp.



## CHAPTER ABSTRACT

**Introduction:** As stated in chapter 1, the taxonomy of the genus *Acanthamoeba* is controversial. Differential taxonomic features were formerly based on cyst morphology (Pussard and Pons, 1977). This classification was widely used, even though, Sawyer (1971) reported that the cysts' morphology varies depending on the composition of the medium. Nowadays, the trend is to rely on genetic data (sequence of the small ribosomal subunit gene), which seems to be much more reliable to assess phylogenetic relationships. The classic binomial nomenclature is still applied within the genus, but it is considered problematic; hence, up to 20 genetic groups (genotypes T1 to T20) have been proposed as an alternative (Schroeder et al., 2001; Corsaro and Venditti, 2010 and Fuerst et al., 2015).

The genotype classification doesn't reveal the pathogenicity linked to any amoeba strain, since both pathogenic and non-pathogenic isolates are included in the same genotype (Gast et al., 1996; Gast, 2001). The capacity of an *Acanthamoeba* strain to cause disease is due to diverse pathogenic mechanisms, related to parasite, host and environmental factors (Khan, 2003; Lorenzo-Morales et al., 2015). The parasite factors are divided in two groups: direct and indirect pathogenicity factors (**Figura 3.7**). Among these factors, protease secretion, thermotolerance, osmotolerance, pH tolerance and lysis or alteration of mammals' cells are usually studied to determine if a strain is potentially pathogenic or not (Cursons y Brown, 1978; De Jonckheere, 1980; Khan et al., 2000, 2002; Khan y Tareen, 2003; Magliano et al., 2009).

**Objectives:** The objectives of this chapter are the molecular characterization of some *Acanthamoeba* isolates and the evaluation of the pathogenicity factors present in some of them.

**Materials and Methods:** The genotype of the isolates was determined by phylogenetic analysis of the 18 S rRNA, once the complete gene was amplified by PCR and sequenced.

In addition, some pathogenetic factors were studied in some *Acanthamoeba* isolates; these included thermotolerance, osmotolerance, pH tolerance and cytopathic effect both in HeLa and human epithelial corneal cells. The thermotolerance, osmotolerance and pH tolerance tests were carried out in all the strains of the Parasitology laboratory available at the UAH, except ISCIII-UAH 66/14, ISCIII-UAH 163/15, PV-UAH-V1 and PV-UAH-V2 due to their slow growth rate. The tests were done by microscopic observation and manual counting. The cytopathogenicity effects in the cellular lines were carried out by microscopy observation and MTT assay, using only the strains ISCII-UAH 64/13, EV-UAH-V7 and P-UAH-O3.

**Results:** Almost all the isolates studied belonged to the genotype T4, irrespective of their origin. Genotype T2 was found in two water strains and a T3 genotype strain was isolated from a keratitis case. All the genotypes described in this thesis have been preliminarily characterized in former studies.

The pathogenec factors' results do not indicate any differential pattern between clinical and environmental strains. In other words, clinical samples are not positive to all pathogenicity factors and likewise, environmental samples are not negative to all those factors. In the case of the thermotolerance test, 4 clinical isolates were positive: *A. polyphaga* 2961, ISCIII-UAH 64/13, ISCIII-UAH 85/13 and ISCIII-UAH 161/15 and 3 environmental strains: *A. astronyxis* CCAP 1501/9,



EV-UAH-V7 and P-UAH-O3 (**Tabla 3.4** and **Figura 3.13** to **Figura 3.16**). None of the isolates was osmotolerant (**Figura 3.17**). Another 7 strains were positive to the pH tolerance test, but in this case 5 isolates were environmental (*A. astronyxis* CCAP 1501/9, *A. castellanii* ATCC 30264, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. culbertsoni* ATCC 30171 y P-UAH-O3), the other two (*A. polyphaga* 2961 and ISCIII-UAH 85/13) were clinical isolates (**Tabla 3.5** and **Figura 3.18** to **Figura 3.22**). Finally, cytopathogenicity assays showed that just one strain (namely, the clinical isolate ISCIII-UAH 64/13) was able to lyse cultured human cells (**Figura 3.24** to **Figura 3.28**).

**Conclusions:**

1. The old classification system (based on morphology) used for the genus *Acanthamoeba* suggests the existence of 3 large groups. Such taxonomic scheme can be considered (to some extent) useful.
2. There is a correlation between the number of acanthopods present on the surface of the trophozoites and the pathogenicity of the isolates. These cellular structures are much more frequent in amoebae isolated from clinical samples than in those obtained from environmental samples, as previously suggested by other researchers.
3. The *Acanthamoeba* genotypes found in the present PhD study belong in general to those most frequently observed in nature, in agreement with data published in the specialized literature.
4. Although attempts to use pathogenicity tests for characterization of diverse amoebic isolates have been undertaken, the interpretation of such analysis is unclear, since these assays are not standardized. Therefore, comparison of results obtained among different laboratories is unreliable.
5. Likewise, there is no clear pattern of pathogenicity factors leading to a fair distinction between pathogenic strains (isolated from clinical samples) or environmental isolates (theoretically non-pathogenic), at least in the panel of biological samples examined in the present study.

## 1. INTRODUCCIÓN

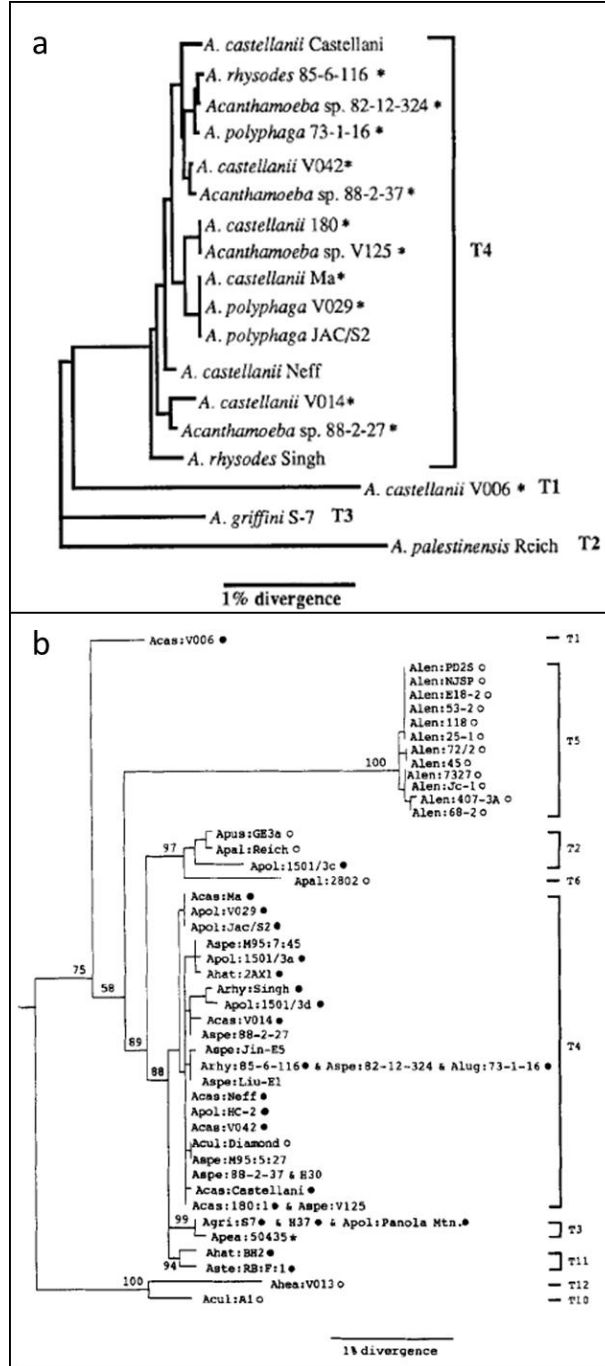
La identificación de amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba* es algo relativamente sencillo. Sin embargo, la clasificación a nivel de especie ha sido siempre un problema. La taxonomía y nomenclatura se ha revisado en numerosas ocasiones (Visvesvara, 1991; Stothard et al., 1998; Corsaro y Venditti, 2011). Como se mencionó brevemente en el capítulo 1, el género *Acanthamoeba* se dividió en grupos según el tamaño y la morfología de los quistes (Pussard y Pons, 1977). Esta clasificación fue ampliamente usada, a pesar de que Sawyer (1971) ya había observado que la morfología de los quistes variaba según la composición iónica de los medios de cultivo. Por lo que, esta clasificación no es fidedigna. La clasificación de Pussard y Pons (1977), no sólo se basaba en el tamaño y morfología sino también en el número de ostiolos presentes en los quistes, pero este dato se menciona en pocas ocasiones en las descripciones de las especies. En la década de los 80, distintos grupos de investigación estudiaron las relaciones intragenéricas mediante los patrones electroforéticos de isoenzimas, además de comprobar la clasificación morfológica mediante esta técnica (De Jonckheere, 1983; Daggett et al., 1985; Costas y Griffiths, 1986; Jacobson y Band, 1987; Moura et al., 1992). En estos estudios se reveló una gran diversidad estructural entre los distintos aislados de *Acanthamoeba*, ya que cada aislado tiene un patrón único, sobre todo los encuadrados en el grupo morfológico 1. El estudio de Moura et al., (1992) mostró una buena correlación entre los patrones de isoenzimas y los grupos morfológicos, pero el número de aislados estudiado fue bajo, empleándose sólo un aislado del morfogrupo 2. En estudios en los que se analizan un mayor número de aislados, concretamente 30, 31 y 71 (De Jonckheere, 1983; Daggett et al., 1985; Costas y Griffiths, 1986), se observó que no hay consistencia entre los patrones obtenidos y la clasificación morfológica, además de un amplio número de grupos.

También se analizaron los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de ADN mitocondrial (del inglés mtRFLP) mostrando una alta variabilidad entre las distintas cepas, a pesar del número limitado de aislados estudiados. Así mismo, reveló que las especies *A. castellanii* y *A. polyphaga* son polifiléticas (Bogler et al., 1983; Yagita y Endo, 1990).

Ambos métodos mostraron las incongruencias de la clasificación morfológica, pero ningún método analizó directamente la filogenia del género *Acanthamoeba*. Los primeros en realizar un análisis filogenético fueron Johnson et al., (1990), que analizaron parcialmente el 18S ARNr. Los resultados que obtuvieron coincidían con la clasificación de Pussard y Pons (1977), aunque sólo estudiaron 5 aislados.

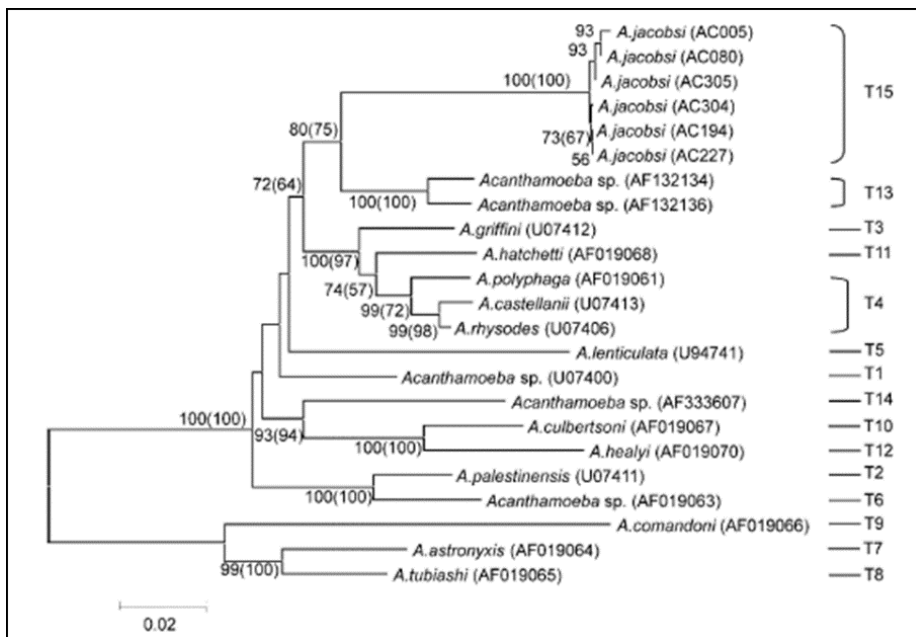
A la vista de todos estos intentos por establecer una clasificación racional, el análisis filogenético del gen 18S ARNr parece ser el criterio más prometedor. Este gen se emplea en filogenia debido a que es una molécula presente en todos los organismos que se replican, se puede amplificar fácilmente usando cebadores universales y su secuencia cambia a lo largo del tiempo (pero lentamente), lo que permite dilucidar las relaciones entre especies lejanas (Woese y Fox, 1977).

Así pues, Gast et al., (1996) realizaron también un estudio del gen completo 18S ARNr, describiendo las regiones variables de la subunidad pequeña ribosomal (Rns). Identificaron 4 regiones diferentes basadas en el alineamiento de las secuencias obtenidas, que mostraron 46 regiones filogenéticamente informativas. Su metodología estuvo basada en la reconstrucción filogenética mediante distintos algoritmos tales como Neighbor-Joining o Maximum Likelihood. Propusieron usar esta metodología para la clasificación del género dividiéndolo en secuenciotipos, siendo estos T1, T2, T3 y T4 (**Figura 3.1a**). Sin embargo, el secuenciotipo T4 engloba a aislados que difieren genéticamente entre ellos. Los datos obtenidos no permiten una división fiable del genotipo T4. Posteriormente, Stothard et al., (1998) analizaron las variaciones en las secuencias completas del 18S ADN que incluían los aislados empleados por Gast et al., (1996) y 35 nuevos aislados. En este estudio se identificaron 8 nuevos secuenciotipos (T5-T12), y al igual que en el estudio anterior se determinó que las cepas T4 son muy próximas filogenéticamente para poder separarse mediante el gen 18S ARNr. Además, señalan que no en todos los casos los secuenciotipos y las especies son equivalentes, es decir, se clasificaron como especies distintas aislados con el mismo secuenciotipo, mientras que aislados de una misma especie presentan secuenciotipos diferentes, siendo especies polifiléticas. Estos autores (Stothard et al., 1998) correlacionaron los morfogrupos, las especies y los secuenciotipos de varios aislados y concluyeron que el grupo 1 incluye a los secuenciotipos T7, T8 y T9, el grupo 2 a T3, T4 y T11, y, por último, el grupo 3 incluye a T1, T2, T5, T6, T10 y T12 (**Figura 3.1b**). No obstante, 4 aislados de los estudiados no encajaban con estas correlaciones, pero es debido a una clasificación errónea de sus quistes. Esto ocurrió debido a que, como ya hemos mencionado, la morfología de los quistes cambia dependiendo de los medios de cultivo (Sawyer, 1971). En este estudio se esclareció la relación de los linajes con los morfogrupos, pero no se consiguió avanzar en la subdivisión del secuenciotipo T4. Además, los autores propusieron reclasificar todos los aislados, siendo una única especie por secuenciotipo y propusieron establecer el límite para definir un nuevo secuenciotipo en un valor de disimilitud del 6 %.



**Figura 3.1.** Árboles filogenéticos (*Acanthamoeba* spp.) basados en el gen 18S ARNr. **a.** Árbol neighbor-joining que muestra los secuenciotipos T1 - T4 (Gast et al., 1996). **b.** Árbol neighbor-joining que muestra los secuenciotipos T1 - T12 (Stothard et al., 1998).

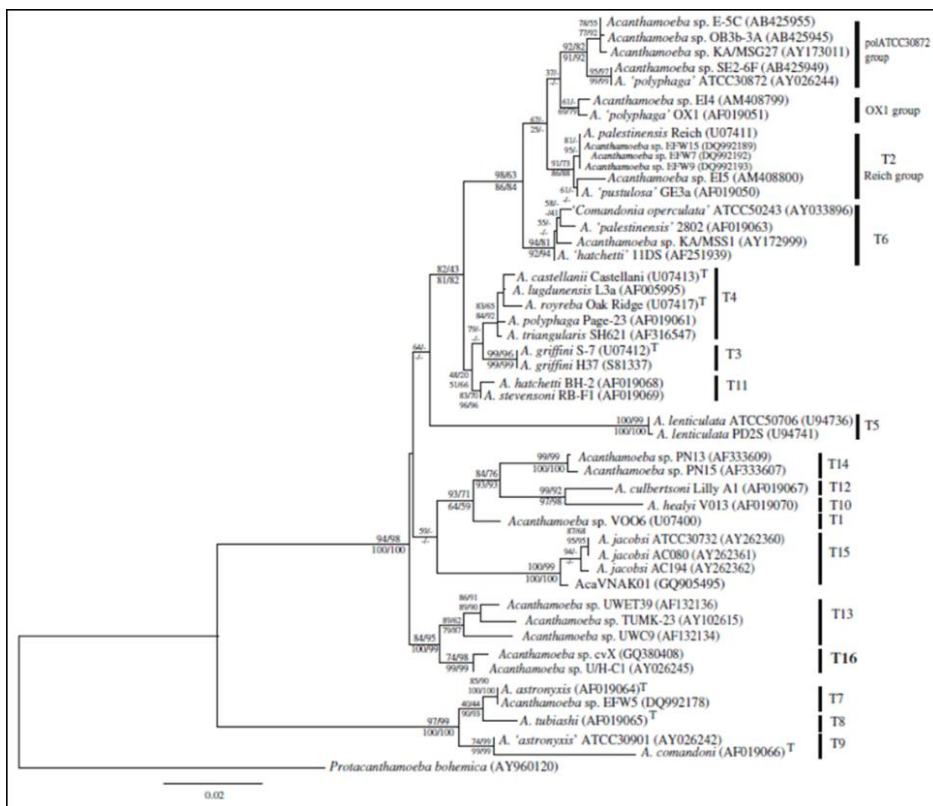
A partir de ese momento, se empezaron a clasificar los aislados de *Acanthamoeba* en morfogrupos y secuenciotipos. Así pues, se fueron describiendo nuevos secuenciotipos hasta los 20 establecidos en la actualidad. Los secuenciotipos T13 y T14 fueron descritos en un estudio de bacterias endosimbiontes en amebas por Horn et al., (1999), en el que analizaron el gen completo del 18S ARNr. Gast (2001) describió un nuevo secuenciotipo T14 durante el desarrollo del método dot-blot para identificación de los secuenciotipos previamente descritos, reclasificando el aislado de T14 de Horn et al., (1999) como T13. Hewett et al., (2003) realizaron una identificación basada en el gen 18S ARNr de la cepa *A. jacobsi* ATCC 30732 perteneciente a la colección cultivo americana, así como, otras 5 cepas aisladas del medio ambiente y depositadas en la colección AWQC y que, por su respuesta a la temperatura, parecían ser *A. jacobsi*. La identificación basándose en secuencias de 1.500 bp reveló que estos aislados componían un nuevo secuenciotipo, denominándose T15 (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Árbol neighbor-joining que muestra la posición de los aislados de *Acanthamoeba* identificados como secuenciotipo T15 (Hewett et al., 2003).

En 2001, Schroeder et al. propusieron denominar a los secuenciotipos como genotipos; además diseñaron un par de primers (JDP1-JDP2) que amplifican la región ASA.1 (~ 400 - 500 bp), propuesta como diana de diagnóstico rápido del género *Acanthamoeba*, también diseñaron un set de primers (CRN5, 373, 570C, 882, 892C y 1137) que amplifica el fragmento GTSA.B1 (~ 1.400 - 1.800 bp) que contiene 8 regiones variables que permiten diferenciar los distintos genotipos sin necesidad de amplificar la totalidad del gen 18S ARNr. En 2009, Łanocha et al., describieron un nuevo genotipo (T16) tras estudiar la presencia de amebas de vida libre potencialmente patógenas en masas de agua dulce naturales y artificiales de Polonia, así como muestras clínicas de pacientes inmunodeprimidos con neumonía atípica. En este estudio, los autores indican que el uso de secuencias de 830 - 840 bp es suficiente para distinguir y establecer nuevos genotipos. Corsaro y Venditti (2010) secuenciaron y analizaron un aislado amebiano de agua dulce,

resultando ser un nuevo genotipo, al cual denominaron T16, ignorando el hallazgo de Łanocha et al., (2009) dado que consideraron que el número de bases de la secuencia analizada por estos últimos autores era insuficiente para identificar un nuevo genotipo. En su análisis, clasificaron además un aislado procedente de un paciente con queratitis que no tenía asignado el genotipo (Alves et al., 2000) y cuya secuencia ribosomal era igual a la que ellos habían encontrado. Además, analizaron más secuencias depositadas en GenBank que no tenían definido el genotipo. De estas secuencias, cinco fueron incluidas en el “grupo pol30872” y otras en el “grupo OX-1”. Dependiendo del tamaño de los fragmentos analizados, la filogenia de estos grupos cambia, y, por tanto, no se les asignó ningún genotipo, aunque proponen redefinir el valor de disimilitud y de esta manera estos grupos podrían ser considerados un nuevo genotipo (**Figura 3.3**). Maghsood et al., (2005) en su identificación y clasificación de cepas clínicas y ambientales, propusieron denominar al “grupo OX-1” como genotipo T2A, ya que la se observaba un valor de 4,9 % de disimilaridad entre las cepas T2. patógenas y T2 no patógenas.



**Figura 3.3.** Árbol maximun likelihood de diversos aislamientos de *Acanthamoeba* basado en la región GTS.A1 que incluye todos los genotipos, los grupos “pol30872” y “OX-1” (Corsaro y Venditti, 2010).

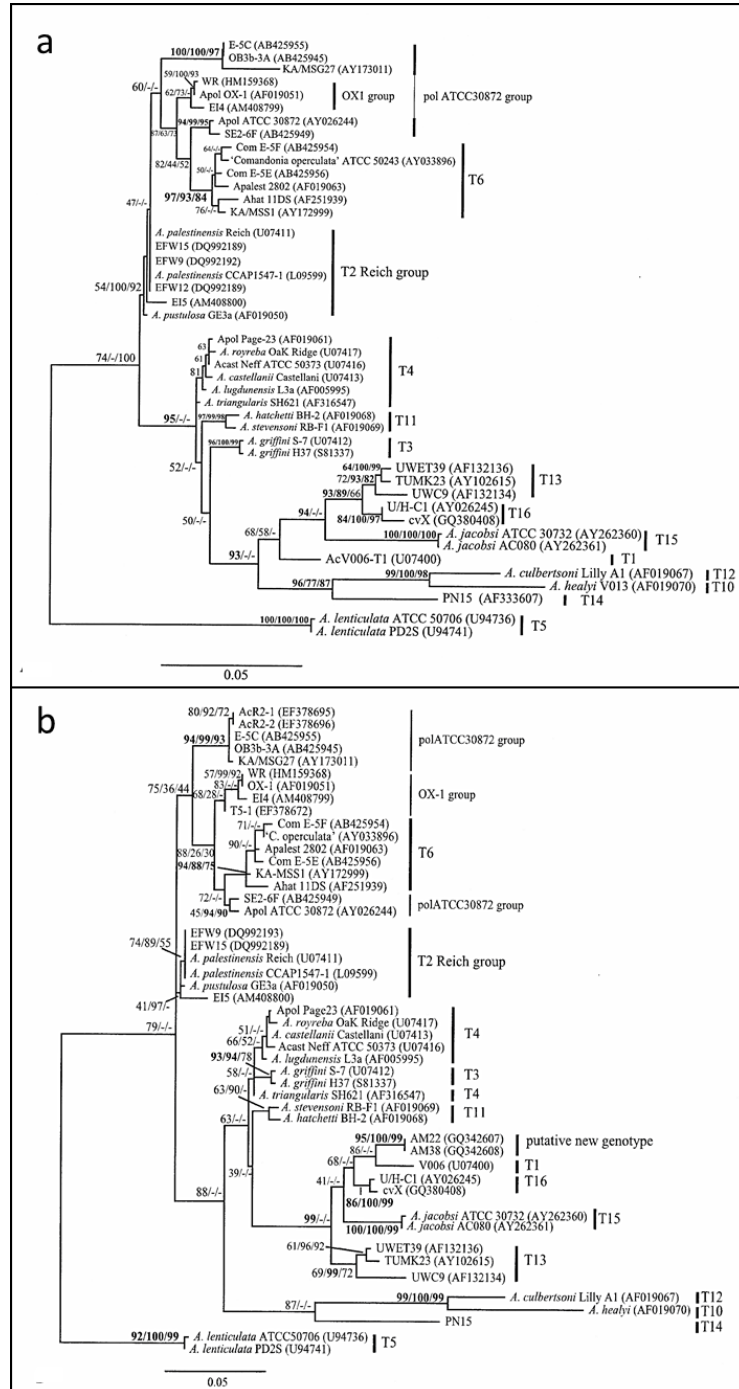
A su vez, ese mismo año, Nuprasert et al., (2010), estudiando aislados de *Acanthamoeba* procedentes de agua dulce y de muestras clínicas, encontraron un aislado dulceacuícola cuya secuencia del Rns no coincidía con las secuencias de los genotipos ya establecidos; en base a esto propusieron un nuevo genotipo (T17).

En 2011, Corsaro y Venditti publican un trabajo en el cual exponen los límites del uso de secuencias parciales del gen 18S ARNr, como respuesta al trabajo de Łanocha et al., (2009). En este trabajo, los autores describen las distintas regiones del gen 18S ARNr que se emplean para la clasificación de los aislados del género *Acanthamoeba*, siendo estos los siguientes:

- la región diagnóstica ASA.S1 (500 bp) que es específica del género *Acanthamoeba*, pero que no distingue entre genotipos (Dykova et al., 1999);
- la región GTSA.B1 que contiene 8 regiones variables y, de la secuenciación completa se obtienen fragmentos de 1.500 bp (65 % del gen 18S ARNr);
- y, por último, el fragmento Ami de unas 850 bp que contiene 5 de las 8 regiones variables presentes en el fragmento GTSA.B1 (38 % del gen 18S ARNr).

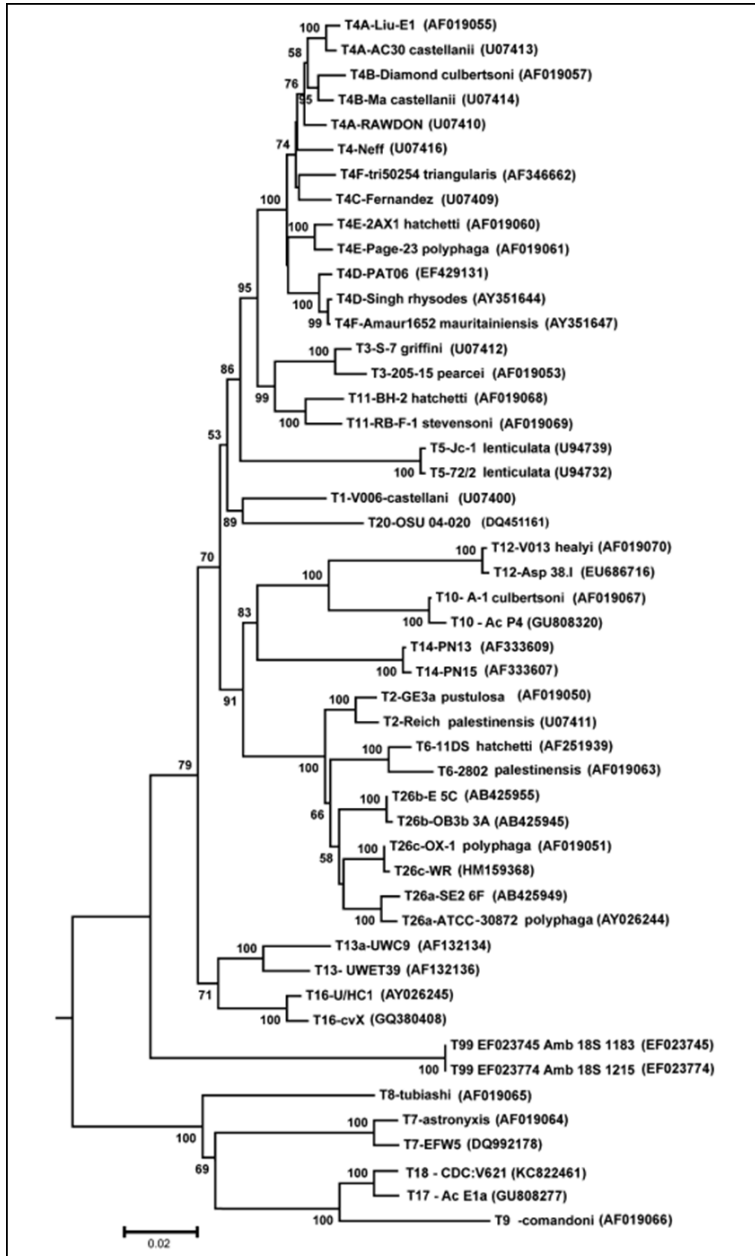
El fragmento Ami se obtiene con los primers ami6F y ami9R que fueron erróneamente diseñados como específicos de amebas, pero que pueden amplificar organismos eucariotas, lo cual resulta útil para una rápida identificación de organismos eucariotas y en ocasiones permite identificar el genotipo de *Acanthamoeba*. La propuesta del genotipo T16 por Łanocha et al., (2009) se basó en el estudio del fragmento Ami, mientras que la de Corsaro y Venditti (2010) se basó en el gen completo 18S ARNr. Corsaro y Venditti (2011) analizaron secuencias parciales y completas depositadas en GenBank para determinar cuál de los dos aislados pertenecía a un nuevo genotipo y que fragmento es óptimo para la identificación de los genotipos ya establecidos y determinación de nuevos genotipos. Estos autores compararon estudios filogenéticos basados en secuencias parciales con estudios en los que se usaron secuencias completas del gen 18S ARNr, comprobando que la topología general de los árboles basada en fragmentos parciales es similar a la obtenida con fragmentos completos, pero que los nodos son más robustos (al juzgar por los valores de remuestreo) cuando se usa el fragmento GTSA.B1, comparado con el fragmento Ami. El uso del fragmento Ami altera la topología de los árboles y se obtienen valores de bootstrap (remuestreo) menores (**Figura 3.4**); con el fragmento Ami se obtienen menores valores de similitud que cuando se usa el fragmento GTSA.B1 o la secuencia completa. Es decir, los resultados filogenéticos son un artefacto, ya que parece que casi cualquier nuevo aislado no pertenece a ningún genotipo ya existente. No obstante, con los análisis realizados por Corsaro y Venditti, teniendo en cuenta los resultados anómalos obtenidos con la región Ami, determinaron que parece que esos aislados descritos por Łanocha et al., (2009) no pertenecen ni al genotipo T16 descritos por ellos ni a otro genotipo previamente descrito, pero que para poder asegurar estos datos habría que secuenciar al menos el fragmento GTSA.B1.





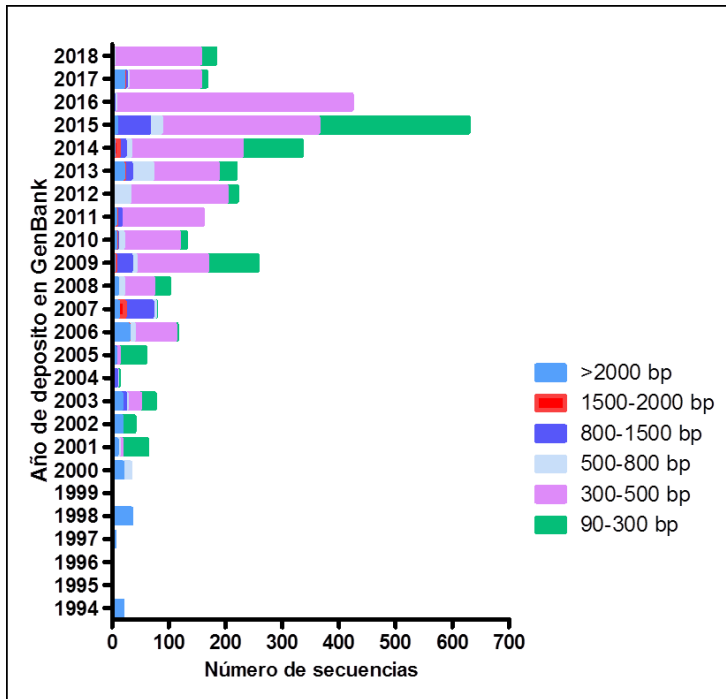
**Figura 3.4.** Árboles maximum likelihood de diversos aislados de *Acanthamoeba* (Corsaro y Venditti, 2011). **a.** basado en las secuencias del fragmento GTSA.B1. **b.** basado en las secuencias del fragmento Ami.

El genotipo T18 fue descrito por Qvarnstrom et al., (2013). Estos autores caracterizaron molecularmente un aislado proveniente de un caso de encefalitis granulomatosa amebiana. Inicialmente intentaron caracterizarlo secuenciando los fragmentos ASA.S1 y GTSA.B1, pero los electroferogramas no permitían diferenciar bien las bases, y por tanto emplearon la secuencia completa del gen. Un año después, Magnet et al., (2014) establecieron el genotipo T19 mediante el uso de la secuencia completa del gen 18S ARNr. Este genotipo se describió en un aislado de agua procedente de una planta de tratamiento de residuos. El genotipo T20 surge en una revisión bibliográfica de Fuerst et al., (2015), al revisar una cepa clasificada como T4 aislada de un tucán que padecía una infección letal por *Acanthamoeba*. Esta cepa se clasificó en una primera instancia basándose en el fragmento ASA.S1, dando como resultados secuencias similares a las del genotipo T4. Pero cuando Fuerst et al. (2015) secuenciaron el gen ribosomal completo, obtuvieron una filogenia distinta en la que el aislado de esta ave resultó ser hermano del genotipo T1, claramente separado de otros aislamientos T4 (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5.** Árbol maximun likelihood de diversos aislados de *Acanthamoeba* (Fuerst et al., 2015) basado en las secuencias completas del gen 18S ARNr.

Sin embargo, incluso después de la exhaustiva revisión llevada a cabo por Fuerst et al., (2015), hay autores que continúan basando la identificación genética en el fragmento ASA.S1 (**Figura 3.6**), lo cual puede dar a clasificaciones erróneas.

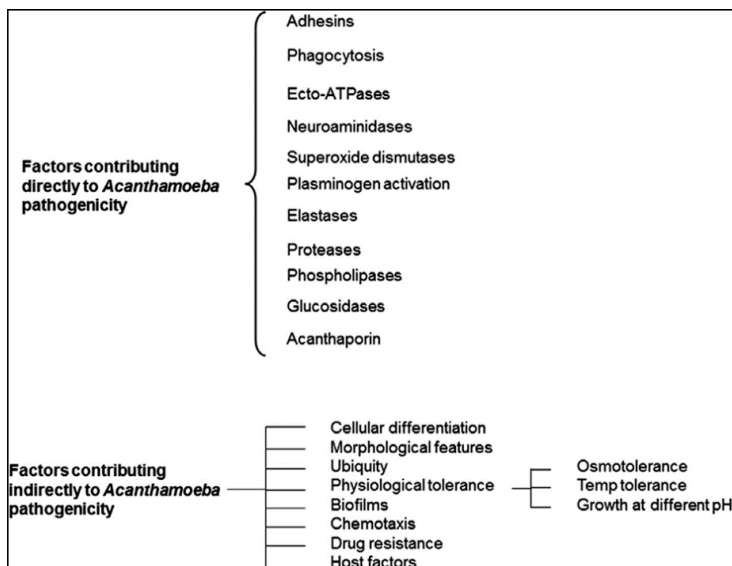


**Figura 3.6.** Gráfica que muestra el número de secuencias de aislados de *Acanthamoeba* y su tamaño depositadas en la base GenBank a lo largo del tiempo.

Aún seguía habiendo discrepancias en la asignación del genotipo de ciertas secuencias a algún genotipo, por lo que, Corsaro et al., (2015) realizaron nuevos análisis y establecieron cuales eran las cepas incluidas en los polémicos genotipos T16, T19 y T20. En un trabajo posterior, Corsaro et al., (2017), los mismos autores presentaron la secuencia completa del genotipo T15, que comprendía a los aislados relacionados con esa secuencia.

En los últimos años Corsaro y Venditti (2018a, 2018b), han publicado correcciones de ciertas secuencias de *Acanthamoeba* que en realidad eran quimeras. De estas correcciones la más relevante concierne al genotipo T99, que en la revisión de Fuerst et al., (2015) se propuso como un clado ambiguo basado en secuencias completas del gen 18S ARNr de organismos que no se han cultivado y que no muestran una de las regiones hipervariables presente en el resto de los genotipos. Parece que las secuencias primeramente introducidas en Genbank para este genotipo eran una quimera obtenida al mezclar involuntariamente secuencias de *Acanthamoeba* spp., *Prismatolaimus* spp. (un nemátodo) y *Rhogostoma* spp. (una ameba).

Por otra parte, la clasificación por genotipos presenta el problema de que no permite conocer la patogenicidad de las cepas amebianas. De hecho, ya que se ha demostrado que dentro de un mismo genotipo ribosomal hay cepas patógenas y no patógenas (Gast et al., 1996; Gast, 2001). La capacidad de una cepa de *Acanthamoeba* de causar enfermedad es debida a sus mecanismos de patogenicidad. Estos mecanismos son complejos, ya que se deben a una serie de factores presentes en el parásito, factores del hospedador y las condiciones medio ambientales (Khan, 2003; Lorenzo-Morales et al., 2015). Los factores presentes en el parásito se dividen en dos grupos: los que contribuyen directamente a la patogenicidad y los que contribuyen indirectamente (**Figura 3.7**). Entre todos estos factores, los que se han empleado en los últimos años para saber si un aislado de *Acanthamoeba* es potencialmente patógeno, son la secreción de proteasas, termotolerancia, osmotolerancia, capacidad de crecer a distintos pH y capacidad citopática en células de mamíferos (Cursons y Brown, 1978; De Jonckheere, 1980; Khan et al., 2000, 2002; Khan y Tareen, 2003; Magliano et al., 2009).



**Figura 3.7.** Esquema de los factores que contribuyen a la patogenicidad de *Acanthamoeba* spp. (Lorenzo-Morales et al., 2015).

## 2. OBJETIVOS

En este capítulo se establece como objetivo general **la clasificación de las cepas de *Acanthamoeba* aisladas de muestras clínicas y ambientales**. Este objetivo se ha dividido en los siguientes apartados:

1. Clasificación de los aislados establecidos previamente en base a caracteres morfométricos.
2. Determinación del genotipo de las cepas aisladas mediante filogenia basada en secuencias de Rns (18S ARNr).
3. Evaluación de los factores de patogenicidad de las cepas aisladas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Caracterización morfológica de las cepas de *Acanthamoeba* spp.

Las muestras estudiadas son las aisladas en el capítulo anterior: 5 muestras procedentes de limnoembalses (EV-UAH-P6, EV-UAH-V7, P-UAH-O3, PV-UAH-V1 y PV-UAH-V2) y 5 muestras de origen clínico (ISCIH-UAH 64/13, ISCIH-UAH 85/13, ISCIH-UAH 66/14, ISCIH-UAH 161/15 y ISCIH-UAH 161/15). También, se estudiaron las cuatro cepas de colección cultivo disponibles en el laboratorio de parasitología (*A. castellanii* ATCC 30234, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. culbertsoni* ATCC 30171, *A. astronyxis* CCAP 1501/9) y una cepa donada por el Dr. Hadas (Poznan University of Medical Sciences, Polonia) denominada *A. polyphaga* 2961 aislada de una muestra clínica.

##### Material y reactivos empleados

- Cultivo en medio axénico (en los casos que es posible) de las cepas anteriormente mencionadas.
- Medio PYG suplementado con 2 % de bactocasitona.
- Medio CERVA.
- Medio de enquistamiento Neff.
- Tampón fosfato de Milloning o Tampón Milloning (Milloning, 1961).
- Solución fijadora de glutaraldehído al 2 % (Merck, 104239).
- Solución de lavado.
- Soluciones de deshidratación.
- Poli-L-lisina 0,1 % (Sigma).
- Quistes de las cepas anteriormente mencionadas.
- Campana de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A).
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas estériles.
- Raspador de células.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- PBS 1x.
- Microscopio óptico (MOTIC, BA-300) con cámara digital acoplada de 10 Mpx.
- Desecador Polaron E-3000 (Quorum Technologies).
- Metalizador Polaron E500/5100 (Quorum Technologies).
- Microscopio electrónico de barrido DSM 950 (Zeiss).

## Metodología

### Preparaciones en fresco de trofozoítos de *Acanthamoeba*.

1. Despegar los trofozoítos del flask de cultivo T25 por choque frío de cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento. En el caso de cultivos en placas de agar, añadir 3 ml de PBS 1x y levantar los trofozoítos con la ayuda de un raspador de células.
2. En la campana de flujo laminar, retirar un pequeño volumen (~ 50 - 100 µl) de los cultivos y colocar la gota en el portaobjetos, posteriormente, cubrir la gota con el cubreobjetos.
3. Observar al microscopio óptico y tomar fotografías de los trofozoítos.
4. Realizar medidas de los trofozoítos con la ayuda del software de la cámara del microscopio.

### Preparaciones en fresco de quistes de *Acanthamoeba*.

1. Previamente, hay que producir quistes de cada una de las cepas estudiadas. Para ello, utilizar el medio de enquistamiento Neff. En el caso, de cultivos en placas de agar, hay que esperar a que la fuente de alimento se agote y los trofozoítos se enquisten de manera natural.
2. Preparar el medio Neff como se muestra en la siguiente tabla (**Tabla 3.1**), ajustar el pH a 8,8 y autoclavar.

**Tabla 3.1.** Composición del medio de enquistamiento Neff. Los compuestos están en g para preparar 1 L.

Compuesto	Cantidad (g)
Amendiol	2,105
KCl	7,45
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,97
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06
NaHCO <sub>3</sub>	0,085

3. En la cabina de flujo laminar, retirar el medio de cultivo de los flasks de T75 y lavar con PBS 1x.
4. Retirar el PBS 1x y añadir 10 ml de medio Neff.
5. Mantener en agitación los flasks con medio Neff a 4 °C durante 2 semanas o hasta que alcancen el 80 % de enquistamiento.
6. Una vez obtenidos los quistes, colocar una gota en un portaobjetos y cubrirla con el cubreobjetos.
7. Observar al microscopio óptico tomando fotografías de los quistes.
8. Realizar medidas de los quistes con la ayuda del software de la cámara del microscopio.



**Preparaciones de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* para microscopía electrónica de barrido (MEB).**

1. Preparar el tampón Milloning en el momento de uso, para ello se debe mezclar 58,1 ml de solución A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  al 2,26 %, 11,3 g en 500 ml de agua destilada) y 11,9 ml de solución B (NaOH al 2,52 %, 2,52 g en 500 ml de agua destilada). Ajustar el pH a 7,2.
2. Preparar la solución fijadora de glutaraldehído al 2 %. Para ello, mezclar 4,6 ml de tampón Milloning, 0,4 ml de glutaraldehído al 25 % y 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  al 1 %.
3. Mezclar 22,5 ml de tampón Milloning y 2,5 ml de glucosa al 1 % para preparar la solución de lavado.
4. Desprender los trofozoítos del flask de cultivo T25 por choque frío de cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento. En el caso de los quistes, emplear el medio de enquistamiento Neff para producirlos (según se ha explicado previamente).
5. En la campana de flujo laminar, traspasar el contenido de los flasks, ya sean trofozoítos o quistes, a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
6. Retirar parte del volumen del sobrenadante, dejando aproximadamente 100  $\mu\text{l}$  para resuspender el pellet.
7. En un cubreobjetos redondo de plástico se disponen 200  $\mu\text{l}$  de Poli-L-lisina, transcurridos 10 min, retirar la Poli-L-lisina.
8. Añadir en ese mismo cubre 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de trofozoítos o quistes e incubar en una cámara húmeda a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa durante 1 hora.
9. Retirar el medio que queda sobre el cubreobjetos. Los trofozoítos y quistes quedarán adheridos al mismo.
10. Rápidamente, añadir al cubre 100  $\mu\text{l}$  de solución de fijación, e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
11. Sumergir el cubreobjetos en la solución de lavado durante unos segundos.
12. Deshidratar la muestra en soluciones crecientes de etanol, es decir, se sumerge el cubre durante 5 min en soluciones de 30, 50, 70, 95 y 100 °.
13. Guardar cada portaobjetos en un sobre de papel de Wattman n° 1 realizado para tal efecto.
14. Sumergir el sobre con el cubreobjetos en acetona anhidra.
15. Desecar las muestras mediante el punto crítico en el aparato Polaron E-3000.
16. Posteriormente, introducir las muestras en el metalizador Polaron E5000/5100 a un voltaje de 2 kV e intensidad de 20 mA durante 150 s, creando en el cubre una capa superficial de oro de 200 a 300 nm de espesor.

### 3.2. Determinación del genotipo de los aislados

Se determinó el genotipo de todas las cepas disponibles en el laboratorio independientemente de su origen. Se realizaron análisis filogenéticos basándose en las secuencias completas del gen 18S ARNr (> 2.000 bp) en los casos que fue posibles; alternativamente se usó solo el fragmento GTSA.B1 (1.500 - 2.000 bp).

#### Material y reactivos empleados

- Cultivo exponencial en medio axénico (en los casos que es posible) de las cepas.
- Agarosa D<sub>1</sub> LOW EEO (Conda, Pronadisa, 801000).
- Bromuro de etidio 10 mg/ml (Sigma, E7637). Se prepara a 1 µg/ml.
- Tampón Tris Acetato EDTA (TAE) 50x (Norgen Biotel Corp, 28011).
- Tampón TAE 1x: Obtenido a partir del 50x.
- Marcadores de peso molecular λ-Hind III (Takara, 3403) y φX174-Hae III (Takara, 3405A).
- Ampollas de agua bidestilada estéril y libre de ADN (Braum).
- Primers del gen Rns: E528F - 1492R que amplifica la totalidad del gen (~2.000 bp) (Edgcomb et al., 2002), CRN5 - 1137 que amplifica la región GTSA.B1 (2.000 - 1.500 bp) (Schroeder et al., 2001) y JDP1 - JDP2 que amplifica para la región ASA.S1 (400 - 500 bp) (Schroeder et al., 2001).
  - E528F (5'- CGGTAATTCCAGCTCC - 3')
  - 1492R (5'- ACCTTGTTACGACTT - 3')
  - CRN5 (5'- CTGGTTGATCCTGCCAGTAG - 3')
  - 1137 (5'- GTGCCCTCCGTC AAT - 3')
  - JDP1 (5'- GGGCCCAGATCGTTTACCGTGAA - 3')
  - JDP2 (5'- TCTACAAGCTGCTAGGGGAGTCA - 3')
- Kit de extracción de ADN "DNAeasy Blood and tissue kit" (Mobio, 12200-250).
- Kit de limpieza de productos de PCR "Ultra Clean 15 DNA purification" (Mobio, 12500-100).
- Kit de clonación de fragmentos de PCR "NZY-A PCR cloning kit" (NZYTech, MB053).
- Kit de purificación de ADN de plásmidos "Mini Plasmid Prep kit" (Mobio, 12301-50).
- PCR Master mix con buffer de carga para electroforesis "NZYtaq II 2x Green Master Mix" (NZYTech, MB22401).
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas estériles con filtro y libres de ADNasas.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Campana de flujo laminar (Telstar Mini – V/PCR).
- Campana de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A).
- Termociclador (Eppendorf, Mastercycler® personal).
- Cubeta de electroforesis Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) y fuente de alimentación Power Pac 300 (Bio-Rad).
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek).
- Secuenciador automático (Applied Biosystems, ABI 3130).
- Transiluminador Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

## Metodología

### Extracción de ADN.

1. Desprender los trofozoítos del flask de cultivo T25 por choque frío provenientes de cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento. En el caso de cultivos en placas de agar, añadir 3 ml de PBS 1x y con la ayuda de un raspador de células, levantar los trofozoítos.
2. En la cabina de flujo laminar, retirar el volumen de los flasks o de las placas de agar a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
3. Retirar el sobrenadante, transferir el pellet a un tubo eppendorf estéril y resuspenderlo en 200 µl de Solution B1 del kit "DNAeasy Blood and tissue kit" (MoBio, California, EEUU).
4. Seguir las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: La incubación con proteinasa K será como mínimo de 1 hora a 65 °C en agitación, y en el último paso se añaden 100 µl de la solución B5 en vez de 200 µl, como indican las instrucciones.
5. Una vez extraído el ADN, cuantificar la concentración y la pureza de éste con el espectrofotómetro Epoch (Biotek). La pureza se analiza mediante el cociente A260/A280, que debe encontrarse entre 1,8 - 2.
6. Almacenar el ADN a - 4 °C hasta su uso.

### Preparación de primers y amplificación del gen Rns.

1. Para amplificar el gen Rns se llevarán a cabo 3 PCR diferentes. Primero hay que resuspender con agua bidestilada estéril los primers liofilizados a una concentración de 100 µM en la cabina de flujo laminar.
2. Preparar la mezcla de PCR en un volumen de 25 µl por reacción. Esta mezcla consiste en 12,5 µl de NZYTaQ II 2x Green Master Mix, 2 µl de la mezcla del primer forward y reverse a una concentración de 5 µM y 8,5 µl de agua bidestilada estéril. Finalmente, añadir 2 µl de ADN.
3. Introducir los tubos con la reacción de PCR en el termociclador, dependiendo del par de primers empleado, las condiciones varían (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.2.** Condiciones de PCR para los primers E598F - 1492R, CRN5 - 1137 y JDP1 -JDP2.

Etapa de PCR	Primers E598F - 1492R	Primers CRN5 - 1137	Primers JDP1 – JDP2
<b>Desnaturalización</b>	96 °C / 2 min	95 °C / 10 min	95 °C / 10 min
<b>Desnaturalización</b>	96 °C / 30 s (35 ciclos)	95 °C / 1 min (30 ciclos)	95 °C / 1 min (45 ciclos)
<b>Anillamiento</b>	52 °C / 45 s (35 ciclos)	51 °C / 1 min (30 ciclos)	60 °C / 1 min (45 ciclos)
<b>Elongación</b>	72 °C / 2 min (35 ciclos)	72 °C / 1 min 30 s (30 ciclos)	72 °C / 2 min (45 ciclos)
<b>Elongación final</b>	72 °C / 10 min (35 ciclos)	72 °C / 10 min (35 ciclos)	72 °C / 10 min (45 ciclos)

4. Para comprobar si ha habido amplificación se realiza una electroforesis.

#### Electroforesis y tinción de geles.

1. Colocar la bandeja de geles en el molde.
2. Preparar el gel de agarosa, la concentración dependerá del tamaño del amplicón. En este caso, los geles se prepararon a 1,2 % (400 bp - 7.000 bp) para todos los productos de PCR obtenidos con los distintos pares de primers. Por tanto, pesar 0,3 g de agarosa y añadir a un matraz con 25 ml de TAE 1x.
3. Calentar esta mezcla al microondas hasta que sea transparente.
4. Verter la mezcla enfriada a 40 °C en la bandeja de geles, colocar los peines y dejar solidificar.
5. Una vez solidificado el gel, colocarlo dentro de la cubeta. Llenar la cubeta con buffer TAE 1x.
6. Cargar 5 µl de los productos de PCR e iniciar la electroforesis.
7. Finalizar la electroforesis cuando el frente haya llegado al final del gel.
8. A continuación, retirar el gel de la cubeta.
9. Teñir el gel con una solución de bromuro de etidio en agitación durante 10 min.
10. Pasados los 10 min, retirar el exceso de bromuro de etidio lavando el gel con agua en agitación durante otros 10 min.
11. Observar las bandas de ADN en el transiluminador “Gel Doc 2000” de Bio-Rad.

#### Limpieza de productos de PCR.

1. Para limpiar los productos de PCR se utiliza el kit “Ultra Clean PCR Clean-up” (MoBio, California, EEUU).
2. Seguir las instrucciones del fabricante, salvo en el último paso, en el que la elución del ADN se realiza con 50 µl de agua bidestilada estéril.
3. Una vez extraído el ADN, cuantificar la concentración y la pureza de este con el espectrofotómetro Epoch (Biotek). La pureza se analiza mediante el cociente A260/A280, que debe estar entre 1,8 - 2.
4. Almacenar el ADN a -4 °C hasta su secuenciación en la unidad de Biología Molecular de la uah.

**Preparación de placas de agar Luria-Bertoni (LB) con ampicilina, X-gal e IPTG.**

1. Preparar 10 ml de ampicilina a una concentración de 50 mg/ml: pesar 500 mg de ampicilina, añadir 2,5 ml de agua destilada estéril, añadir alícuotas de 10 µl HCl concentrado hasta que se disuelva la ampicilina. Una vez disuelta añadir agua hasta los 5 ml y añadir 5 ml de etanol absoluto. Filtrar con un filtro de 0,22 µm para esterilizar.
2. Preparar 0,5 ml de IPTG y Xgal: pesar 50 mg de IPTG y 20 mg de Xgal, añadir 0,4 ml de dimetilformamida e ir añadiendo gota a gota de dimetilformamida hasta llegar a los 0,5 ml. Almacenar a - 20 °C en oscuridad hasta su uso.
3. Preparar medio LB agar y autoclavarlo. Una vez atemperado, añadir 100 µl de ampicilina al 50 mg/ml y 60 µl de la mezcla de IPTG y Xgal por cada 100 ml de LB agar.
4. Verter en placas Petri y dejar solidificar.

**Clonación de secuencias de ADN.**

Dado que los electroferogramas de algunos aislados mostraban varios picos, se realizó una clonación de dichas secuencias para comprobar si el aislado era heterocigótico.

1. Calcular la concentración de del producto de PCR amplificado con los primers CRN5 -1137 (inserto) con la siguiente fórmula:

$$\text{ng del inserto} = \frac{\text{ng del vector} * \text{el tamaño del inserto en kb}}{\text{tamaño del vector en kb}} * \text{el ratio molar de } \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

2. Seguir las instrucciones del kit NZY-A PCR cloning (NZYTech, Lisboa, Portugal).
3. Sembrar las bacterias obtenidas en medio LB con ampicilina, IPTG y Xgal a 37 °C durante la noche. Las colonias de color blanco son las colonias que tienen incluido el plásmido pNZY28.
4. Para comprobar si el plásmido tiene el inserto, primero hay que extraer el plásmido de las bacterias para ello se siguieron las instrucciones del kit Plasmid DNA was purified with the Mini Plasmid Prep (MoBio, California, USA).
5. Una vez extraídos los plásmidos, digerir con la enzima Pst: mezclar 1 µl de Pst diluida 1/2, 4 µl de plásmido, 4 µl de agua estéril y 1 µl de buffer Mg<sup>2+</sup>. Incubar la mezcla a 37 °C durante 1 hora y 30 min.
6. Realizar una electroforesis al producto obtenido para comprobar que el tamaño se corresponde al del amplicón.
7. En el caso de que se corresponda el tamaño, estos productos se enviaron a la unidad de Biología Molecular para su secuenciación.

#### Análisis de secuencias de ADN.

1. Las secuencias obtenidas son analizadas con el programa BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) con el cual se corrigen los pares de bases dudosos y se ensamblan las distintas secuencias obtenidas con los 3 pares de primers.
2. Las secuencias resultantes son introducidas en la base de datos GeneBank para confirmar que pertenecen al género *Acanthamoeba*.
3. Una vez comprobado que son secuencias de *Acanthamoeba* con una longitud entre 1.200 - 2.000 bp, se realiza un alineamiento de las secuencias con el algoritmo MSAProbs (Liu et al., 2010).
4. El alineamiento obtenido con MSAProbs fue evaluado con el valor de consistencia transitoria (TCS del inglés transitive consistency score) y se generó un alineamiento múltiple (MSA del inglés multiple sequence alignment) (Chang et al., 2014).

#### Filogenia.

1. Se construyeron árboles neighbor-joining y parsimónicos a partir del alineamiento múltiple generado con TCS, con el programa PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel, 2003) y MEGA.

### **3.3. Evaluación de los factores de patogenicidad indirectos**

Los factores de patogenicidad estudiados fueron la termotolerancia, osmotolerancia, crecimiento a diferentes pH y la actividad citopática. La capacidad de *Acanthamoeba* para soportar altas osmolaridades y temperaturas es crucial para poder invadir el epitelio corneal ya que los trofozoítos estarán puntualmente expuestos a esas condiciones, así como, a la salinidad de las lágrimas (Khan, 2003). Varios estudios (De Jonckheere, 1983; Walochnik et al., 2000; Khan et al., 2002) han demostrado que la capacidad de *Acanthamoeba* de crecer a altas temperaturas y osmolaridades están relacionadas directamente con la patogenicidad de estos aislados. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las cepas patógenas pueden adaptarse a estas circunstancias se desconocen. Por otra parte, la capacidad de sobrevivir a diferentes pHs le permite colonizar diversos nichos, pero se desconoce qué relación tiene este carácter con la patogenicidad (Khan, 2003). La actividad citopática es la capacidad que tiene una cepa de *Acanthamoeba* de lisar células de mamíferos. Este factor es el primero que se estudió para determinar si una cepa era patógena o no (De Jonckheere, 1980). Las cepas patógenas disponen de las herramientas necesarias para degradar las células de mamífero, lo cual le permite invadir el epitelio corneal en una queratitis.

Los ensayos de termotolerancia, osmotolerancia y crecimiento a diferentes pHs se llevaron a cabo en todas las cepas presentes en el laboratorio de Parasitología, salvo las siguientes cepas: ISCIII-UAH 66/14, ISCIII-UAH 163/15, PV-UAH-V1 y PV-UAH-V2, dado que su tasa de crecimiento lenta no lo permitió. Los ensayos de citopatogenicidad sólo se realizaron en la cepa ISCII-UAH 64/13, EV-UAH-V7 y P-UAH-O3 en células epiteliales de córnea humana y células HeLa.

### Material y reactivos empleados

- Cultivo exponencial en medio axénico de las cepas.
- Placas de agar a distinta osmolaridad.
- *E. coli* CECT 515.
- Células inmortalizadas epiteliales de córnea humana (CEpiCH) (Innoprot, P10871-IM).
- Células HeLa (ATCC CCL-2).
- Medio PYG+B y CERVA a distintos pHs (3, 4, 7 y 9).
- Medio IM-Corneal Epithelial Cell (de sus siglas en inglés CEpiCM) (Innoprot, P60131).
- Suplemento de crecimiento para las células epiteliales de córnea (de sus siglas en inglés CEpiCGS) (Innoprot, P60131).
- Kit de colágeno I (Innoprot, P8188).
- PBS 50 x (Sigma, D1408). Se emplea a 1x.
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's (de sus siglas en inglés DMEM) (Sigma, D6429).
- Suero fetal bovino (SFB) (Sigma, F7524). Se descomplementa antes de usar.
- Penicilina y estreptomicina (Sigma, P4333).
- Reactivo MTT preparado a 5 mg/ml en PBS 1x (Sigma, M2003).
- Rojo Congo (Sigma, C-6767). Se emplea al 0,2 %.
- Tripan blue (Sigma, T8154).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, 131954.1611).
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Cámara de recuento Neubauer.
- Placas de 24 pocillos.
- Flasks de cultivo T75 con filtro en el tapón.
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas estériles.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Campana de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A).
- Incubadoras a 25, 32 y 37 °C.
- Incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub>.
- Microscopio óptico (MOTIC, BA-300) con cámara digital acoplada de 10 Mpx.
- Espectrofotómetro.

## Metodología

### Ensayo de termotolerancia.

1. Desprender los trofozoítos del flask de cultivo T25 por choque frío de cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento.
2. En la cabina de flujo laminar, transferir el cultivo con las amebas libres en el medio desde los flasks a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
3. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de PBS 1x.
4. Retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % a una proporción de 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
5. Ajustar el inóculo de trofozoítos a  $10^5$  por pocillo.
6. Añadir a cada pocillo 60  $\mu$ l de la suspensión ajustada de trofozoítos y 540  $\mu$ l del medio de cultivo correspondiente (PYG+B o CERVA). Incubar las distintas placas a 25, 32 y 37 °C. Cada temperatura se ensaya por triplicado y el ensayo se repitió al menos dos veces.
7. Observar por microscopio óptico el crecimiento de los trofozoítos a 1, 3 y 7 días desde su incubación.
8. Realizar en cada tiempo fotografías y determinar la tasa de crecimiento de la cepa, pudiendo ser: -: No se observa crecimiento. +: 10 - 25 % de monocapa. ++: 25 - 50 % de monocapa. +++: 50 - 90 % de monocapa. ++++: monocapa en total confluencia.
9. En las cepas *A. astronyxis* CCAP 1501/9, *A. castellanii* ATCC 30234, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. culbertsoni* ATCC 30171, BYB2017, ISCIU-UAH 64/13, e ISCIU-UAH 85/13, se estudió la viabilidad de los trofozoítos a los distintos tiempos.
10. La viabilidad se estudió por recuento manual de los trofozoítos.
11. Desprender los trofozoítos por choque frío, retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % a una proporción de 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.

### Preparación de placas de agar a distinta molaridad.

1. Preparar placas de agar-agar al 1 %, para ello, mezclar el agar-agar con manitol para que la concentración final del manitol sea de 0,3; 0,5 y 1 M.
2. Autoclavar 20 min a 121 °C. Atemperar el agar a 60 °C, y plaquearlo en la campana de flujo laminar.
3. Una vez que se ha solidificado el agar, añadir *E. coli* muerto de tal forma que cubra toda la superficie de las placas.
4. Conservar a 4 °C hasta su uso.



**Ensayo de osmotolerancia.**

1. Desprender los trofozoítos del flask de cultivo T25 por choque frío de cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento.
2. En la cabina de flujo laminar, transferir las amebas libres en el medio desde los flasks a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
3. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de PBS 1x.
4. Retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % a una proporción de 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
5. Ajustar el inóculo de trofozoítos a  $10^3$  por placa.
6. Añadir 50  $\mu$ l de la suspensión de trofozoítos ajustada a cada placa de distinta osmolaridad (0; 0,3; 0,5 y 1 M). Colocar la suspensión justo en el centro de la placa y marcar con un rotulador la zona en la que se ha depositado. Incubar las placas a la temperatura óptima de la cepa.
7. Con la ayuda de una regla, realizar la medición del avance de los trofozoítos sobre el agar transcurridos 1, 3, 5 y 7 días de incubación. Se considera tolerancia positiva a las distintas concentraciones cuando el halo de crecimiento al tercer día es mayor de 0,5 cm (Fernández, 2014) y la medición de las placas, finaliza cuando el control (0 M) alcanza los bordes de la placa.

**Ensayo de crecimiento a diferentes pHs.**

1. Desprender los trofozoítos del flask de cultivo T25 por choque frío de cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento.
2. En la cabina de flujo laminar, transferir las amebas libres en el medio desde los flasks a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
3. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de PBS 1x.
4. Retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % a una proporción de 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
5. Ajustar el inóculo de trofozoítos a  $10^5$  por pocillo.
6. Añadir a cada pocillo 60  $\mu$ l de la suspensión ajustada de trofozoítos y 540  $\mu$ l del medio de cultivo correspondiente (PYG+B o CERVA) a los diferentes pHs (3, 5, 7 y 9). Incubar a la temperatura óptima de cada cepa. Cada pH se ensaya por triplicado y el ensayo se repitió al menos dos veces.
7. Observar en el microscopio óptico el crecimiento de los trofozoítos a 1, 3 y 7 días desde su incubación.
8. Realizar fotografías en cada tiempo y determinar la tasa de crecimiento de la cepa, pudiendo ser: -: No se observa crecimiento. +: 10 - 25 % de monocapa. ++: 25 - 50 % de monocapa. +++: 50 - 90 % de monocapa. ++++: monocapa en total confluencia.
9. En las cepas *A. astronyxis* CCAP 1501/9, *A. castellanii* ATCC 30234, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. culbertsoni* ATCC 30171, BYB2017, ISCIII-UAH 64/13, e ISCIII-UAH 85/13, se estudió la viabilidad de los trofozoítos a los distintos tiempos.
10. La viabilidad se estudió por recuento manual de los trofozoítos.
11. Desprender los trofozoítos por choque frío, retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % a una proporción de 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.

**Cultivo y mantenimiento de células epiteliales de córnea humana (CEpiCH).**

1. Estas células necesitan colágeno para poder adherirse al flask de cultivo o a los pocillos de una placa. Por lo que, el primer paso, es tratar con colágeno tipo 1 (de aquí en adelante abreviado "I") los flasks.
2. En la cabina de flujo laminar, diluir los 2 ml de "100x Collagen I Solvent" del kit de colágeno I (Innoprot) en 198 ml de agua destilada estéril, de tal forma que el producto queda a 1x. Conservar a 2 - 8 °C.
3. Diluir el colágeno 1 mg/ml a 50 µg/ml con "1x Collagen I Solvent". Añadir 7,5 ml (100 µl/cm<sup>2</sup>) al flask de cultivo T75 e incubar mínimo 30 min a 37 °C.
4. Retirar el colágeno y lavar dos veces el flask con PBS 1x. El flask se puede utilizar inmediatamente o dejar que se seque durante 1 h en la cabina de flujo laminar.
5. Preparar el medio de cultivo completo en la cabina de flujo laminar: a los 500 ml del medio base CEpiCM añadir 5 ml de suplemento de crecimiento CEpiCGS, 5 ml de penicilina-estreptomicina y 50 ml de SFB descomplementado. Añadir 20 ml de medio completo al flask T75.
6. Descongelar las células en el baño de 37 °C, secar el vial y lavarlo con etanol al 70 %. Añadir las células al flask con la ayuda de una micropipeta e incubarlo a 37 °C en una atmósfera con un 5 % CO<sub>2</sub>.
7. Al día siguiente, retirar el medio y añadir medio fresco para retirar los residuos de DMSO y las células que no se han adherido.
8. Cambiar el medio cada 3 días mientras el cultivo tenga una confluencia del 70 %. Cuando el medio alcance una confluencia del 90 %, cambiarlo cada día o cada 2 días.
9. Cuando alcanza el 90 % de confluencia, se pueden hacer subcultivos ya sean a otro flask o a placas multipocillos para realizar ensayos. Para ello, tratar con colágeno (apartados 1 - 4) el flask o la placa multipocillo.
10. Retirar el medio de cultivo del flask que está al 90 % de confluencia. Lavar 2 veces con PBS 1x atemperado a 37 °C.
11. Retirar el PBS 1x, añadir 5 ml de tripsina atemperada a 37 °C al flask e incubar de 3 a 5 min a 37 °C.
12. Observar al microscopio que las células se hayan despegado del fondo y añadir al flask 5 ml de medio completo CEpiCH.
13. Retirar del flask los 10 ml y centrifugar 5 min a 1.000 rpm.
14. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de medio completo CEpiCH.
15. Retirar una alícuota y mezclar con tripan blue a una proporción de 1:1 para realizar el recuento de células en la cámara de Neubauer, contando sólo los 4 cuadrados del retículo de glóbulos blancos. Para conocer el número de células por ml se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cél}}{\text{ml}} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de cél. contadas} * \text{dilución} * 10.000}{\text{n}^{\circ} \text{ de cuadrados contados}}$$

16. Ajustar la suspensión de células a 750.000 por flask o bien 20.000 células por pocillo (se determinó previamente la densidad de células mediante el ensayo MTT).
17. Sembrar 1 ml de la suspensión de células ajustada al flask o 250 µl a cada pocillo. Añadir 9 ml de medio completo por cada flask o 250 µl a cada pocillo (NOTA: en este paso se usa para el medio SFB al 2 %, en vez de al 10%). Incubar a 37 °C en una atmósfera con un 5 % CO<sub>2</sub>.

**Cultivo y mantenimiento de células HeLa.**

1. Preparar el medio de cultivo completo en la cabina de flujo laminar: a los 500 ml del medio DMEM añadir 5 ml de penicilina-estreptomicina y 50 ml de SFB descomplementado. Añadir 10 ml de medio completo al flask T75.
2. Descongelar las células en el baño de 37 °C, secar el vial y lavarlo con etanol al 70 %. Añadir las células al flask con la ayuda de una micropipeta e incubarlo a 37 °C en una atmósfera con un 5 % CO<sub>2</sub>.
3. Al día siguiente, retirar el medio y añadir medio fresco para retirar los residuos de DMSO y las células que no se han adherido.
4. Mientras el cultivo tenga una confluencia del 70 %, el medio se cambia cada 4 días. Cuando el medio alcance una confluencia del 90 %, cambiarlo cada 2 días.
5. Cuando alcanza el 90 % de confluencia, se pueden hacer subcultivos ya sea a otro flask o a placas multipocillos para realizar ensayos.
6. Retirar el medio de cultivo del flask que está al 90 % de confluencia. Lavar 2 veces con PBS 1x atemperado a 37 °C.
7. Retirar el PBS 1x, se añaden 5 ml de tripsina atemperada a 37 °C e incubar de 3 a 5 min a 37 °C.
8. Observar al microscopio que las células se hayan despegado y después añadir al flask 5 ml de medio completo DMEM.
9. Retirar del flask los 10 ml y centrifugar 5 min a 1.000 rpm.
10. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de medio completo DMEM.
11. Retirar una alícuota y mezclar con tripan blue a una proporción 1:1 para realizar el recuento de células en la cámara de Neubauer contando sólo los 4 cuadrados del retículo de glóbulos blancos. Para conocer el número de células por ml se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cél}}{\text{ml}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cél. contadas} * \text{dilución} * 10.000}{\text{n}^\circ \text{ de cuadrados contados}}$$

12. Ajustar la suspensión de células a 50.000 por flask o 10.000 células por pocillo (este parámetro fue determinado por la Unidad de Cultivos Celulares de la UAH).
13. Sembrar 1 ml de la suspensión de células ajustada a otro flask o bien usar 250 µl por pocillo. Añadir 9 ml de medio completo por cada flask o 250 µl a cada pocillo. Incubar a 37 °C en una atmósfera con un 5 % CO<sub>2</sub>.

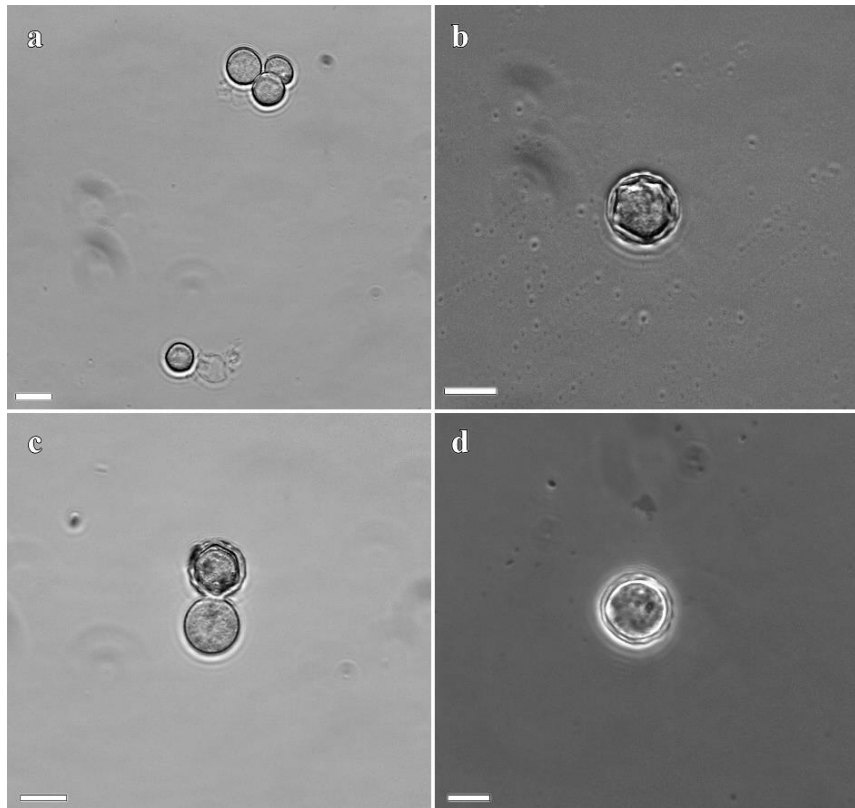
### **Ensayo de citopatogenia.**

1. Preparar placas de 24 pocillos con 20.000 células CEpiCH o 10.000 células HeLa, tal y como se explica en los apartados anteriores.
2. Incubar estas placas a 37 °C en una atmósfera con un 5 % CO<sub>2</sub> hasta que forman una monocapa en los pocillos.
3. Desprender los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento del flask de cultivo T25 por choque frío.
4. En la cabina de flujo laminar, transferir el cultivo con las amebas libres desde los flasks a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
5. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de PBS 1x.
6. Retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % a una proporción de 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
7. En el caso de los ensayos de citopatogenia en células CEpiCH, ajustar el inóculo de trofozoítos a 100, 1.000, 2.000, 4.000, 10.000 y 20.000 por pocillo. En el caso de los ensayos en células HeLa, ajustar el inóculo a 50, 500, 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 y 40.000 trofozoítos por pocillo.
8. Añadir a cada pocillo, con monocapa de células de mamífero, 60 µl de la suspensión ajustada de trofozoítos y 440 µl del medio de cultivo celular correspondiente (medio CEpiCM o DMEM). Salvo a los pocillos controles, que únicamente tendrán células humanas con su correspondiente medio. Incubar las placas a 37 °C en una atmósfera con un 5 % CO<sub>2</sub>.
9. Observar al microscopio óptico la degradación de las células CEpiCH y HeLa a las 0, 3, 6 y 24 horas.
10. A las 24 horas, añadir a cada pocillo 50 µl del reactivo MTT al 5 mg/ml e incubar la microplaca a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub> durante un mínimo de 3 horas. El MTT es un ensayo colorimétrico de viabilidad basado en la reducción de sales de tetrazolio, es decir, el bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2-5-difeniltetrazol (MTT) es reducido por acción de las enzimas mitocondriales tipo succinato deshidrogenasa presentes en las células, a (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-1,3-difenilformazán (Formazán), generando un color violeta en el pocillo. Por lo tanto, a mayor número de células vivas, mayor el color y por ende mayor la absorbancia que se obtiene. Los trofozoítos no son capaces de reducir el MTT a formazán (Hereadero-Bermejo et al., 2013).
11. Transcurrido el tiempo de incubación, retirar el contenido de los pocillos y añadir 500 µl de DMSO. El DMSO solubiliza el formazán, permitiendo medir la absorbancia.
12. Medir la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización morfológica de las cepas de *Acanthamoeba* spp.

La caracterización morfológica fue la primera herramienta disponible para identificar el género *Acanthamoeba* y sus especies. Hoy en día, la identificación morfológica sigue siendo útil para identificar el género ya que los quistes de este género son muy característicos. Los quistes poseen una doble pared: ectoquiste y endoquiste, con morfología muy variable. El uso de este carácter en la clasificación de las amebas tiene sus limitaciones (Sawyer, 1971). A pesar de ello, se llega a emplear para situarlas en los distintos morfogrupos. Las cepas estudiadas en esta tesis pertenecen sobre todo al morfogrupo II (Martín-Pérez et al., 2017), estos quistes se caracterizan por tener el ectoquiste rugoso, mientras que el endoquiste puede ser redondo, ovoide, poligonal o triangular (Figura 3.8).

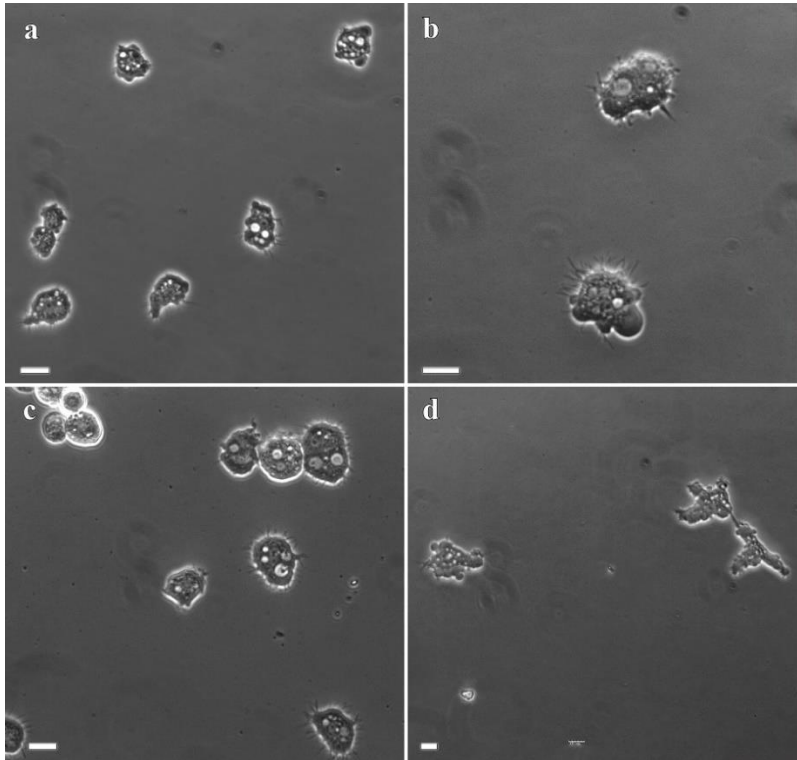


**Figura 3.8.** Fotografías de quistes de *Acanthamoeba* spp. observados al microscopio de contraste de fases. **a.** Quistes de BYB2017. **b.** Quistes de ISCIII-UAH 64/13. **d.** Quistes de ISCIII-UAH 85/13. **e.** Quistes de ISCIII-UAH 161/15. La escala es de 15  $\mu\text{m}$ , excepto la Figura 3.8d que se corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

Además, de los aislados de muestras clínicas se tomaron medidas tanto de los quistes como de los trofozoítos (**Tabla 3.3 y Figura 3.9**). Cabe destacar que el tamaño de los trofozoítos cambia considerablemente de un aislado a otro (Khan, 2006), y por tanto no proporciona información relevante. Sin embargo, Khan (2015) indica que las cepas patógenas presentan un elevado número de acantópodos. Este autor sugiere que quizá éstos pueden jugar un papel importante en la patogénesis de *Acanthamoeba*, siendo los que modulan la adhesión a las células epiteliales corneales (Khan, 2001).

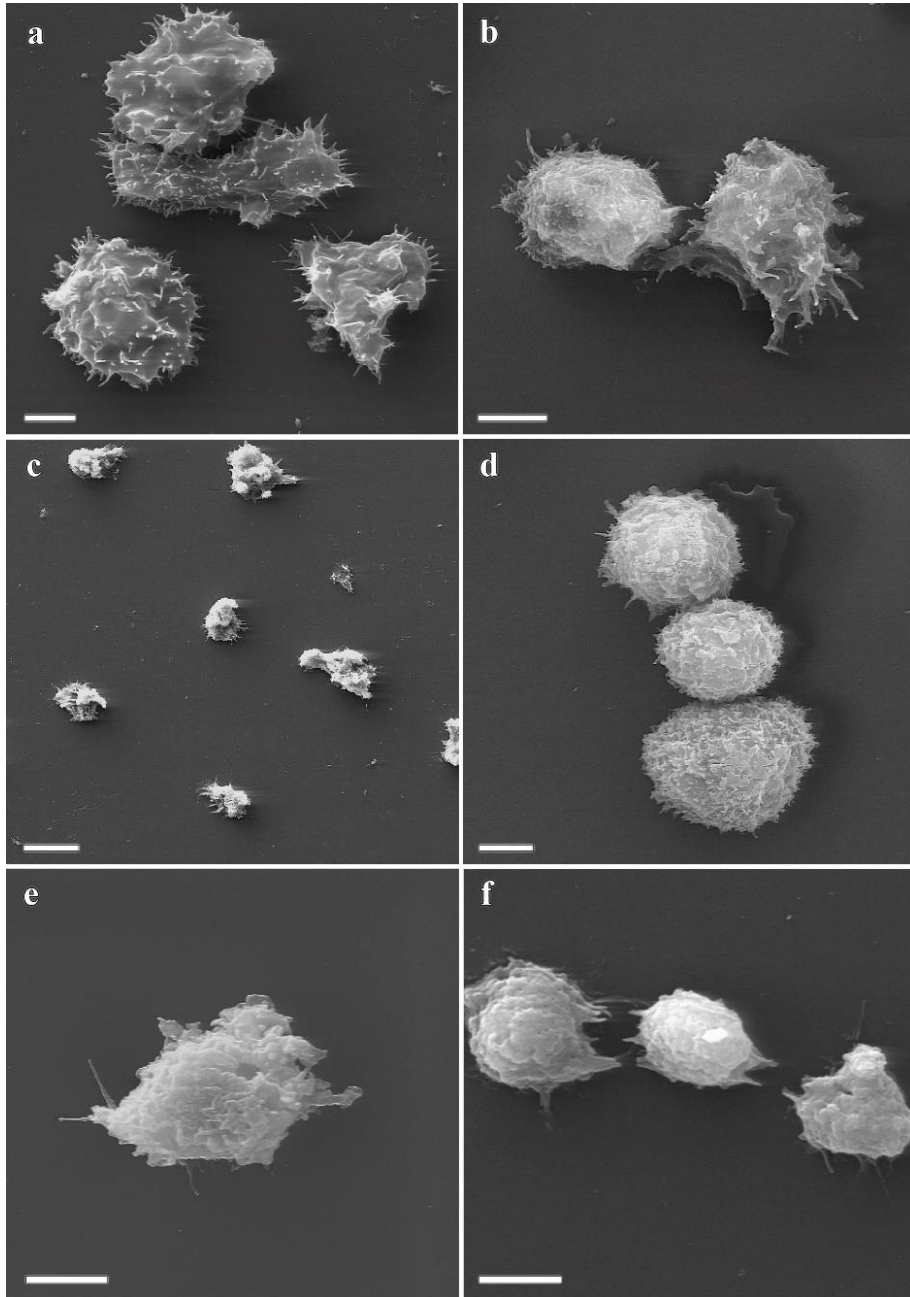
**Tabla 3.3.** Media y desviación estándar (en  $\mu\text{m}$ ) de los trofozoítos y quistes.

Cepa	Trofozoíto	Quiste
ISCIII-UAH 64/13	15,88 $\pm$ 5,08	9,34 $\pm$ 2,34
ISCIII-UAH 85/13	12,21 $\pm$ 3,08	8,52 $\pm$ 1,76
ISCIII-UAH 66/14	13,24 $\pm$ 5,36	4,93 $\pm$ 0,81
ISCIII-UAH 161/15	17,17 $\pm$ 4,15	8,03 $\pm$ 1,30
ISCIII-UAH 163/15	15,27 $\pm$ 2,81	8,12 $\pm$ 2,12



**Figura 3.9.** Fotografías de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. observados al microscopio de contraste de fases. **a.** Trofozoítos de la cepa BYB2017. **b.** Trofozoítos de ISCIII-UAH 64/13. **c.** Trofozoítos de ISCIII-UAH 85/13. **d.** Trofozoítos de ISCIII-UAH 161/15. La escala es de 15  $\mu\text{m}$ , excepto la Figura **d** que se corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

En las fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido (**Figura 3.10**), se pueden observar las cepas que se han aislado de muestras clínicas. La mayoría presenta numerosos acantópodos en su superficie, salvo las cepas ISCIII-UAH 161/15 e ISCIII-UAH 163/15, a pesar de que proceden de pacientes con queratitis. Se desconoce si el motivo se debe al prolongado tiempo de cultivo en medio axénico o porque son cepas más sensibles que han sufrido daños durante su preparación para MEB.



**Figura 3.10.** Fotografías de trofozoitos de *Acanthamoeba* spp. observados al MEB. **a.** Trofozoitos de *A. polyphaga* 2961. **b.** Trofozoitos de la cepa BYB2017. **c.** Trofozoitos de ISCIII-UAH 64/13. **d.** Trofozoitos de ISCIII-UAH 85/13. **e.** Trofozoitos de ISCIII-UAH 161/15. **f.** Trofozoitos de ISCIII-UAH 163/15. La escala es de 5  $\mu$ m, excepto la Figura c que se corresponde a 10  $\mu$ m.



## 4.2. Determinación del genotipo de los aislados

El genotipo más común presente tanto en el medio ambiente como en los casos de queratitis amebianas es el T4 (Khan, 2006). Los resultados obtenidos del análisis filogenético mostraron que los aislados de los embalses pertenecen a los genotipos T2 (P-UAH-O3 y PV-UAH-V2) y T4 (EV-UAH-P6 y EV-UAH-V7), no es de extrañar que la mitad de las cepas pertenezcan al genotipo T2, ya que este es el genotipo más común en las muestras ambientales de países tales como Turquía, Irán, Egipto, Brasil... (Kilic et al., 2004; Maghsood et al., 2005; Lorenzo-Morales et al., 2006; Winck et al., 2011). También coincide con los estudios realizados en España. El genotipo aislado con mayor frecuencia del medio ambiente ya sea de muestras de suelo o de agua, es el T4 seguido del T2 (Magnet et al., 2013; Reyes-Batle et al., 2014 y 2016).

En el caso de las muestras clínicas estudiadas en la presente tesis, la mayoría pertenece al genotipo T4, salvo el aislado ISCIH-UAH 66/14 que pertenece al genotipo T3 (Figura 3.11) (Martín-Perez et al., 2017).

En la revisión bibliográfica de los genotipos aislados de los casos de queratitis amebianas realizada en el capítulo 1 de esta tesis, se muestra que el genotipo más frecuente es T4 seguido del T3 (Figura 3.12).

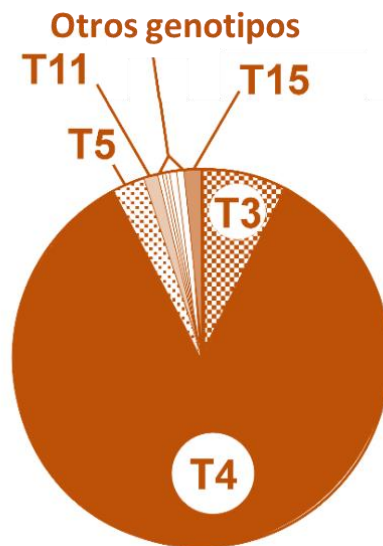


Figura 3.12. Gráfico de la frecuencia de los genotipos aislados en los casos de queratitis amebiana.

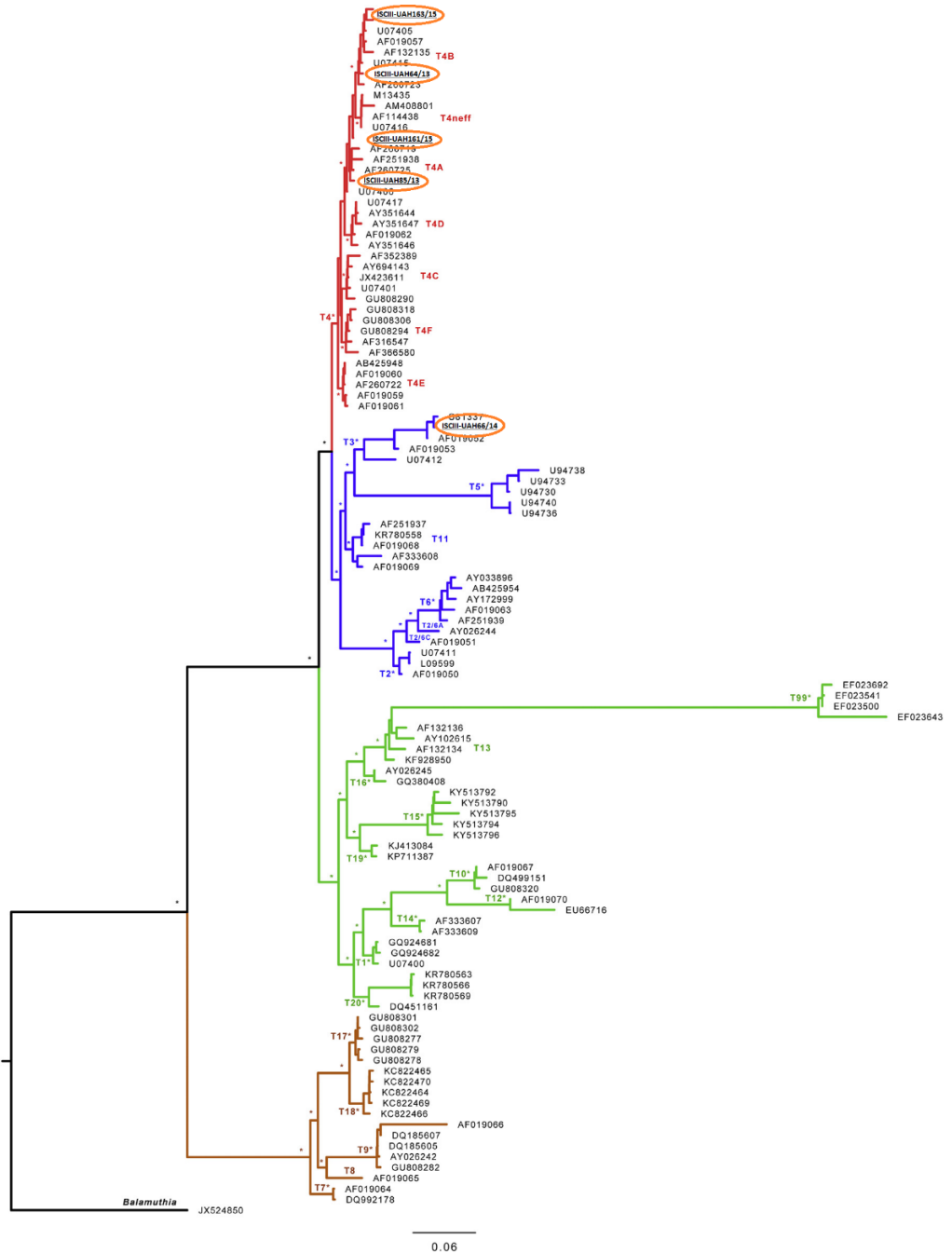


Figura 3.11. Árbol filogenético Bayesiano que incluye las cepas aisladas de las muestras clínicas.

### 4.3. Evaluación de los factores de patogenicidad indirectos

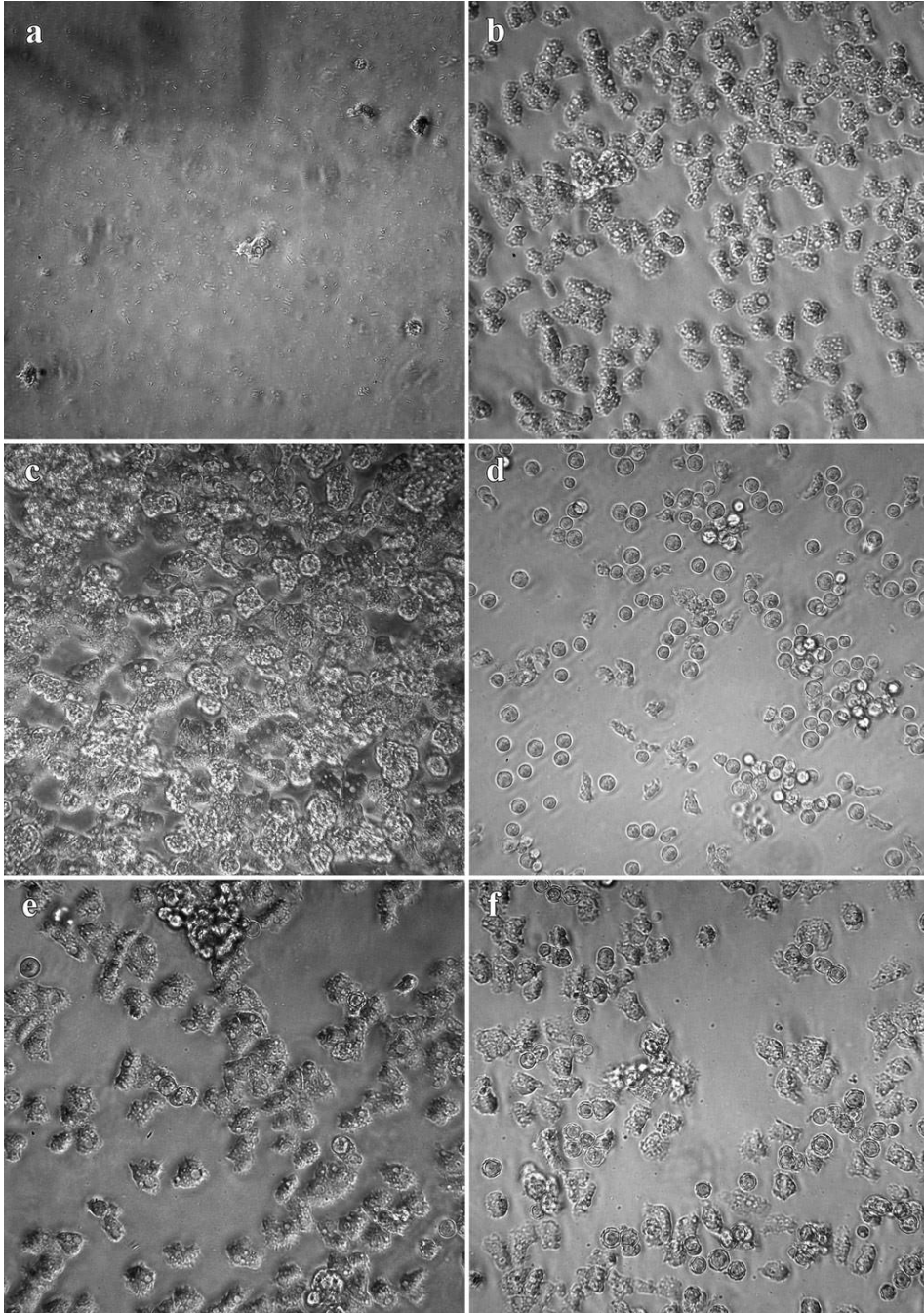
La patogenicidad de la queratitis causada por las especies del género *Acanthamoeba* no es del todo comprendida, ya que se han aislado cepas de pacientes con queratitis y ambientales con el mismo genotipo (Booton et al., 2005; Di Cave et al., 2009; Chan et al., 2011; Behera, et al., 2016; Martín-Pérez et al., 2017). Para poder definir como de patógena es una cepa (ya sea aislada de muestras clínicas o ambientales), se han propuesto una serie de características o factores que deben de poseer las cepas más virulentas de *Acanthamoeba* (Alsam et al., 2005; Martín-Navarro et al., 2008; Carlesso et al., 2014). Concretamente, se han mencionado las siguientes: crecimiento óptimo a temperaturas de 30 - 37 °C, gran tolerancia a los cambios de osmolaridad y pH, presencia de numerosos acantópodos en la superficie de los trofozoítos (Khan, 2001; 2006; 2015), elevada actividad proteasa (Cao et al., 1998), capacidad de lisar una monocapa de células de mamífero (Khan et al., 2000), capacidad de producir infecciones en ratones de laboratorio (González-Robles et al., 2013, 2014) o en otros animales de experimentación (Mortazavi et al., 2009; Khan, 2010). Varios de estos factores de patogenicidad se analizaron con el fin de caracterizar el potencial patógeno de las cepas presentes en el laboratorio de parasitología de la Universidad de Alcalá.

La termotolerancia se estudió en todos los aislados presentes en el laboratorio de manera cualitativa, excepto las cepas ISCIII-UAH 66/14, PV-UAH-V1 y PV-UAH-V2 dado que su tasa de crecimiento es muy lenta. Además, en los aislados *A. astronyxis* CCAP 1501/9, *A. castellanii* ATCC 30234, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. culbertsoni*, BYB2017, ISCIII-UAH 64/13 e ISCIII-UAH 85/13, se evaluó el porcentaje de viabilidad de manera cuantitativa.

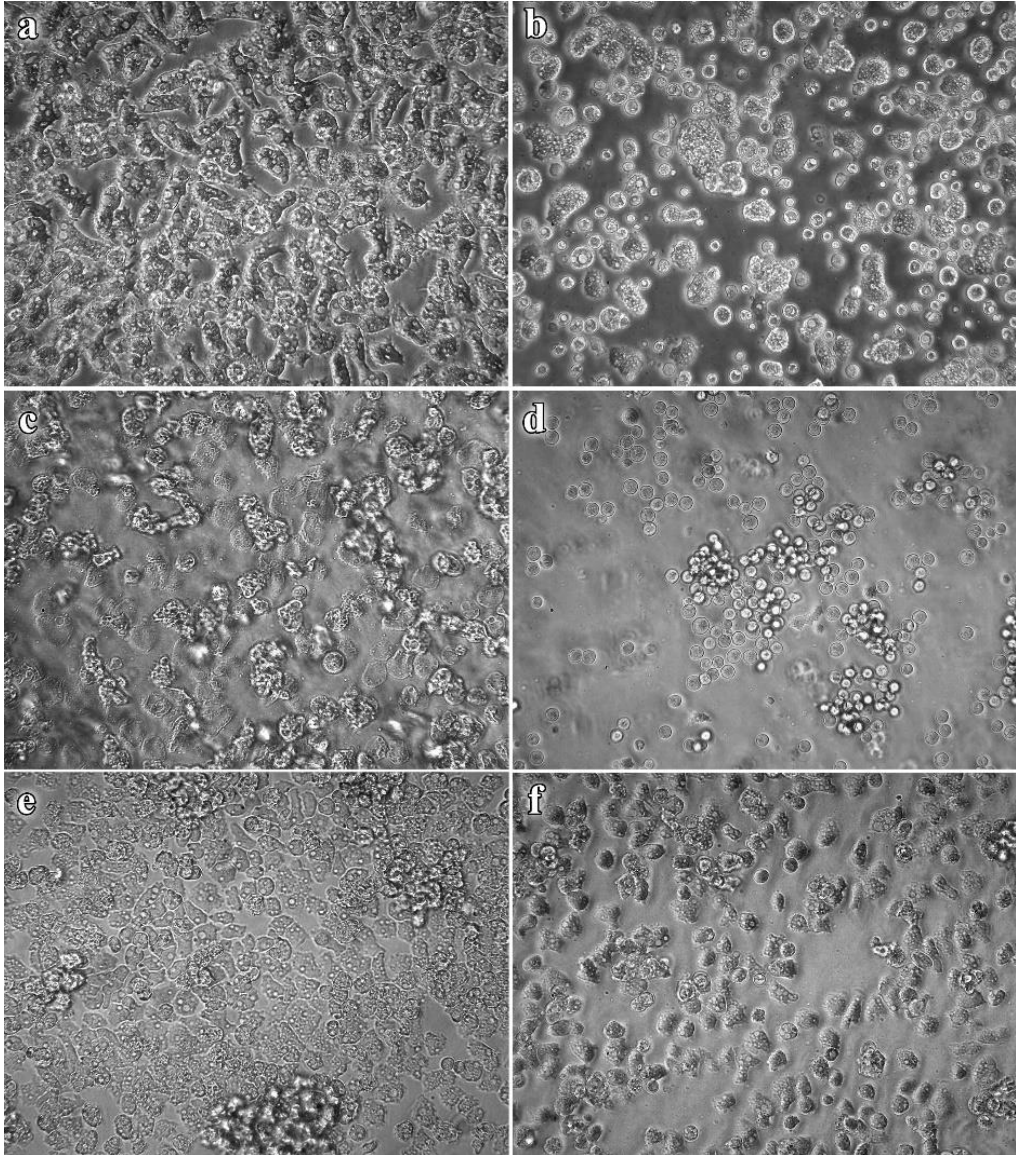
Se estableció que una cepa es termotolerante al formar el 50 % de la monocapa a los 3 días de incubación (+++) a temperaturas de 30 - 37 °C. Según el análisis cualitativo (**Tabla 3.4**, **Figura 3.13**, **Figura 3.14** y **Figura 3.15**) los aislados que mostraron esta capacidad son *A. astronyxis* CCAP 1501/9, *A. polyphaga* 2961, ISCIII-UAH 64/13, ISCIII-UAH 85/13, ISCIII-UAH 161/15, EV-UAH-P6, EV-UAH-V7 y P-UAH-O3 a una temperatura de 32 °C. Sin embargo, ninguna de estas cepas creció bien a 37 °C. Esto parece indicar que estas cepas tienen potencial de invadir el epitelio corneal, ya que la temperatura de la córnea es de 32 °C (Tan et al., 2009). Pero, teóricamente, no serían capaces de invadir órganos internos y causar EGA (Adamska et al., 2014). Las cepas *A. polyphaga* 2961, ISCIII-UAH 64/13, ISCIII-UAH 85/13, ISCIII-UAH 161/15 provienen de muestras de pacientes con queratitis, por lo que se sabe que son capaces de invadir el epitelio corneal. La cepa *A. astronyxis* CCAP 1501/9 fue aislada de un lago, mientras que los aislados EV-UAH-P6, EV-UAH-V7 y P-UAH-O3 fueron encontradas en limnoembalses. Estas cepas podrían ser capaces de causar queratitis amebiana, no sólo por su capacidad de crecer a 32 °C, sino también porque se encuentran en aguas recreativas, aumentando las posibilidades de entrar en contacto con bañistas portadores de lentes de contacto o con alguna lesión en la córnea que facilite la adhesión (y posterior entrada) de *Acanthamoeba* en la superficie del ojo (Cheng et al., 2013; Khan, 2015). En estudios *in vitro* se ha comprobado que los trofozoítos de *Acanthamoeba* son capaces de destruir el epitelio corneal humano sin que éste sufra una lesión previa (Moore et al., 1991; Ubelaker et al., 1991). Por tanto, en teoría, cualquier persona que nadara o se bañara en las aguas donde fueron aisladas, podrían contraer una queratitis amebiana.

**Tabla 3.4.** Estudio de termotolerancia. -: No se observa crecimiento. +: 10 - 25 % de monocapa. ++: 25 - 50 % de monocapa. +++: 50 - 90 % de monocapa. ++++: monocapa en total confluencia. Q: quistes.

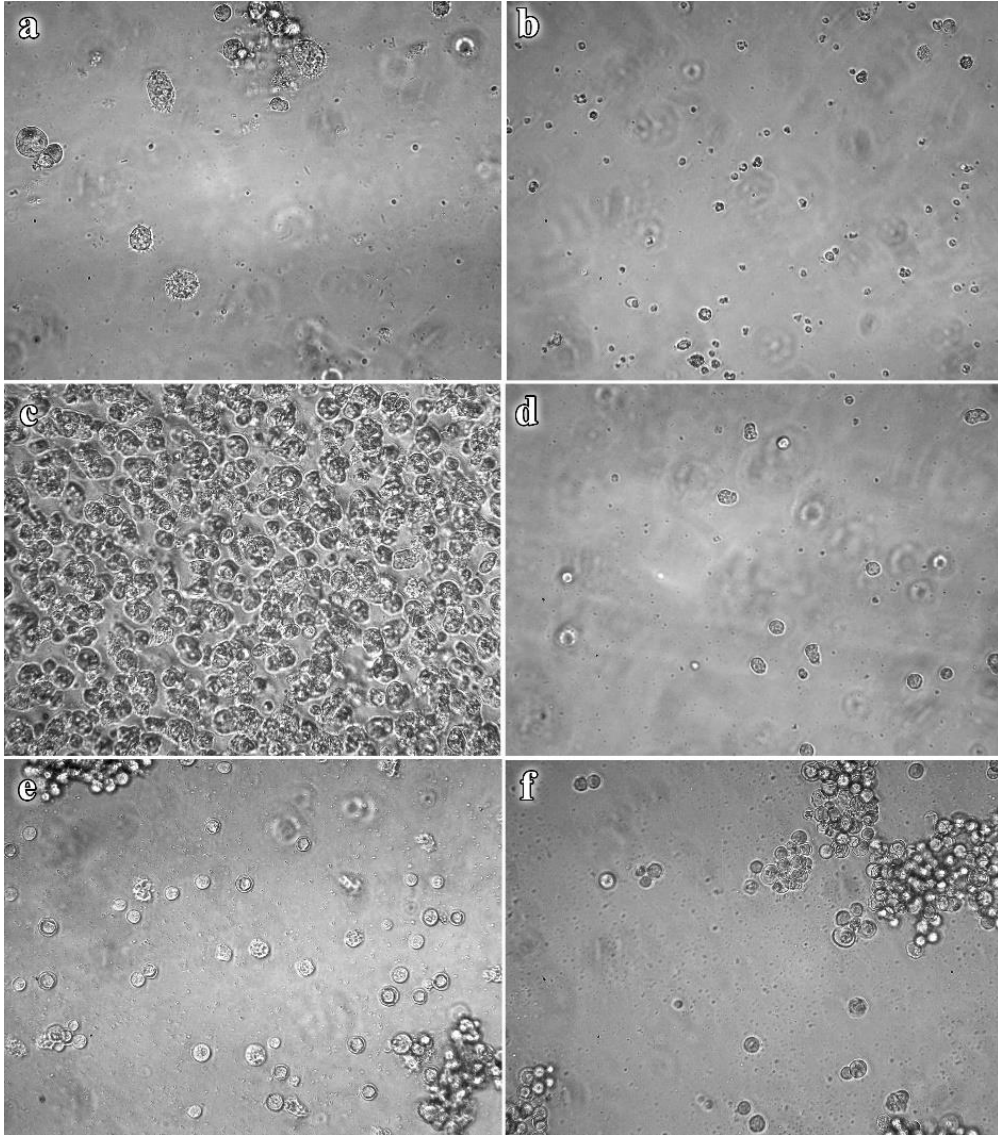
Cepa	Dia 1		Dia 3		Dia 7	
	25 °C	32 °C	25 °C	32 °C	25 °C	32 °C
<i>A. astronyxis</i> CCAP 1501/9	++	++	+	+++	+	+++
<i>A. castellanii</i> ATCC 30234	+++	+++	+++	++	+++	++
<i>A. castellanii</i> CCAP 1501/1A	+++	+++	+++	++	+++	++
<i>A. culbertsoni</i> ATCC 30171	+++	+++	+++	++	+++	++
<i>A. polyphaga</i> 2961	++	++++	++	+++	+++	+++
BYB2017	++	+++	+++	++/Q	+/Q	+/Q
ISIII-UAH 64/13	+++	++++	+++	+++	+/Q	+++/Q
ISIII-UAH 85/13	+++	+++	+++	+++	+/Q	+++/Q
ISIII-UAH 161/15	+++	++++	+++	++++	+++/Q	+++/Q
EV-UAH-P6	+++	++++	+++	++++	++++	+++
EV-UAH-V7	+	++	++	+++	++	+++
P-UAH-O3	++	+++	+++	++++	++++	+++/Q



**Figura 3.13.** Fotografías de los ensayos de termotolerancia a 25 °C al día 7. **a.** Trofozoitos de *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** Trofozoitos de *A. castellanii* ATCC 30234. **c.** Trofozoitos de *A. culbertsoni* ATCC 30171. **d.** Trofozoitos y quistes de BYB2017. **e.** Trofozoitos de ISCIII-UAH 64/13. **f.** Trofozoitos de ISCIII-UAH 85/13.



**Figura 3.14.** Fotografías de los ensayos de termotolerancia a 32 °C al día 7. **a.** Trofozoítos de *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** Trofozoítos de *A. castellanii* ATCC 30234. **c.** Trofozoítos de *A. culbertsoni* ATCC 30171. **d.** Trofozoítos y quistes de BYB2017. **e.** Trofozoítos de ISCIII-UAH 64/13. **f.** Trofozoítos de ISCIII-UAH 85/13.

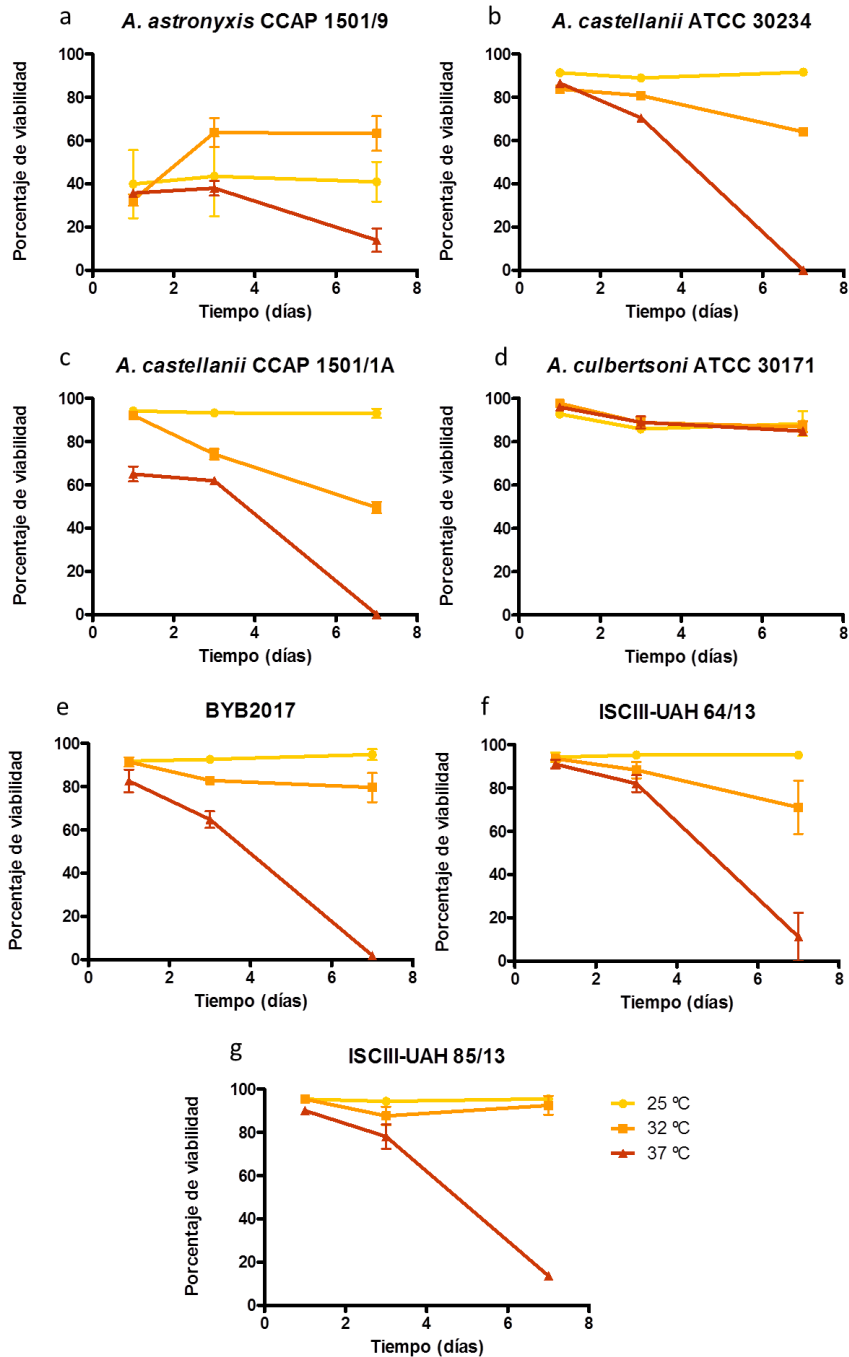


**Figura 3.15.** Fotografías de los ensayos de termotolerancia a 37 °C al día 7. **a.** Trofozoitos de *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** Trofozoitos de *A. castellanii* ATCC 30234. **c.** Trofozoitos de *A. culbertsoni* ATCC 30171. **d.** Trofozoitos de BYB2017. **e.** Trofozoitos y quistes de ISCIH-UAH 64/13. **f.** Trofozoitos y quistes de ISCIH-UAH 85/13.

En los estudios cuantitativos de viabilidad de los trofozoítos (**Figura 3.1**), se observó que la formación de la monocapa completa no se corresponde a porcentajes de viabilidad del 100 %. En el caso de *A. astronyxis* CCAP 1501/9, se pudo observar al séptimo día de cultivo una monocapa en el pocillo, pero al hacer el recuento manual, sólo un 60 % de los trofozoítos eran viables. En el resto de los casos, la viabilidad fue más alta (80 - 95 %) sin alcanzarse una monocapa completa en el pocillo. Estas diferencias pueden deberse a que, a mayor número de trofozoítos, menor es la viabilidad de estos, ya que se agotan los nutrientes del medio de cultivo. Mientras que, en los casos en los que hay menor número de trofozoítos, la mayoría son viables porque no se han agotado los nutrientes del medio. El factor del medio de cultivo ha de tenerse en cuenta a la hora de realizar los ensayos de termotolerancia, ya que se puede pensar que una cepa no es termotolerante, mientras que el problema radica en que no tiene nutrientes suficientes para crecer. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo en el que se observan y recuentan las cepas durante los ensayos, debido a que la tasa de crecimiento no es igual en todas las cepas. Por ejemplo, las cepas BYB2017, ISCIII-UAH 84/13 e ISCIII-UAH 161/15 tienen una tasa de crecimiento más alta que el resto, así pues, en las observaciones realizadas a los 7 días se observaron quistes. Ahora bien, estos quistes no indican que la cepa no tolere crecer a temperaturas de 25 y 32 °C, sino todo lo contrario: lo que ocurre es que ha agotado los nutrientes y por eso se enquistó. Por tanto, a la hora de realizar este tipo de ensayo hay que discernir si la falta de crecimiento es debida a la temperatura o a la escasez de nutrientes presentes en el medio.

En este caso se puede determinar que tanto cepas aisladas de muestras clínicas como de muestras ambientales son termotolerantes.





**Figura 3.16.** Porcentaje de viabilidad del ensayo de termotolerancia. **a.** *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** *A. castellanii* ATCC 30234. **c.** *A. castellanii* CCAP 1501/1A. **d.** *A. culbertsoni* ATCC 30171. **e.** BYB2017. **f.** ISCIU-UAH 64/13. **g.** ISCIU-UAH 85/13.

En cuanto a la osmotolerancia, quizás no se ha definido bien cuando se considera que una cepa es osmotolerante. Algunos autores afirman que una cepa es osmotolerante cuando puede crecer en manitol 1 M (250 mmol/l) (Khan y Tareen, 2003, Chan et al., 2011; Heredero-Bermejo, 2015), mientras que otros han establecido que una cepa es osmotolerante cuando el halo de crecimiento en la placa al tercer día es mayor de 0,5 cm sin importar la concentración de la placa (Fernández, 2014). Sin embargo, estos límites no están relacionados con la osmolaridad que se puede encontrar en la córnea, hecho señalado anteriormente por Chan et al., (2011). La osmolaridad de la córnea depende directamente de la película lagrimal, variando entre 302 mmol/l en ojos sanos y 312 mmol/l en ojos secos. Curiosamente, el uso de lentes de contacto y el tipo de lentillas modifican estos valores en un rango de 297 - 331 mmol/l (Stahl et al., 2012). Teniendo en cuenta estos datos de la osmolaridad de la córnea, se determinó que una cepa se podía considerar osmotolerante cuando era capaz de crecer un mínimo de 0,5 cm a concentraciones de manitol 1 M el día en el cual el control alcanzó su máximo crecimiento.

En base a este límite establecido, ninguna de las cepas presentes en el laboratorio es osmotolerante, ya que se observaron quistes a una concentración de 1 M el día que el control mostró su mayor tasa de crecimiento.

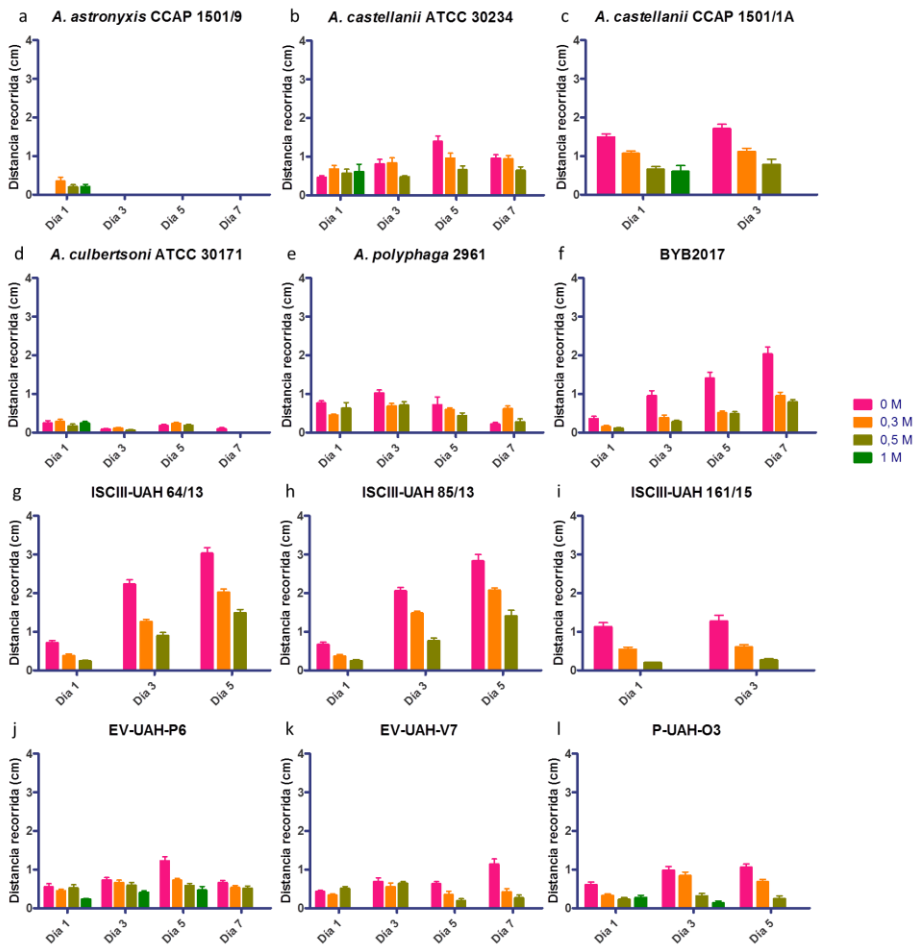
Se observó que las cepas *A. castellanii* ATCC 30234, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. polyphaga* 2961, BYB2017, ISCIII-UAH 64/13, ISCIII-UAH 85/13 y EV-UAH-P6 tenían un crecimiento mayor de 0,5 cm a una concentración de manitol 0,5 M el día que el control positivo alcanzó su mayor tasa de crecimiento (**Figura 3.17b, c, e, f, g y h**). El control positivo del aislado de *A. astronyxis* CCAP 1501/9 nunca creció (**Figura 3.17a**), y en el resto de las concentraciones estudiadas creció levemente el primer día de incubación, mientras que posteriormente sólo se observaron quistes. Se desconoce el motivo, por el cual esta cepa se enquistó en este ensayo. En el caso del aislado de *A. culbertsoni* ATCC 30171 incluso el control positivo no alcanzó ningún día un avance de 0,5 cm (**Figura 3.17d**) se observó crecimiento a la concentración de manitol 1 M el primer día; después sólo se observaron quistes. A concentraciones menores de manitol (0,3 y 0,5 M) se observaron quistes también, pero al séptimo día de ensayo. La cepa ISCIII-UAH 161/15 mostró un halo de crecimiento mayor de 0,5 cm en el control positivo, llegando al borde de la placa el tercer día del ensayo. Igualmente superó los 0,5 cm a una concentración de 0,3 M, mientras que a la concentración de 1 M sólo se observaron quistes (**Figura 3.17i**). La cepa EV-UAH-V7 es capaz de alcanzar (en la placa control) un halo de crecimiento mayor a 0,5 cm, pero no lo superó a las concentraciones de 0,3 y 0,5 M, que es cuando alcanzó su mayor tasa de crecimiento el control positivo (día 7). Sin embargo, sí que los superó en el tercer día del ensayo. A la concentración de 1 M siempre se observaron quistes desde el primer día (**Figura 3.17k**). El caso de la cepa P-UAH-O3 es igual que el de la cepa ISCIII-UAH 161/15, salvo que el control positivo alcanzó el borde el quinto día en vez del tercero y se observó crecimiento en la concentración de 1 M hasta el día 3, después sólo se observaron quistes (**Figura 3.17l**).

Se desconoce si el hecho de que las cepas aisladas de las muestras clínicas hayan estado en cultivo axénico durante 2 años antes de la realización de este ensayo ha podido influir en su osmotolerancia, perdiendo su capacidad patógena. En el estudio de Durham (2012) se obtienen los mismos resultados: las cepas aisladas de casos clínicos se enquistan a una concentración de 1 M. Este autor desconoce el tiempo de cultivo axénico de estas cepas. El fenómeno de pérdida de la capacidad patógena ya ha sido observado previamente en aislados clínicos de *Acanthamoeba* que se cultivan en medios axénicos durante largos períodos de tiempo (Mazur y Hadas, 1994; Hughes et al., 2003; Köehsler et al., 2009; Pumidonming et al., 2010). Otra posible

explicación es que en algunas cepas el aumento de osmolaridad promueve el enquistamiento, como observaron Cordingley et al., (1996) en *A. castellanii* (Neff, ATCC 30010). En sus ensayos, el aumento de la osmolaridad en el medio de cultivo a concentraciones iguales o mayores de 250 mmol/l, ya sea de NaCl o glucosa, favorecía la formación de quistes. También se desconoce, si obtuvieron estos resultados debido a que la cepa que emplearon en el estudio se aisló del medio ambiente, de ahí que no sea osmotolerante.

Incluso, puede que el criterio establecido en esta tesis no es quizá el mejor, ya que no se tiene en cuenta la tasa de crecimiento de cada cepa debido a que no todas las cepas tienen un crecimiento de 0,5 cm. Sin embargo, con las cepas que se enquistan a una concentración de 1 M, no se puede evaluar qué criterio sería el mejor.

Además, cabe destacar que sería más adecuado realizar este ensayo con placas de agar y las distintas osmolaridades de los electrólitos presentes en las lágrimas ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc....) y no con manitol, que es un edulcorante obtenido de la hidrogenación de la manosa y no tiene nada que ver con los componentes normales de los fluidos corneales.



**Figura 3.17.** Tamaño del halo de crecimiento de los trofozoitos en el ensayo de osmotolerancia. **a.** *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** *A. castellanii* ATCC 30234. **c.** *A. castellanii* CCAP 1501/1A. **d.** *A. culbertsoni* ATCC 30171. **e.** *A. polyphaga* 2961. **f.** BYB2017. **g.** ISCIU-UAH 64/13. **h.** ISCIU-UAH 85/13. **i.** ISCIU-UAH 161/15. **j.** EV-UAH-P6. **k.** EV-UAH-V7. **l.** P-UAH-O3.

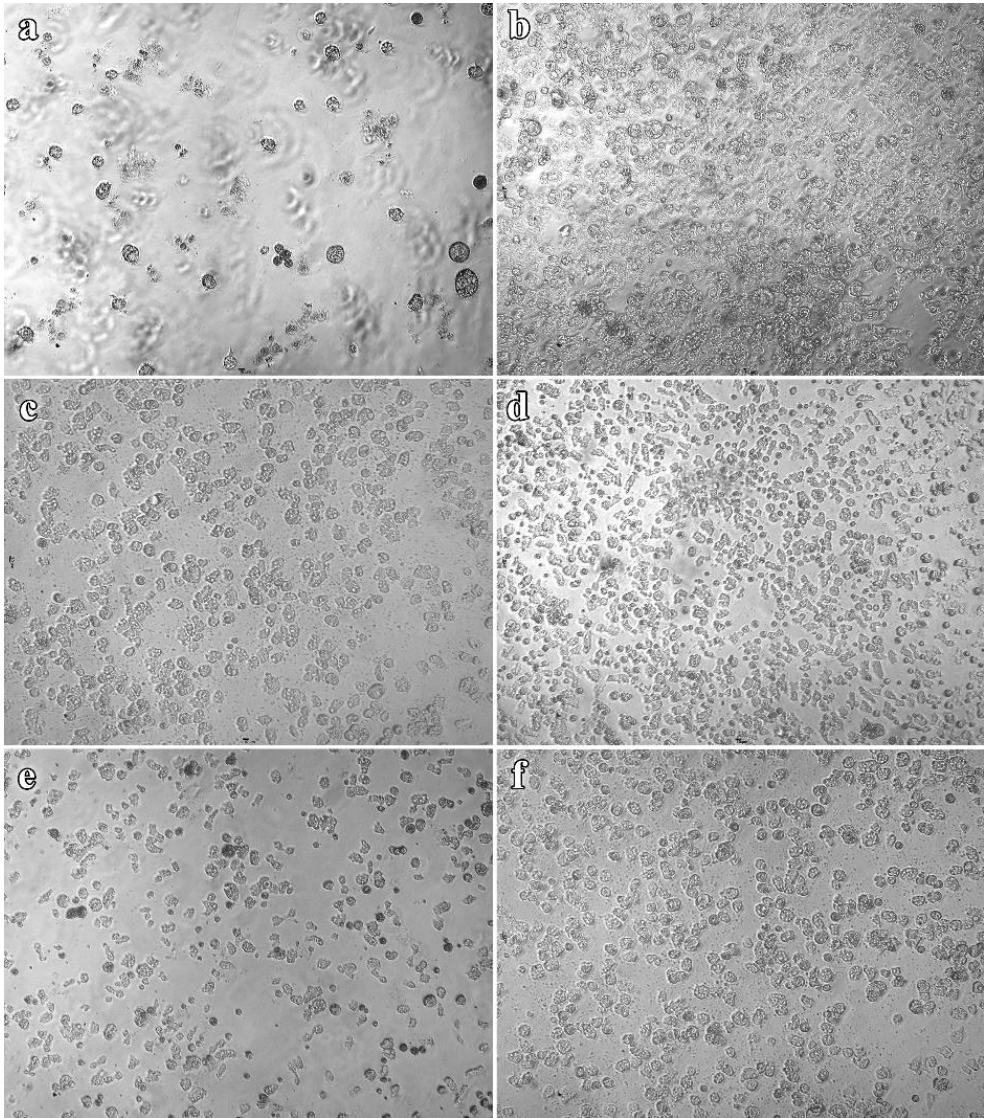
La capacidad de tolerar distintos pH también se considera un factor de patogenicidad indirecto, aunque se desconoce cómo puede ser ventajosa esta característica a la hora de invadir el epitelio corneal (Khan, 2003). A diferencia de los factores anteriores, no hay establecidos valores ni límites para considerar que una cepa es positiva en este ensayo. Para establecer un valor razonable de pH como indicador de patogenicidad, se consultaron en la literatura datos relativos al pH de la córnea y se compararon con los del medio ambiente acuático. El pH de la córnea es de 7,5 (Bonanno y Polse, 1987), aunque también hay que indicar que el pH en este tejido varía con el uso de lentes de contacto, situándose entre 6,9 y 7,6 (Chen y Maurice, 1990). El pH del agua depende de los factores ambientales que la rodean, sobre todo la alcalinidad. La alcalinidad del agua varía dependiendo de la presencia de sales y carbonatos disueltos, además de la composición mineral del suelo. El pH que permite la vida en el agua dulce es de 6 a 9. Por tanto, se consideró que una cepa es tolerante al pH cuando puede establecer un mínimo del 50 % de la monocapa (+++) en 3 días a un pH entre 5 y 9. En la práctica el ensayo se realizó creciendo las cepas en sus correspondientes medios, pero con el pH a ensayar. El pH de 7 indica que la ameba puede sobrevivir en el epitelio corneal, y los pH de 5 y 9 que es capaz de colonizar numerosos ambientes, aumentando la probabilidad de entrar en contacto con el ser humano y causarle una infección.

Se analizó de manera cualitativa este factor en todas las cepas presentes en el laboratorio (**Tabla 3.5, Figura 3.18, Figura 3.19. Figura 3.20 y Figura 3.21**), excepto las cepas ISCIII-UAH 66/14, PV-UAH-V1 y PV-UAH-V2 dado que su tasa de crecimiento es muy lenta. Además, en los aislados *A. astronyxis* CCAP 1501/9, *A. castellanii* ATCC 30234, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. culbertsoni*, BYB2017, ISCIII-UAH 64/13 e ISCIII-UAH 85/13, se evaluó su porcentaje de viabilidad de manera cuantitativa (**Figura 3.22**).



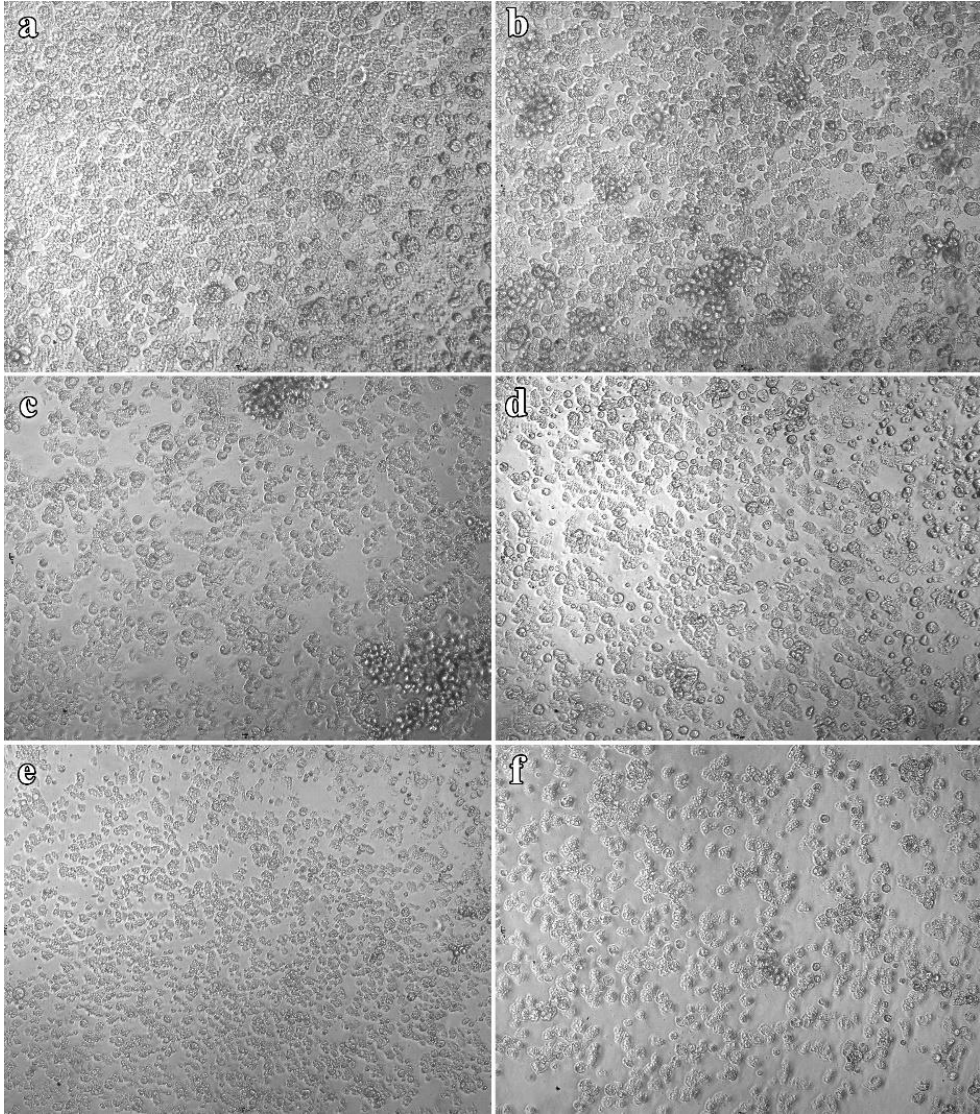
Las cepas que mostraron un crecimiento de más del 50 % de monocapa entre los pH 5 y 9 fueron: *A. astronyxis* CCAP 1501/9, *A. castellanii* ATCC 30234, *A. castellanii* CCAP 1501/1A, *A. culbertsoni* ATCC 30171, *A. polyphaga* 2961, ISCIII-UAH 85/13 y P-UAH-O3. De estas cepas, sólo dos se han aislado de pacientes con queratitis (*A. polyphaga* 2961 e ISCIII-UAH 85/13). En cuanto al resto, se han aislado del medio ambiente (suelo y agua dulce) y de cultivos celulares. Las otras cepas aisladas de muestras clínicas no crecieron bien a un pH de 5 (ISCIII-UAH 64/13) o a un pH de 9 (BYB2017 e ISCIII-UAH 161/15).

No se observa un patrón diferente de resistencia al pH entre las cepas aisladas del medio ambiente y las de muestras clínicas, a diferencia de lo observado por Heredero-Bermejo et al. (2015), quienes sí que observan diferencias entre una cepa ambiental y clínica. No obstante, sus criterios de resistencia son más laxos que los establecidos en este trabajo de tesis, ya que para Heredero-Bermejo et al., (2015), la cepa clínica crece a pH 3 y 9, pero no llega al 50 % de la monocapa, por lo que, según los criterios establecidos aquí, esa cepa clínica no sería tolerante a distintos pH. Además, sólo se estudió una cepa clínica y otra ambiental, mientras que en el presente trabajo doctoral se han estudiado 12 cepas, teniendo mayor probabilidad de no encontrar diferencias entre cepas ambientales y clínicas. Respecto al resto de literatura en la que se citan los análisis de supervivencia a distintos pHs, no se ha encontrado ningún trabajo que realice un ensayo similar al nuestro.

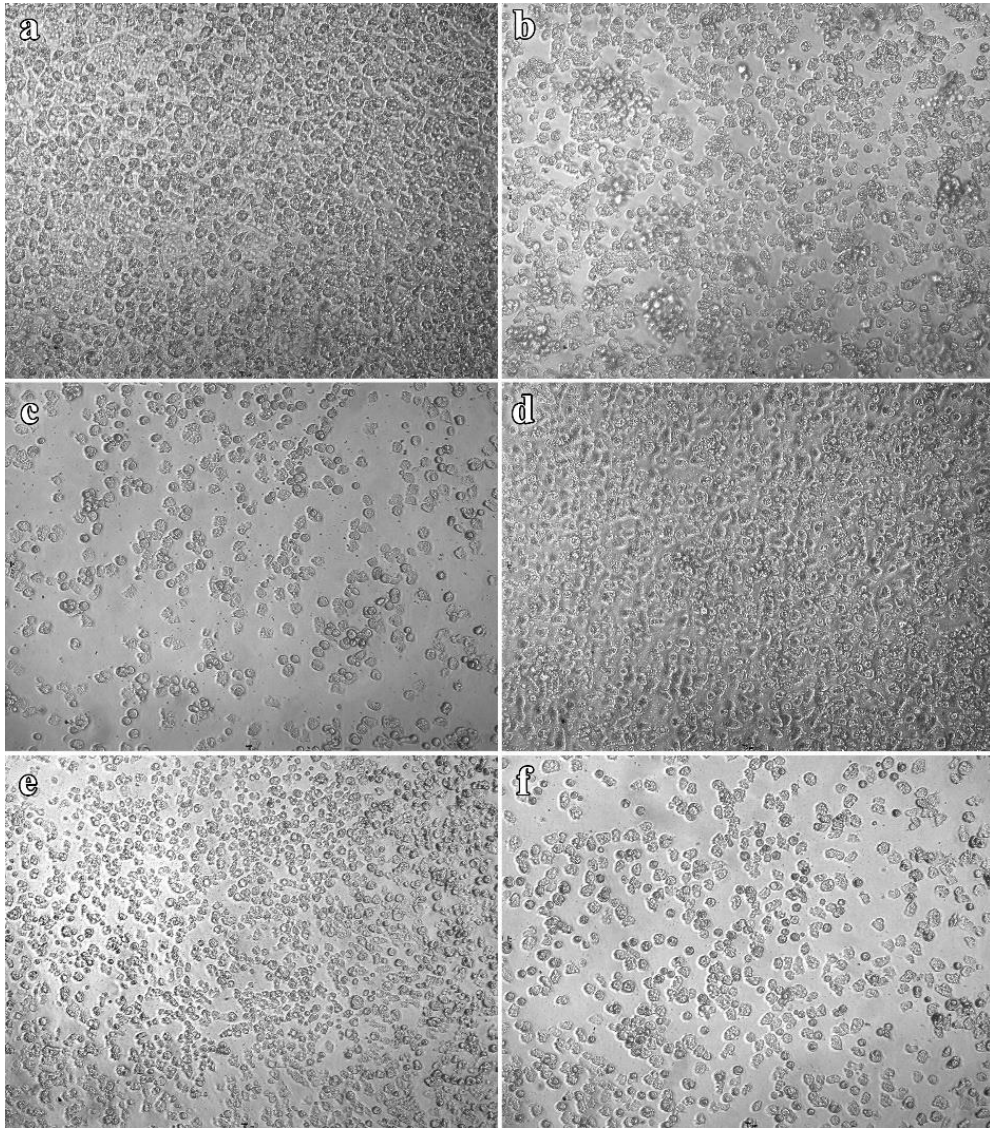


**Figura 3.18.** Crecimiento de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. a pH 3 a día 7. a. *A. astronyxis* CCAP 1501/9. b. *A. polyphaga* 2961. c. ISCIH-UAH 161/15. d. EV-UAH-P6. e. EV-UAH-V7. f. P-UAH-O3.

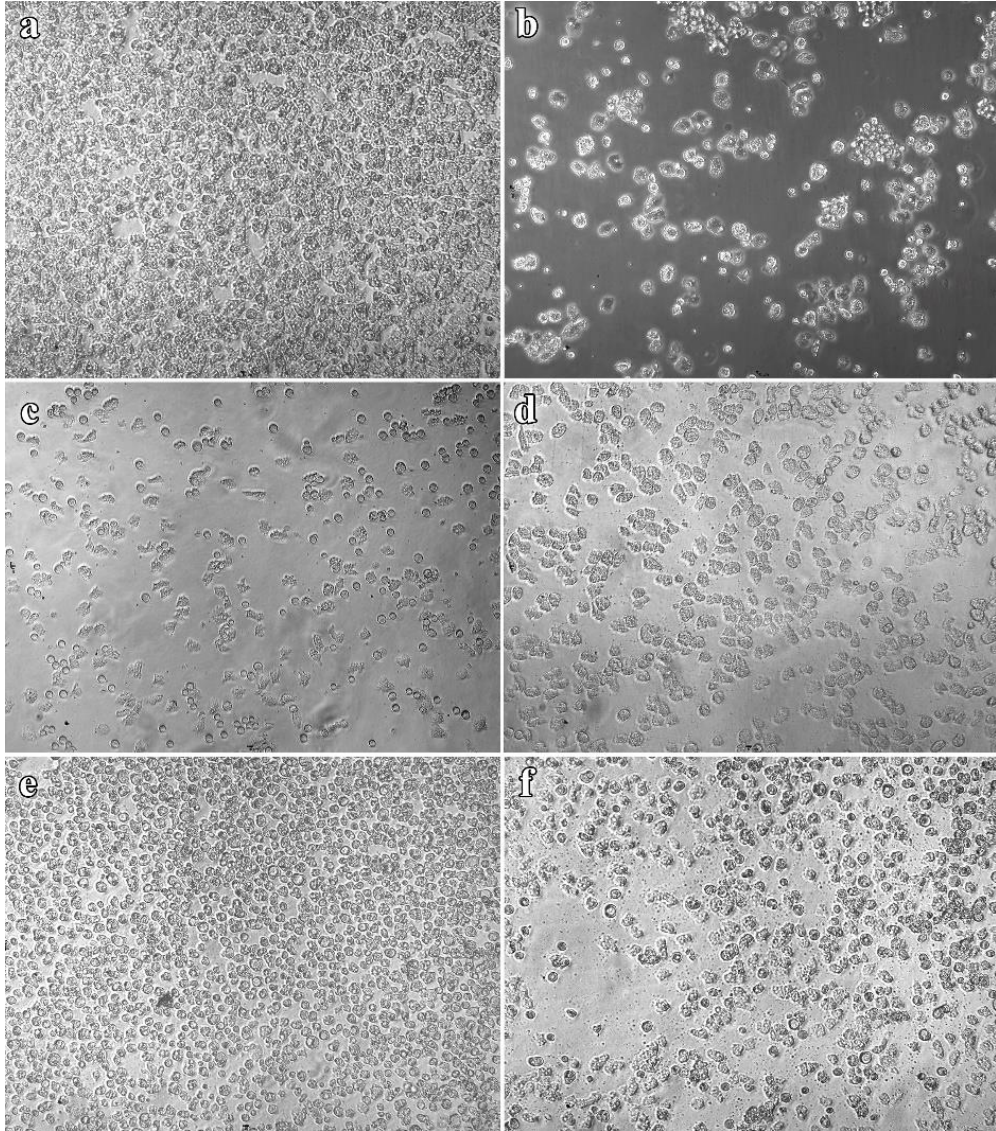




**Figura 3.19.** Crecimiento de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. a pH 3 a día 7. **a.** *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** *A. polyphaga* 2961. **c.** ISCIII-UAH 161/15. **d.** EV-UAH-P6. **e.** EV-UAH-V7. **f.** P-UAH-O3.

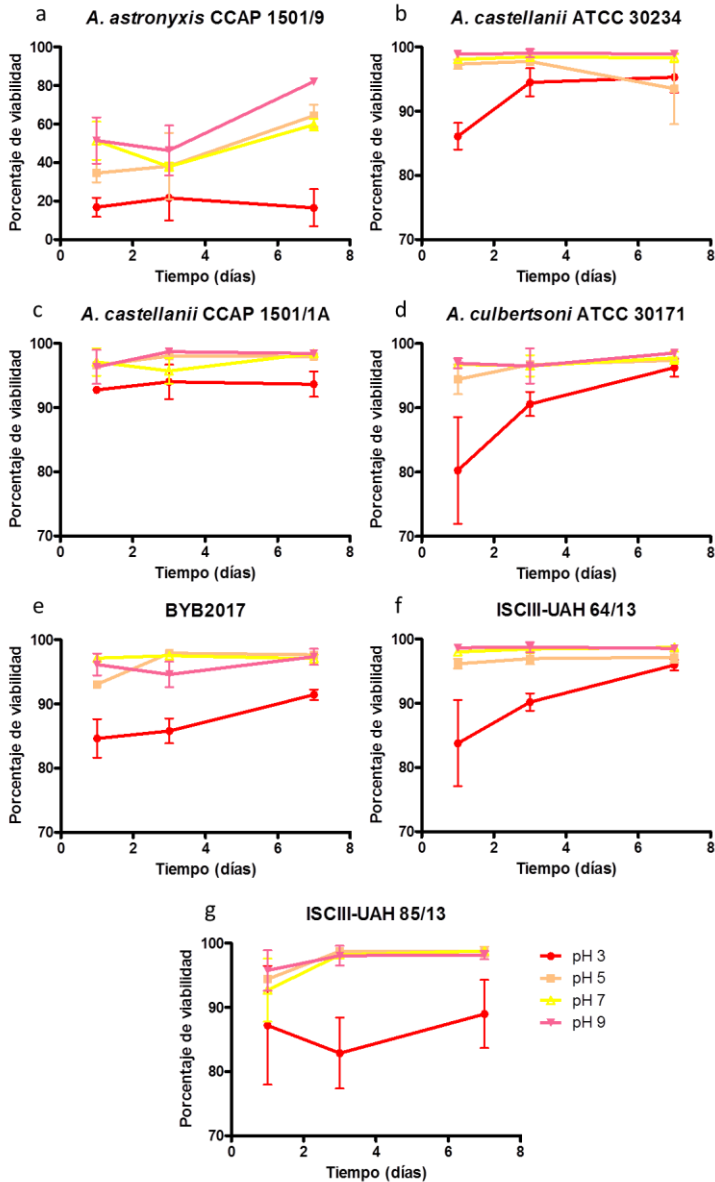


**Figura 3.20.** Crecimiento de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. a pH 3 a día 7. **a.** *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** *A. polyphaga* 2961. **c.** ISCH-IAH 161/15. **d.** EV-IAH-P6. **e.** EV-IAH-V7. **f.** P-IAH-O3.



**Figura 3.21.** Crecimiento de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. a pH 3 a día 7. a. *A. astronyxis* CCAP 1501/9. b. *A. polyphaga* 2961. c. ISCIU-UAH 161/15. d. EV-UAH-P6. e. EV-UAH-V7. f. P-UAH-O3.

Los estudios de viabilidad de los trofozoítos a diferentes pHs (**Figura 3.22**) revelaron que el porcentaje de viabilidad de prácticamente la totalidad de las cepas es del 90 - 100 % a todos los pHs ensayados, aunque por microscopía óptica se haya observado un menor número de trofozoítos. Sin embargo, a pH 3 tiende a observarse una viabilidad más baja que al resto de los pH, con algunas excepciones en ciertos aislados, en los que este parámetro se iguala con el de otros pHs en el día 7 (**Figura 3.22 b**, **Figura 3.22 d** y **Figura 3.22 f**). Al no haber más trabajos que hayan realizado este tipo de estudio para poder comparar, no se puede discutir con lo realizado por otros autores. En general, todas las cepas analizadas son capaces de crecer a pH que oscilan entre 5 y 9 siendo este un amplio rango, ya que tanto en el medio ambiente como en los tejidos biológicos los márgenes de pH oscilan entre 6 y 9. Por tanto, aunque no se haya alcanzado en algunos casos el 50 % de la monocapa, los trofozoítos sí que son viables, lo que les permitiría sobrevivir en esos ambientes o tejidos.

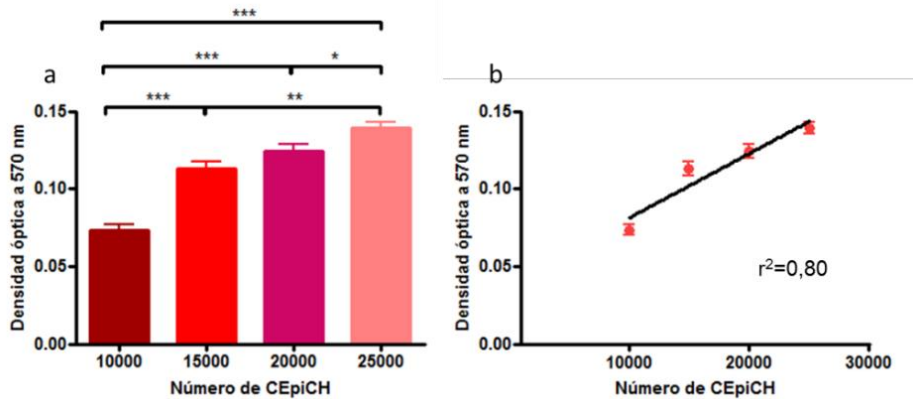


**Figura 3.22.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos a distintos pHs. **a.** *A. astronyxis* CCAP 1501/9. **b.** *A. castellanii* ATCC 30234. **c.** *A. castellanii* CCAP 1501/1A. **d.** *A. culbertsoni* ATCC 30171. **e.** BYB2017. **f.** ISCIU-IAH 64/13. **g.** ISCIU-IAH 85/13.

La citopatogenia que causan las cepas de *Acanthamoeba* en cultivos celulares es un factor que se ha estudiado en muchos más casos que los factores anteriores (Cursons y Brown, 1978; Khan et al., 2000; Walochnik et al., 2000; Khan y Tareen, 2003; Gianinazzi et al., 2009; Durham, 2012; Carlesso et al., 2014; González-Robles et al., 2014; Heredero-Bermejo et al., 2014). Sin embargo, no hay pautas establecidas de cómo realizar estos ensayos, ni los criterios para determinar cuándo una cepa de *Acanthamoeba* causa efectos citopatogénicos.

Este es el primer estudio en el que se emplean cultivos celulares de células epiteliales de córnea humana. La mayoría de los trabajos de otros autores emplean células que no están relacionadas con el ojo, como las células Vero, células HeLa, MDCK o HEP-2 (Walochnik et al., 2000; Carlesso et al., 2014; González-Robles et al., 2014). Una minoría de estudios han empleado células de retina de ratón (Heredero-Bermejo et al., 2014) o células epiteliales de córnea de conejo (Khan et al., 2000; Khan y Tareen, 2003).

Otro factor que no está estandarizado es el número de células que se siembran en cada pocillo; incluso algunos autores ni siquiera indican este dato. En este trabajo de tesis doctoral, se estudiaron distintas concentraciones de células CEpiCH y se evaluó por MTT cuales se debían usar. En la **Figura 3.2a**, se observa que la señal emitida por todas las concentraciones ensayadas se detecta por MTT, siendo superior a mayor número de células CEpiCH, como también se observa en la regresión lineal (**Figura 3.2b**). Las diferencias observadas son estadísticamente significativas en todos los casos ( $p < 0,05$ ), salvo entre 15.000 y 20.000 células, donde la diferencia no es estadísticamente significativa. El número de células que se eligió para hacer los ensayos de citopatogenia fue de 20.000 células por pocillo, ya que no hay diferencia estadística con 15.000 y la diferencia con 25.000 es menor ( $p < 0,05$ ) que en la que hay entre 15.000 y 25.000 ( $p < 0,005$ ). En el caso de las células HeLa se emplearon 10.000 células por pocillo, según fue determinado por la unidad de Cultivos Celulares de la uah (datos no mostrados).



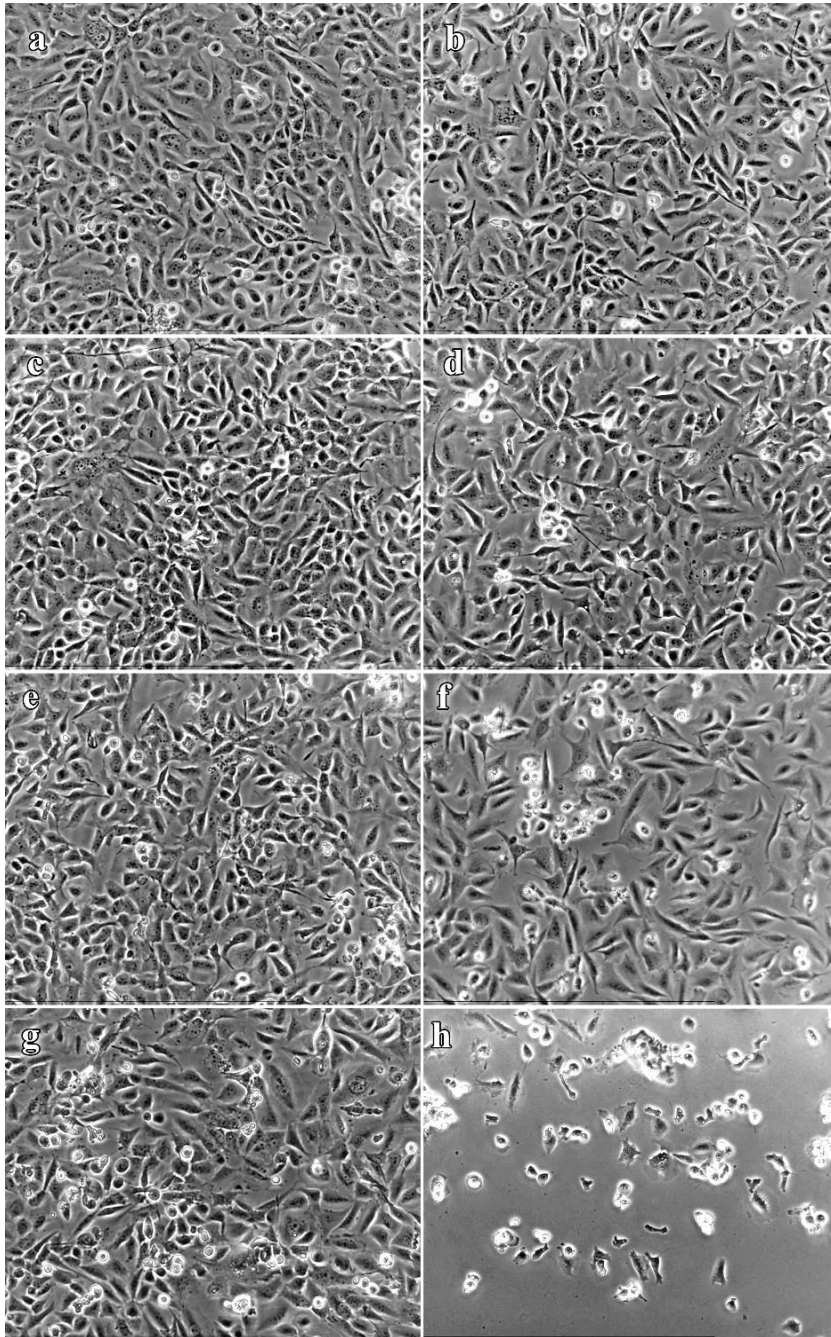
**Figura 3.23. a.** Densidad óptica obtenida del ensayo MTT con células CEpiCH a distintas concentraciones. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ; \*\*\*:  $p < 0,0005$ . **b.** Análisis de regresión lineal de la absorbancia frente al número de células CEpiCH.

El número de trofozoítos que se añaden a la monocapa de células tampoco coincide en los distintos estudios de citopagenicidad realizados por otros autores. En ocasiones se emplea una única concentración de trofozoítos, a pesar de que se sabe que este factor es directamente proporcional al daño producido en la monocapa (Gianinazzi et al., 2009). En el presente trabajo se analizó el efecto citopático con distintas concentraciones de trofozoítos, usándose proporciones de 1:200, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1 y 2:1, con respecto a las células CEpiCH y HeLa (**Tabla 3.6**). El efecto citopático de estas concentraciones de trofozoítos se determinó a las 4, 6 y 24 horas por microscopía óptica y a las 24 horas por el ensayo MTT. Las fotografías tomadas muestran que las cepas ISCIII-UAH 64/13, EV-UAH-V7 y P-UAH-O3 provocan lisis de la monocapa a las 24 horas, sea cual sea la proporción en que se encuentran respecto a las células de mamífero. Sin embargo, a las 3 horas no se observaron calvas de lisis, mientras que a las 6 horas sí que se observaron interrupciones en la monocapa cuando se enfrentan las células CEpiHC al mismo número de trofozoítos o al doble. Para el resto de las proporciones no se observó lisis de la monocapa celular.

**Tabla 3.6.** Proporción de trofozoítos de *Acanthamoeba* y células CEpiCH y HeLa por pocillo.

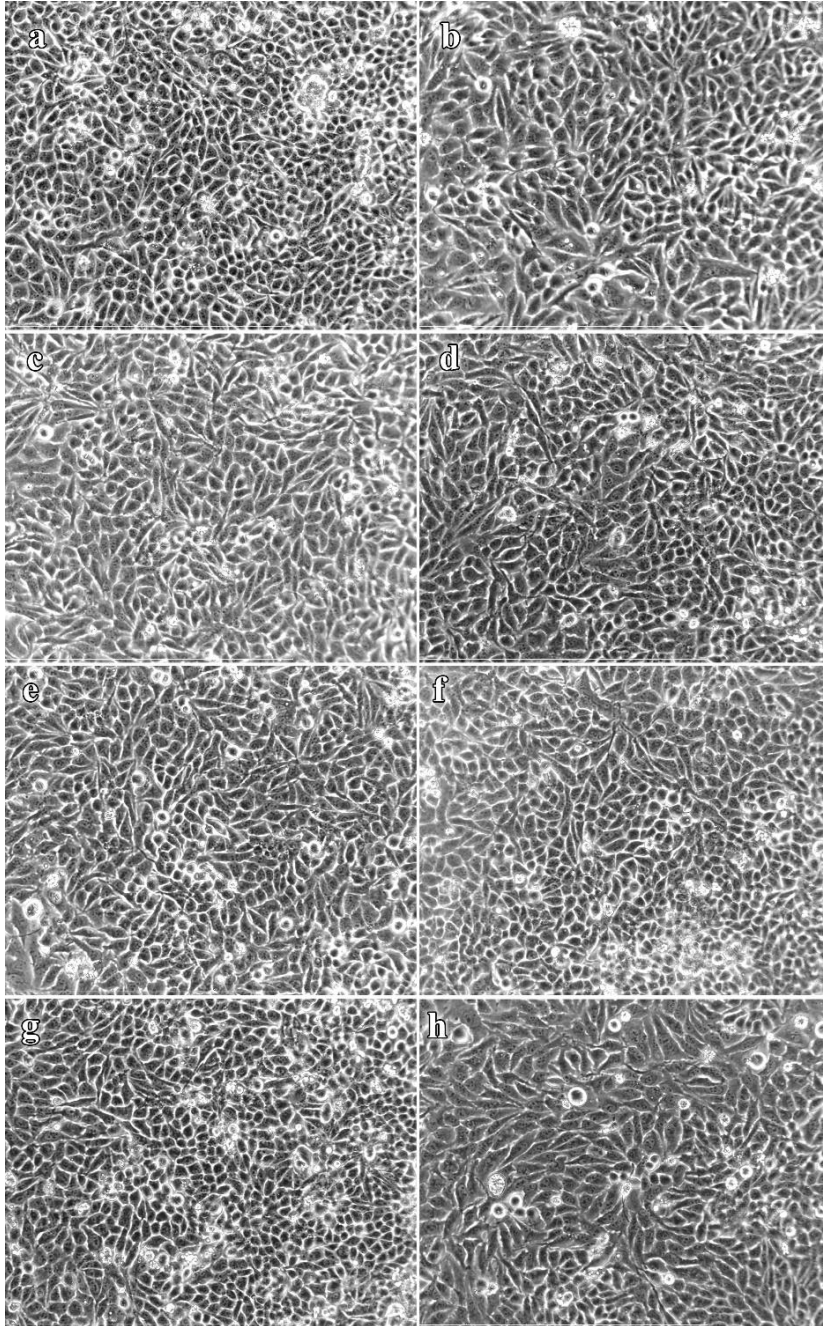
Relación trofozoítos/células	n° trofozoítos y CEpiCH/pocillo	n° trofozoítos y HeLa/pocillo
1:200	100 y 20.000	50 y 10.000
1:20	1.000 y 20.000	500 y 10.000
1:10	2.000 y 20.000	1.000 y 10.000
1:5	4.000 y 20.000	2.000 y 10.000
1:2	10.000 y 20.000	5.000 y 10.000
1:1	20.000 y 20.000	10.000 y 10.000
2:1	40.000 y 20.000	20.000 y 10.000

El aislado ISCIII-UAH 64/13 fue el que mostró mayor capacidad de lisis de la monocapa de células CEpiCH (**Figura 3.2**) a tiempo 24 h. Sin embargo, en las observaciones anteriores no había calvas de lisis. Se observó una relación directa entre el número de trofozoítos y los daños causados al cultivo celular, siendo mayor la disgregación de la monocapa cuando es expuesta a 20.000 y 40.000 trofozoítos (**Figura 3.24 g** y **Figura 3.24 h**). Se produjeron daños en la monocapa de células de mamífero a partir de 40.000 trofozoítos por pocillo (**Figura 3.24 e**). Sin embargo, no se observó destrucción de las células HeLa ni transcurridos 24 horas ni a ninguna concentración de trofozoítos (**Figura 3.25**).



**Figura 3.24.** Fotografías del ensayo de citopatogenicidad de la cepa *Acanthamoeba* ISCIII-UAH 64/13 en células CEpiCH a las 24 h. **a.** Células CEpiCH sin trofozoítos. **b.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:200. **c.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:20. **d.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:10. **e.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:5. **f.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:2. **g.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:1. **h.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 2:1.

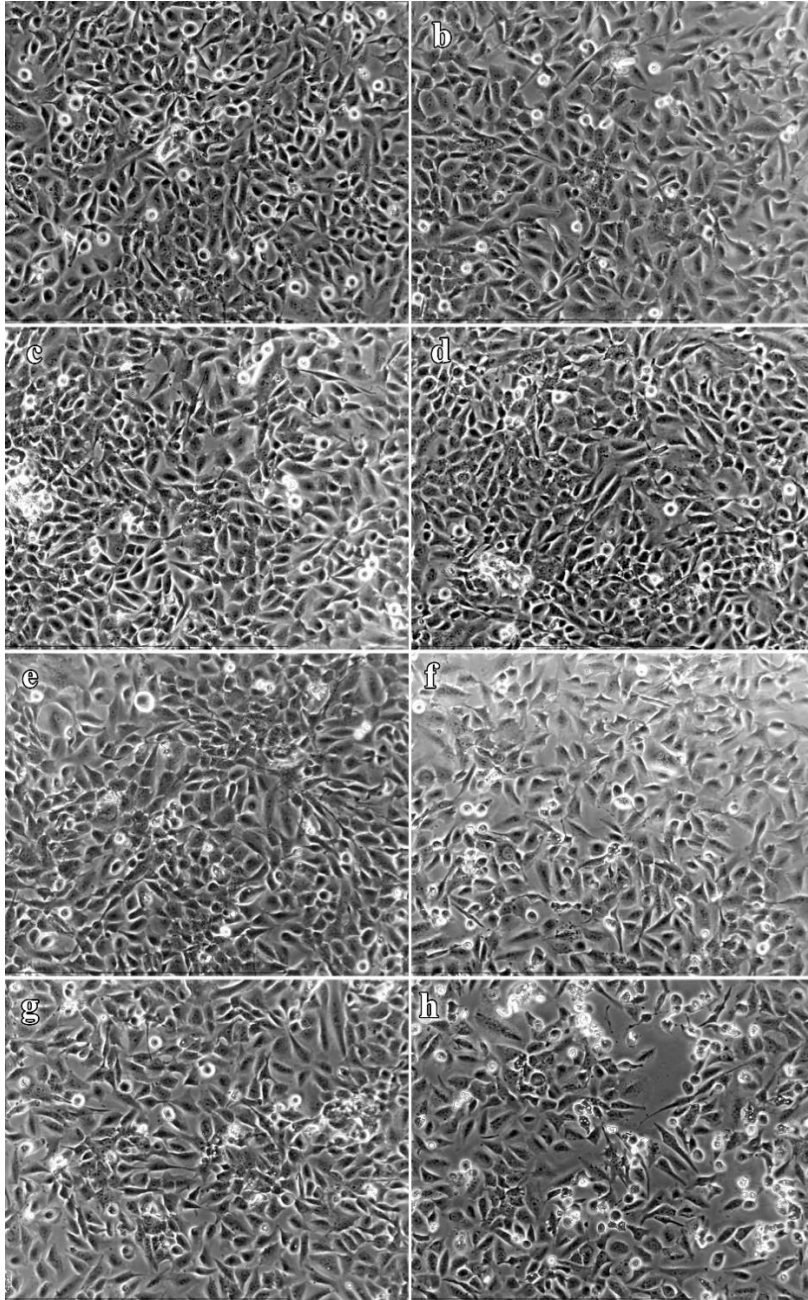




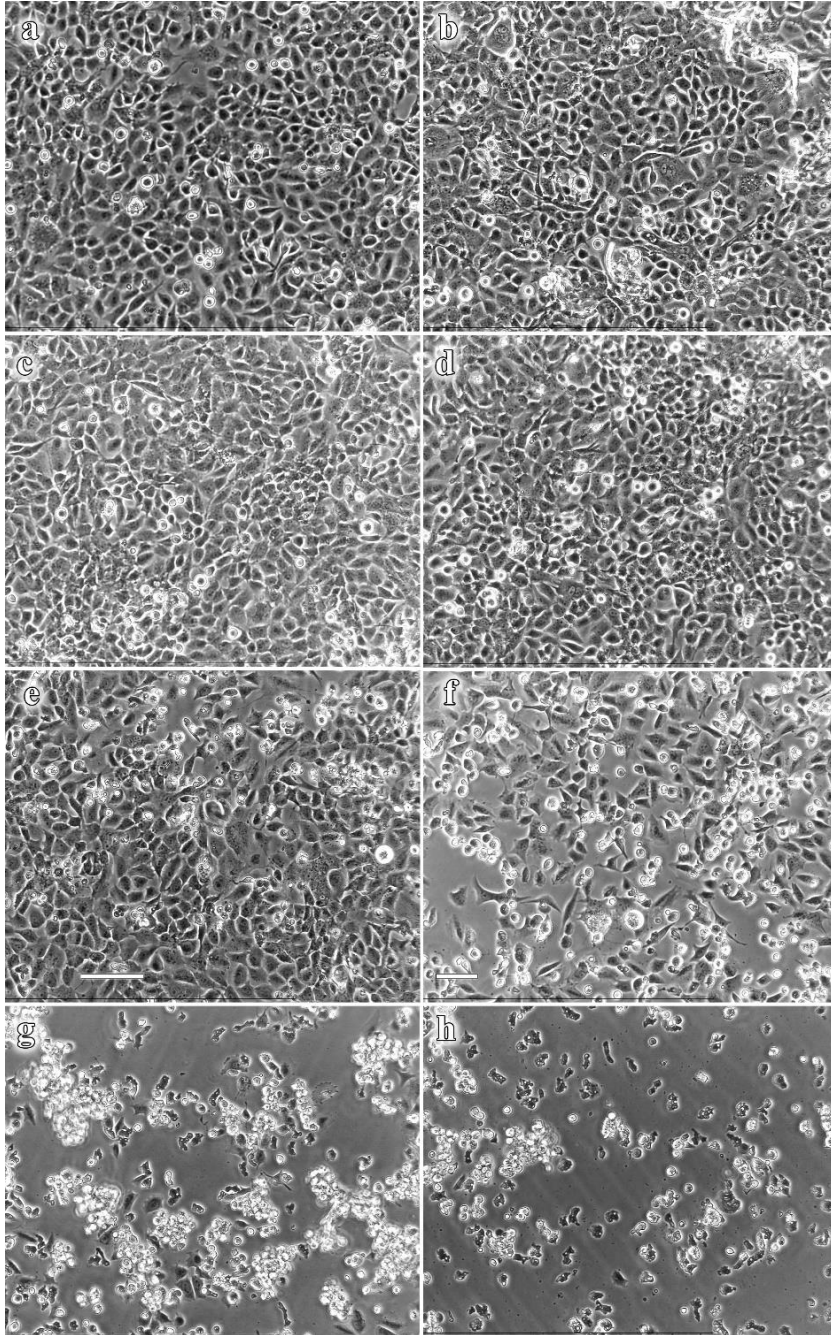
**Figura 3.25.** Fotografías del ensayo de citopatogenicidad de la cepa *Acanthamoeba* ISCIII-UAH 64/13 en células HeLa a las 24 h. **a.** Células HeLa sin trofozoítos. **b.** Células HeLa y trofozoítos en un ratio 1:200. **c.** Células HeLa y trofozoítos en un ratio 1:20. **d.** Células HeLa y trofozoítos en un ratio 1:10. **e.** Células HeLa y trofozoítos en un ratio 1:5. **f.** Células HeLa y trofozoítos en un ratio 1:2. **g.** Células HeLa y trofozoítos en un ratio 1:1. **h.** Células HeLa y trofozoítos en un ratio 2:1.

La cepa EV-UAH-V7 no fue capaz de lisar la monocapa de células CEpiCH por completo a las 24 horas con la mayor concentración de trofozoítos, sólo se observaron pequeñas calvas de lisis (**Figura 3.26 h**). Al resto de horas y concentraciones de trofozoítos (**Figura 3.26**) no se observaron daños en las células. En las células HeLa tampoco se observaron daños (datos no mostrados).

El aislado P-UAH-O3 mostró una capacidad citopática más alta que el aislado clínico ISCIII-UAH 64/13, ya que fue capaz de lisar la capa de células CEpiCH a las 24 h cuando se enfrentan a la misma cantidad de trofozoítos (**Figura 3.27 g**). Se observaron calvas de lisis a las 24 horas a partir de concentraciones de 1:2 trofozoítos/células (**Figura 3.27 f**). Al resto de tiempos en los que se observó la placa multipocillo, no se detectó lisis de la monocapa. En las células HeLa tampoco se produjeron daños en las células ni lisis de la monocapa a ningún tiempo ni concentración de los estudiados (datos no mostrados).

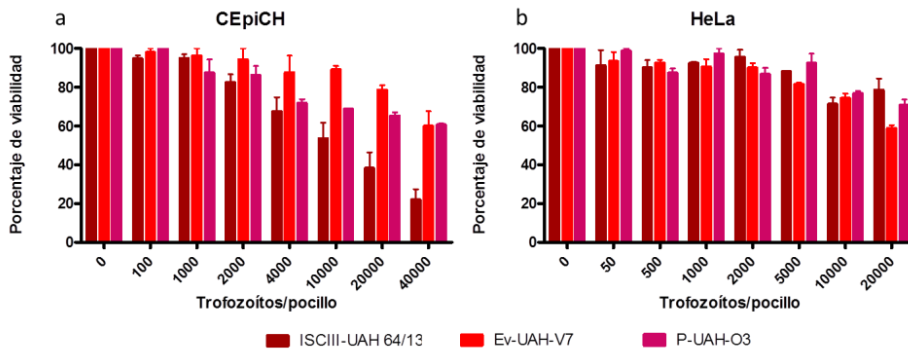


**Figura 3.26.** Fotografías del ensayo de citopatogenicidad de la cepa *Acanthamoeba* EV-UAH-V7 en células CEpiCH a las 24 h. **a.** Células CEpiCH sin trofozoítos. **b.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:200. **c.** Células CEpiCH y trofozoítos en una ratio 1:20. **d.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:10. **e.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:5. **f.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:2. **g.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:1. **h.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 2:1.



**Figura 3.27.** Fotografías del ensayo de citopatogenicidad de la cepa *Acanthamoeba* P-UAH-03 en células CEpiCH a las 24 h. **a.** Células CEpiCH sin trofozoítos. **b.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:200. **c.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:20. **d.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:10. **e.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:5. **f.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:2. **g.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 1:1. **h.** Células CEpiCH y trofozoítos en un ratio 2:1.

Los datos del ensayo de MTT mostraron que en células CEpiCH la cepa de *Acanthamoeba* con mayor capacidad de lisis o daño celular es ISCIII-UAH 64/13 (Figura 3.28 a), a diferencia de las observaciones al microscopio (Figura 3.26 y Figura 3.27). Además, aunque no se observó lisis completa de la monocapa de células, CEpiCH expuesta a EV-UAH-V7, esta mostró valores similares a los obtenidos con P-UAH-O3. Esto parece indicar que, aunque la ameba no ha destruido las células, sí que ha causado daños no visibles al microscopio (Figura 3.28 a). En las células HeLa no se observaron calvas de lisis en ninguno de los casos. En consonancia, el ensayo de MTT mostró que el porcentaje de viabilidad de las células HeLa es más alto que el de las células CEpiCH, y disminuyó al 80 % cuando se enfrentaron a una concentración 5.000 trofozoítos (Figura 3.28 b).



**Figura 3.28.** Ensayo MTT a las 24 horas de cultivo. **a.** Células CEpiCH incubadas con distinto número de trofozoítos de *Acanthamoeba*. **b.** Células HeLa incubadas con distinto número de trofozoítos amebianos.

Es difícil comparar estos resultados con los de otros autores, ya que, a veces no realizan ensayos cuantitativos (MTT o lactato deshidrogenasa) y cuando los realizan, no se emplean los mismos tipos celulares, ni las mismas concentraciones de células de mamífero, ni tampoco de trofozoítos amebianos (Khan et al., 2000; González-Robles et al., 2017). Además, en los casos en los que sólo se emplea el microscopio para determinar la capacidad de lisis de una cepa, no se muestran imágenes, indicándose solo mediante signos “+”, con lo que el resultado es en cierto modo, subjetivo.

El estudio de Heredero-Bermejo et al., (2015) sirvió de guía para realizar los ensayos en este trabajo de tesis. Sin embargo, en el presente estudio, en vez de emplear las células MUPH-1 se utilizó la línea celular CEpiCH. El problema con las células MUPH-1 es que no son humanas ni corneales, es difícil determinar si las cepas analizadas aquí son igual, menos o más patógenas que las del estudio de Heredero-Bermejo et al., (2015). En ambos casos, se realizaron ensayos de citopatogenicidad en células HeLa: en nuestro caso no se observaron calvas de lisis en la monocapa ni el porcentaje de viabilidad de las células HeLa disminuyó considerablemente con ninguna de las tres cepas ensayadas; en el caso de Heredero-Bermejo et al., (2015) no se muestran los datos obtenidos con este tipo celular sólo con las células MUPH-1.

Por tanto, y al no haber criterios establecidos ni poder comparar con otros estudios, se concluye que la cepa ISCIII-UAH 64/13 es la única que tiene poder citopático en células CEpiCH ya que al microscopio se observa destrucción completa de la monocapa y por MTT una reducción

del porcentaje de viabilidad de dichas células. El hecho de que no sea capaz de causar daños en células HeLa puede ser debido a que son células inmortalizadas procedentes de cáncer cérvico-uterino, que son más resistentes al ataque amebiano (Zantl et al., 2007). En cuanto al aislado P-UAH-O3 es capaz de lisar las células CEpiCH, pero los resultados obtenidos del ensayo MTT indicaron que el 70 % de las células CEpiCH son viables. Este mismo valor de viabilidad de las células CEpiCH, se obtuvo cuando se cocultivan con la cepa ISCIU-UAH 64/13, que, al observarlas al microscopio, no se apreció destrucción de la capa celular. Por lo que, se concluyó que no tienen actividad citopatogénica. Son necesarios estudios adicionales para determinar si es posible que haya cepas de *Acanthamoeba* que sean capaces de reducir el MTT en sales de formazán, lo que justificaría los anómalos valores obtenidos con la cepa ISCIU-UAH 64/13.

En resumen, teniendo en cuenta todos los factores de citopatogenia, y la problemática en los criterios establecidos, en los casos en los que los había, ninguna de las cepas empleadas en este estudio fue positiva para todos los factores ni se pudo observar una clara diferencia entre las cepas aisladas de muestras clínicas y muestras ambientales (**Tabla 3.7**). Este hecho puede justificarse porque cuando se ha tratado de comparar factores de citopatogenicidad en estudios anteriores, normalmente solo se han estudiado dos cepas (Kahn y Tareen, 2003), comparado con las doce analizadas en el presente trabajo de tesis doctoral.

**Tabla 3.7.** Resumen de los resultados obtenidos de los factores de patogenicidad en cada cepa de *Acanthamoeba* estudiada. ND: no hay datos.

Cepas	Termotolerante	Osmotolerante	Tolerante a pHs	Citopatogenica
<i>A. astronyxis</i> CCAP 1501/9	Sí	No	Sí	ND
<i>A. castellanii</i> ATCC 30234	No	No	Sí	ND
<i>A. castellanii</i> CCAP 1501/1A	No	No	Sí	ND
<i>A. culbertsoni</i> ATCC 30171	No	No	Sí	ND
<i>A. polyphaga</i> 2961	Sí	No	Sí	ND
BYB2017	No	No	No	ND
ISCIU-UAH 64/13	Sí	No	No	Sí
ISCIU-UAH 85/13	Sí	No	Sí	ND
ISCIU-UAH 161/15	Sí	No	No	ND
EV-UAH-P6	Sí	No	No	ND
EV-UAH-V7	Sí	No	No	No
P-UAH-O3	Sí	No	Sí	No

## 5. CONCLUSIONES

1. La clasificación de morfogrupos sigue siendo útil para clasificar las amebas en el género *Acanthamoeba* y subdividirla en 3 grandes grupos.
2. Hay correlación entre el número de acantopódos presentes en la superficie de los trofozoítos y la patogenicidad de las cepas, siendo mayor en las aisladas de muestras clínicas que en las de muestras ambientales.
3. Los genotipos hallados en el presente estudio coinciden con los que más frecuentemente se han descrito por otros autores, tanto en el medio ambiente como en casos clínicos.
4. Aunque se han realizado ensayos para determinar la patogenicidad de diversos aislados de *Acanthamoeba*, la interpretación de los resultados obtenidos es compleja, debido a que este tipo de pruebas no están debidamente estandarizadas. Como consecuencia, la comparación de resultados obtenidos en este tipo de pruebas entre diferentes laboratorios es poco fiable.
5. Igualmente, no se observa en este estudio un patrón claro de factores de patogenicidad que diferencie las cepas aisladas de muestras clínicas (que en teoría son patógenas) y las de muestras ambientales (que no son patógenas).



## Capítulo 4: Tratamiento *in vitro* frente a cepas de *Acanthamoeba* spp.





## CHAPTER ABSTRACT

**Introduction:** Some *Acanthamoeba* spp. isolates are pathogens, occasionally causing *Acanthamoeba* keratitis (AK) and granulomatous amoebic encephalitis (GAE); AK is the most frequent of both diseases (Martínez and Visvesvara, 1997). AK treatment consists in a combination of cationic antiseptics like chlorhexidine (CLX) with aromatic diamidines such as propamidine isethionate during prolonged periods (Walochnik et al., 2009; Clarke et al., 2012; Lorenzo-Morales et al., 2015). The treatment of these infections is still problematic due to the presence of amoeba resistant forms (cysts) (Marciano-Cabral and Cabral, 2003) complicated as well by the finding of amoebic resistance to propamidine (Ficker et al., 1988). This underlines the need to develop new and effective drugs for treating AK. In fact, in the last years a plethora of chemicals (and natural products) have been tested in an intensive search of new amoebicides, both for topical and/or internal use (**Table 4.1**).

**Objectives:** The aim of this chapter is the study of the effectiveness as amoebicide of diverse synthetic or natural products.

**Materials and Methods:** The effects of dimethylsulfoxide (DMSO) and tea tree oil (TTO) (either alone or in combination) on two amoebic isolates (*A. griffini* MYP2003 and *A. polyphaga* 2961) were tested by OCR plates and manual counting.

The effectiveness of 10 dendritic compounds (**Table 4.2**) was carried out against *A. griffini* MYP2003 and *A. polyphaga* 2961 by manual counting and scanning electron microscopy (SEM).

The study on cytotoxic effect of all of products tested was carried out in human epithelial corneal cells and HeLa cells by MTT assay.

**Results:** The OCR plates revealed that DMSO and TTO are effective against both isolates (**Figura 4.2**), but when the putative amoebicidal effect was observed under light microscope, the higher DMSO concentrations tested did not kill trophozoites, they merely promoted encystment (**Figura 4.3**). The effectiveness of the combination of both compounds is higher than that of those compounds used alone (**Figura 4.4** and **Figura 4.5**). A curious situation was found in these experiments is that amoebic population in control wells seem to be negatively affected by some unknown volatile products evaporated from TTO-treated wells (**Figura 4.6** and **Figura 4.7**). Therefore, the TTO or TTO-DMSO are amoebicidal, but most of the amoebicidal activity seems to be caused mainly by TTO; in fact, DMSO seems to be non-cytotoxic (**Figura 4.8** and **Figura 4.9**).

Among the dendritic compounds, the best results were obtained with BDTL072 and BDTL073 containing biguanidine moieties (**Figura 4.15** and **Tabla 4.5**). These results were similar to those obtained using chlorhexidine digluconate-CLX- in toxicity assays (**Figura 4.16** and **Tabla 4.6**). The rest of the compounds tested did not show any inhibitory effect on trophozoite counts, or they only did it at the highest concentration (**Figura 4.10**, **Figura 4.11**, **Figura 4.12**, **Figura 4.13** and **Tabla 4.4**). The biguanide-dendrimers (BDTL072 and BDTL073) showed less toxicity than the CLX on amoebic cells; furthermore, BDTL073 is not toxic at any of the concentrations assayed (**Tabla 4.6**). The remaining dendrimers caused more extensive damage to the human cells than to trophozoites, so they are cytotoxic for host cells and are not suitable as amoebicides (**Tabla 4.4** and **Figure 4.14**).

**Conclusions:**

1. The addition of dimethylsulfoxide to the culture medium triggers amoebae encystment without killing them. However, this organic solvent employed along with TTO eliminates both trophozoites and cysts.
2. The OCR plates are to some extent, useful in amebicide drug screening; however, evaluation of lethal effects may be misleading when tested products promote encystment. Therefore, parallel microscopic observations must accompany any study based on respiration analysis.
3. Some biguanide dendrimers described in this study are very promising amoebicides, since they showed low  $IC_{50}$  in *Acanthamoeba* trophozoites and low cytotoxicity in human cells.

## 1. INTRODUCCIÓN

No existen pautas para el tratamiento de las enfermedades causadas por las especies del género *Acanthamoeba*. Los compuestos terapéuticos que actualmente se emplean en el tratamiento de la encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) son una combinación de ketoconazol, fluconazol, sulfadizina, anfotericina B o rifampicina (Martinez et al., 2000; Lackner et al., 2010; Zamora et al., 2014). Estos compuestos se emplean porque son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, que es el mayor problema en el tratamiento de EGA. Pueden por tanto ser eficaces, pero tienen graves efectos secundarios (Khan, 2015). En el caso de la amebiasis cutánea se han empleado una gran diversidad de fármacos, algunos de ellos como la 5-fluorocitosina, son buenos amebicidas cuando se usan en esta localización particular (Helton et al., 1993), mientras que muchos otros no funcionan para este tratamiento en particular (anfotericina B o ketoconazol), de acuerdo con datos de Marciano-Cabral y Cabral, (2003).

En este capítulo nos centraremos en la búsqueda de compuestos eficaces para el tratamiento de la queratitis amebiana (QA) debido a que es la enfermedad causada por *Acanthamoeba* spp. de mayor incidencia (Hadaś et al., 2017). Por otro lado, el modelo de quimioterapia *in vitro* nos permite simular las condiciones aproximadas que se va a encontrar la ameba en el ojo.

El mayor problema en el tratamiento de la QA es abordar la eliminación de la forma de resistencia de la ameba (Siddiqui et al., 2016a). En este sentido hay que diseñar compuestos capaces de eliminar los quistes o bien, impedir que el trofozoíto se transforme en quiste. Actualmente los pacientes con QA son tratados con una combinación de biguanidas (polihexametil biguanida o clorhexidina) y diamidinas (propamidina o hexamidina) que causan daños en la membrana celular destruyendo los trofozoítos o impidiendo que se transformen en quistes (Clarke et al., 2012; Lorenzo-Morales et al., 2015). Sin embargo, si la concentración administrada no es la adecuada para destruirlos, estos se transforman en quistes (Khunkitti et al., 1998). Además, el tratamiento con estos compuestos es prolongado y tedioso para el paciente, y debido al aumento de la concentración, más el prolongado tiempo y frecuencia de aplicación, causan efectos tóxicos en el epitelio corneal, siendo necesario, en algunos casos, interrumpir la terapia (John et al., 1990; Seal et al., 1996; Seal, 2003). Tras la suspensión de la quimioterapia, los trofozoítos podrían desenquistarse e invadir de nuevo la córnea. Otro problema añadido es que, en ocasiones, los fármacos no son capaces de penetrar hasta el estroma corneal.

Una manera de enfocar el tratamiento de la QA, es la prevención en el grupo de riesgo (usuarios de lentes de contacto). El uso de lentillas es seguro, siempre y cuando se adopten las medidas higiénicas recomendadas; sólo aquellos portadores que no sigan las pautas tienen mayor probabilidad de infectarse, no sólo con *Acanthamoeba* sino con otros patógenos tales como virus, bacterias y hongos (Lindsay et al., 2007). Algunos de los principales factores de riesgo son el uso de lentillas de baja calidad (como las compradas en internet), el uso del portallentillas durante largos períodos, fallo en la limpieza del portallentillas, uso de soluciones de lentillas durante mucho tiempo o caducadas, uso de productos no recomendados para la limpieza de las lentillas o el uso de agua del grifo, entre otros (Stapleton et al., 2008; Carnt y Stapleton, 2016; Zimmermann et al., 2016). También se consideran acciones problemáticas nadar, dormir o bañarse con lentes de contacto (Cheng et al., 2013). Con evitar estas situaciones y la utilización de soluciones de lavado eficaces contra *Acanthamoeba*, se reduciría bastante el número de

casos. Muchas de las soluciones de lavado de lentillas contienen polihexametil biguanida (PHMB), pero la concentración que contiene es ineficaz en la descontaminación/desinfección de *Acanthamoeba* (Moon et al., 2016). En otros estudios realizados en multisoluciones de limpieza de lentillas también se han encontrado resultados amebicidas decepcionantes (Tzanetou et al., 2006; Ibrahim et al., 2009; Costa de Aguiar et al., 2013; Üstüntürk y Zeybek, 2014; Siddiqui et al., 2015). Afortunadamente, en otros estudios, las soluciones de limpieza sí que han sido eficaces contra *Acanthamoeba* spp. (Shoff et al., 2008; Kilvington y Lonnen, 2009).

Debido a que aún no existe una pauta de tratamiento para la QA, en los últimos años se están desarrollando nuevos compuestos que puedan ser eficaces, ya sean de origen sintético (Heredero-Bermejo et al., 2018), o de origen natural, tanto vegetal (Polat et al., 2008) como animal (Merchant et al., 2004). Algunos de estos compuestos se exponen en la **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1.** Revisión de compuestos estudiados en diferentes especies de *Acanthamoeba* spp. en los últimos 10 años.

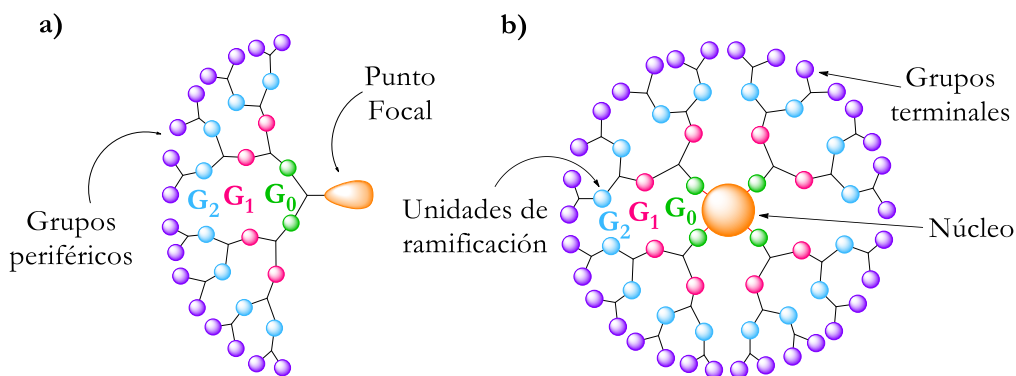
REFERENCIA	AMEBICIDA	INHIBICIÓN CAUSADA
Polat et al., (2008)	Extracto de metanol de <i>Allium sativum</i>	100 % de T y Q a 62,5 mg/ml
Rodio et al., (2008)	Extracto de metanol de <i>Pterocaulon polystachyum</i>	66 - 70 % de T
Alizadeh et al., (2009)	Alexidina	100 % de T y Q a 100 µg/ml
Derda et al., (2009)	Extractos de metanol de <i>Rubus chamaemorus</i> , <i>Pueraria lobata</i> , <i>Solidago virgaurea</i> y <i>S. graminifolia</i>	Extractos de <i>S. virgaurea</i> , <i>P. lobata</i> y <i>R. chamaemorus</i> tienen efecto a 0,350 µg/ml
Goze et al., (2009)	Extracto de metanol <i>Salvia staminea</i> y <i>S. caespitosa</i>	100 % de T a >16 mg/ml
Benitez et al., (2011)	Sustancia parecida a la bacteriocina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100 % a 6400 AU/ml
Polat et al., (2011)	13 antibióticos catiónicos esteroideos	100 % de T 100 mg/ml
Boonman et al., (2012)	Ácido fusarico y ác. dehidrofusárico	IC <sub>50</sub> del ác. fusarico es 0,33-0,66 µM
Degerli et al., (2012a)	Extracto de metanol de <i>Origanum syriacum</i> y <i>O. Laevigatum</i>	100 % de T y Q con extractos <i>O. syriacum</i> a 32 mg/ml
Degerli et al., (2012b)	Extracto de metanol de <i>Pastinaca armena</i> y <i>Inula oculus-christi</i>	100 % de T con los extractos <i>I. oculus</i> a 32 mg/ml
El-Sayed et al., (2012)	Extractos alcohólicos de <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Curcuma longa</i> y <i>Panacratium maritimum</i>	Extracto de <i>A. hypogaea</i> impide la desenquistación a 100 mg/ml
Malatyali et al., (2012)	Extractos de metanol de <i>Peucedanum</i> sp (4 especies diferentes)	100 % de T y Q con los extractos <i>P. longibracteolatum</i> a 32 mg/ml
Mito et al., (2012)	Azul de metileno combinado con terapia fotodinámica	Respiración de los T se inhibe en un 90 %
Nakisah et al., (2012)	Extractos de metanol de <i>Aaptos</i> sp (esponja)	IC <sub>50</sub> = 0,615 - 0,876 mg/ml
Raza et al., (2012)	7 derivados de polioxotungstatos	100 % de T a 0,1 mM
Tepe et al., (2012)	Extractos de metanol de <i>Teucrium polium</i> y <i>T. Chamaedrys</i>	<i>S. staminea</i> muestra un efecto destacable en la viabilidad de los T.
Vunda et al., (2012)	Aceites esenciales de <i>Croton pallidulus</i> , <i>C. isabell</i> y <i>C. ericoides</i>	87 % de T con aceite de <i>C. ericoides</i> a 0,5 mg/ml
Borase et al., (2013)	3 tipos de nanopartículas de plata	74 % de T con AgNPs de <i>Jatropha gossypifolia</i> a 25 µg/ml
Derda et al., (2013)	Extractos en etanol de hojas y raíces de <i>Eryngium planum</i>	85 % de T
Heredero-Bermejo et al., (2013)	Dendrimeros cationicos carbosilanos más CLX	100 % T con algunos dendrimeros combinados con CLX
Vijay et al., (2013)	Protamina	Muestra buena eficacia contra T y Q cuando se combina con PHMB
Debnath et al., (2014)	Corifungina	80 % de T a 200 µM
Jha et al., (2014)	Cloroquina	Se disminuye al 70 % el enquistamiento a concentraciones > 70 µM
Deng et al., (2015)	Artemetero	100 % de T a 200 µg/ml

REFERENCIA	AMEBICIDA	INHIBICIÓN CAUSADA
Kuzma et al., (2015)	Ferruginol, salva nemorosa, <i>salvia aethiopsis</i> y 1-oxo-aethiopinona	39 - 72 % de T
Moon et al., (2016)	2,6-diclorobenzonitrilo e isoxabeno combinado con PHMB	Impide el enquistamiento
Timko et al., (2015)	12 derivados de metilfusina	Mínima concentración amebicida = 62.5 $\mu$ M para el compuesto C2 - C15
Herederro-Bermejo et al., (2016)	Combinación de CLX y dendrímeros catiónicos carbosilanos	100 % de T
Imran et al., (2016)	Nanopartículas de Zn y Zn unido a TiO <sub>2</sub>	40 - 60 % de T
Santos et al., (2016)	Aceites esenciales de <i>Lippia</i> spp. y rotundifolona, carvona y carvacrol.	IC <sub>50</sub> = 10 - 72 $\mu$ g/ml
Siddiqui et al., (2016a)	3 % DMSO	Impide el desenquistamiento
Siddiqui et al., (2016b)	Diclofenaco sódico, indometacina y acetaminofeno	Impide el enquistamiento
Hadaś et al., (2017)	Aceite del árbol de té	100 % de T a 0,5 $\mu$ l/ml
Ortillés et al., (2017)	Tobramicina, ciprofloxacina, verapamil, voriconazol, CLX y celulosa de <i>Aspergillus</i> spp.	La combinación de los distintos compuestos es más eficaz que la monoterapia
Panatieri et al., (2017)	Extracto alcohólico de <i>Pterocaulon balansae</i> en una nanosuspensión	90 % de T a 1,25 mg/ml
Atalay et al., (2018)	Rosa de bengala junto a fototerapia y riboflavina junto a fototerapia	63 - 66 % de T con la rosa de bengala
Dodangeh et al., (2018)	Extracto acuoso de las semillas de <i>Trigonella foenum graecum</i>	100 % de T a 450 mg/ml y 100 % de Q a 750 mg/ml
Gomart et al., (2018)	Dioxido de titanio (TiO <sub>2</sub> ), luz UVA y CLX, por separado y en combinación	100 % de T en CLX, combinación CLX con TiO <sub>2</sub> , CLX con UVA y CLX con TiO <sub>2</sub> y UVA
Herederro-Bermejo et al., (2018)	Dendrímeros carbosilanos de amonio y biguanida	Muestran buena eficacia y baja toxicidad
Rosales et al., (2018)	Compuestos de esquaramidas y poliamidas acíclicas	Sólo una esquaramida tiene más eficacia que CLX
Sanguan et al., (2018)	Aceites esenciales de <i>Piper retrofractum</i> , <i>P. nigrum</i> , <i>P. samentosum</i> , <i>Citrus hystrix</i> , <i>C. reticulata</i> , <i>Murraya paniculata</i> , <i>Amomum uliginosum</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>C. zedoria</i> y <i>Kaempferia pandurata</i> .	100 % de T en <i>P. retrofractum</i> , <i>P. nigrum</i> , <i>C. hystrix</i> , <i>C. longa</i> , <i>K. pandurata</i> .
Yim et al., (2018)	Nitrato de sodio, nitroprusiato de sodio y nanopartículas de gel de sílice con NO	100 % de T con nitroprusiato de sodio a 100 $\mu$ M
Cucina et al., (2019)	6 formulaciones distintas de 0,02 % CLX y 0,1 % EDTA disódico en un gel ocular termosensible	La formulación F6 60 % de T y 90 % de Q
Kaya et al., (2019)	Extracto de metanol de las semillas de <i>Trigonella foenum-graecum</i>	90 % de T a 32 mg/ml

Los avances más recientes en este campo parecen indicar que los dendrímeros y nanopartículas (Heredero-Bermejo et al., 2016; Yim et al., 2018) así como los extractos de plantas con propiedades medicinales o antimicrobianas (Hadaś et al., 2017; Kaya et al., 2019) pueden ser útiles como profilaxis o quimioterapia contra la queratitis. La fitoterapia es una de las ramas más antiguas de la medicina convencional, y hoy en día es la terapia que con más frecuencia se emplea en enfermedades crónicas. Además, en los últimos años se han empleado fármacos de origen vegetal para combatir enfermedades parasitarias tales como malaria, leishmaniosis, tripanosomiosis, amebiosis, giardiosis... (Derda y Hadaś, 2014).

En el ámbito de la parasitología, los dendrímeros han sido empleados en el tratamiento de la malaria y la enfermedad de Chagas (Giarolla et al., 2010; Santos-Magalhães y Furtado Mosqueira, 2010). También se ha estudiado su eficacia contra *Acanthamoeba* (Heredero-Bermejo et al., 2026, 2018). Las nanopartículas se han empleado como transportadores de fármacos en el tratamiento de la malaria, leishmaniosis y enfermedad de Chagas con éxito (Date et al., 2007; Aditya et al., 2013). También, se ha estudiado la eficacia de las nanopartículas como antiamebianos en *Acanthamoeba* (Yim et al., 2018).

Los dendrímeros son un tipo de nanomoléculas radialmente simétricas y con una estructura ramificada. La ramificación depende de la generación a la que pertenecen. La estructura consta de un átomo central o grupo de átomos que se denominan núcleo central del que parten ramas de átomos denominadas dendrones que se sintetizan a partir de una gran variedad de reacciones químicas. Finalmente, en la periferia se sitúan los grupos funcionales (**Figura 4.1**) (Abbasi et al., 2014).



**Figura 4.1.** Representación estructural de **a.** dendrón o cuña dendrítica, **b.** dendrímero (Imagen cedida por el departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la uah).

Estos compuestos presentan una gran diversidad de aplicaciones en el área de la medicina, tales como, fármacos, transportadores de fármacos, transportadores de genes, agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética, terapia fotodinámica y desarrollo de vacunas (Cloninger, 2002; Abbasi et al., 2014).

Por otra parte, las nanopartículas (NPs) normalmente tienen también un núcleo y son multifuncionales. Pueden tener un recubrimiento biológico o molecular que permite la



interacción entre las nanopartículas y las moléculas orgánicas. Al igual que los dendrímeros se emplean como marcadores biológicos fluorescentes, transportador de fármacos y genes. Además, se utilizan para detectar patógenos y proteínas, en ingeniería de tejidos, separación y purificación de moléculas biológicas y células (Salata, 2004). En particular, las nanopartículas de oro y plata son fáciles de preparar, tienen baja toxicidad y se pueden unir fácilmente a moléculas de interés biológico. Además de los usos mencionados anteriormente, las propiedades de la plata han hecho que las NPs de plata se puedan emplear como antimicrobianos (Wong y Liu, 2010; Giasuddin et al., 2012).

En estudios previos del grupo de investigación ECOMYP, del cual también forman parte investigadores del Área de Microbiología y de los Departamentos de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, se han estudiado la eficacia de compuestos dendríticos carbosilanos (dendrímeros, dendrones y nanopartículas) frente a bacterias y frente a *Acanthamoeba* spp.. El modo de acción de estos compuestos catiónicos con grupos funcionales de amonio se debe a las cargas positivas propias del dendrímero que interactúan con las cargas negativas de las membranas plasmáticas celulares, desplazando los cationes polivalentes presentes en la misma. Por ello, la membrana se desestructura, provocando la muerte del microorganismo (Fuentes-Paniagua et al., 2016; Peña-González et al., 2017; Heredero-Bermejo et al., 2018).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es el **estudio de la eficacia de diferentes compuestos** tanto de origen químico como vegetal.

1. Estudio de la capacidad amebicida del aceite del árbol de té y dimetilsulfóxido (DMSO), por separado y en combinación. Así como su citotoxicidad.
2. Evaluación de la eficacia y citotoxicidad de compuestos dendríticos tales como dendrones, dendrímeros y nanopartículas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Clorhexidina digluconato

En el tratamiento de la QA se han empleado una gran variedad de fármacos, incluyendo la clorhexidina, polihexametileno biguanida (PHMB), propamidina isetionato, dibromopropamidina isetionato, neomicina, paromomicina, polimixina B, clotrimazol, ketoconazol, miconazol e itraconazol (Schuster y Visvesvara, 2004). Actualmente los fármacos que se usan en el tratamiento de esta enfermedad son la clorhexidina digluconato (CLX), PHMB y brolene (propamidina isetionato y dibromopropamidina isetionato) dado que mejoran notablemente el pronóstico de los pacientes (Visvesvara et al., 2007). Entre los tres compuestos anteriores, se analizó *in vitro* el efecto de CLX en dos cepas de *Acanthamoeba* para poder comparar la eficacia de los productos y compuestos dendríticos estudiados en este trabajo de tesis. También se estudió su efecto citotóxico en células epiteliales de córnea humana (CEpiCH) y HeLa.

##### Material y reactivos empleados

- Cultivo en medio axénico de la cepa *A. polyphaga* 2961 y *A. griffini* MYP2004.
- PBS 50x (Sigma, D1408). Se emplea a 1x.
- Rojo Congo (Sigma, C-6767). Se emplea a 0,2 %.
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Placas de 24 pocillos.
- Campana de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A).
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas estériles.
- Tubos Falcon de 15 ml estériles.
- Microscopio óptico (MOTIC, BA-300) con cámara digital acoplada de 10 Mpx.
- Células inmortalizadas epiteliales de córnea humana (CEpiCH) (Innoprot, P10871-IM).
- Células HeLa (ATCC CCL-2).
- Medio IM-Corneal Epithelial Cell (de sus siglas en inglés CEpiCM) (Innoprot, P60131).
- Suplemento de crecimiento para las células epiteliales de córnea (de sus siglas en inglés CEpiCGS) (Innoprot, P60131).
- Kit de colágeno I (Innoprot, P8188).
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's (de sus siglas en inglés DMEM) (Sigma, D6429).
- Suero fetal bovino (SFB) (Sigma, F7524). Se descomplementa antes de usar.
- Penicilina y estreptomina (Sigma, P4333).
- Reactivo MTT preparado a 5 mg/ml en PBS 1x (Sigma, M2003).
- Tripan blue (Sigma, T8154).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, 131954.1611).
- Cámara de recuento Neubauer.
- Flasks de cultivo T75 con filtro en el tapón.
- Incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub>.
- Incubadora a 32 °C.
- Espectrofotómetro.

## Metodología

### Ensayo de eficacia por recuento manual

1. Retirar el medio de cultivo de flasks de cultivo con trofozoítos en fase exponencial y añadir PBS 1x.
2. Despegar los trofozoítos del flask de cultivo por shock frío.
3. En la cabina de flujo laminar, transferir el cultivo con las amebas libres en PBS 1x desde los flasks a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de medio de cultivo correspondiente a 1x.
5. Retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % en una proporción 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
6. Ajustar el inóculo de trofozoítos a  $10^5$  por pocillo.
7. Añadir a cada pocillo 300  $\mu$ l de la suspensión ajustada de trofozoítos.
8. Preparar soluciones stock de CLX en PBS 1x a las siguientes concentraciones: 32, 16, 8, 4, 2 y 1 mg/l.
9. Añadir a cada pocillo 300  $\mu$ l de las correspondientes concentraciones de CLX, quedando las concentraciones de ensayo diluidas a la mitad: 16, 8, 4, 2, 1 y 0,5 mg/l.
10. Las placas se incuban a la temperatura de crecimiento correspondiente de cada aislado durante 4 y 24 h.
11. Transcurridos los tiempos de incubación, se retira una alícuota de cada pocillo y se mezcla con rojo congo al 0,2 % a una proporción de 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
12. Además, a las 24 horas se preparan las muestras para su observación al microscopio electrónico de barrido (metodología ya descrita en el capítulo 3).

### Ensayo de citotoxicidad

1. Se preparan placas de 24 pocillos con 20.000 células CEpiCH o 10.000 células HeLa, tal y como se explica en el capítulo 3.
2. Una vez que se ha establecido la monocapa, se retira el medio de los pocillos y se añaden 250  $\mu$ l del medio fresco correspondiente para cada tipo de célula.
3. Se preparan las soluciones stock de CLX en PBS 1x (tal y como se describe en el apartado anterior).
4. Añadir a cada pocillo 250  $\mu$ l de las correspondientes concentraciones de CLX, quedando las concentraciones de ensayo diluidas a la mitad.
5. A las 24 horas se realiza el ensayo de MTT (siguiendo las pautas descritas en el capítulo 3).

### Análisis estadístico de los datos

Todos los ensayos se realizaron siempre por triplicado y se repitieron al menos dos veces. Se calcularon y compararon las medias de los datos obtenidos. Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron usando el test t-Student o ANOVA. Los paquetes estadísticos utilizados fueron: GraphPad Prism o Statistica. Las diferencias se consideraron significativas cuando se obtenía un valor  $p < 0,05$ .

### 3.2. Dimetilsulfóxido y aceite del árbol de té

Como se ha indicado con anterioridad, en los últimos años ha crecido el interés en desarrollar productos químicos capaces de eliminar tanto trofozoítos como quistes para tratar la queratitis amebiana, o para usarlos en la desinfección de lentes de contacto. Recientemente, Hadaś et al., (2017) han indicado que el aceite del árbol de té (de sus siglas en inglés TTO) es capaz de eliminar los trofozoítos y quistes de *A. castellanii*. Por otro lado, Siddiqui et al., (2016b) observaron que el dimetilsulfóxido (DMSO) favorece el enquistamiento de los trofozoítos y su presencia evita el desenquistamiento en *A. castellanii*. Dado que estos compuestos no se han ensayado en otros genotipos de *Acanthamoeba*, se decidió estudiar la eficacia de estos dos compuestos en genotipos diferentes al T4, ya que se ha indicado que la resistencia a fármacos está influenciada por el genotipo de la cepa (Iovieno et al., 2010; Arnalich-Montiel et al., 2014). Así pues, se estudió como afectaban estos compuestos a otros genotipos, concretamente el genotipo T3, ya que es el segundo genotipo más frecuente en la queratitis amebiana y está disponible en el Área de Parasitología de la UAH (Heredero-Bermejo et al., 2015). La eficacia de estos productos se estudió por separado y en combinación, ya que en estudios previos realizados por este grupo de investigación se han observado efectos positivos en la combinación de diversos compuestos químicos, indicando la posibilidad de sinergias (Heredero-Bermejo et al., 2016). Se emplearon dos técnicas para el análisis del TTO y DMSO: primero las placas de OCR (su metodología se explica en el capítulo 2) para intentar determinar el rango de concentraciones a ensayar y luego, en segundo lugar, se aplicó el método de recuento óptico manual.

Además, en estos ensayos se estudió una variable más: la concentración del medio de cultivo, es decir, los ensayos se llevaron a cabo con diferentes concentraciones de medio de cultivo (1x y 0,5x) y se evaluó si la diferencia en la concentración de nutrientes afectaba a la sensibilidad de las cepas.

La citotoxicidad de ambos compuestos, en combinación y por separado, fue estudiada en células CEpiCH y HeLa.

#### Material y reactivos empleados

- Cultivo en medio axénico de la cepa *A. polyphaga* 2961 y *A. griffini* MYP2004.
- PBS 50x (Sigma, D1408). Se emplea a 1x.
- Rojo Congo al 0,2 % (Sigma, C-6767).
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Placas de 24 pocillos.
- Placas de 96 pocillos OCR tipo LT (Oxoprobics Bioscience).
- Aceite mineral (Sigma, M5904).
- Sulfato cúprico (Oxoprobics Bioscience).
- Sulfato sódico (Oxoprobics Bioscience).
- Lector de fluorescencia a TRF (VICTOR®).
- Campana de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A).
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas estériles.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Microscopio óptico (MOTIC, BA-300) con cámara digital acoplada de 10 Mpx.

- Células inmortalizadas epiteliales de córnea humana (CEpiCH) (Innoprot, P10871-IM).
- Células HeLa (ATCC CCL-2).
- Medio IM-Corneal Epithelial Cell (de sus siglas en inglés CEpiCM) (Innoprot, P60131).
- Suplemento de crecimiento para las células epiteliales de córnea (de sus siglas en inglés CEpiCGS) (Innoprot, P60131).
- Kit de colágeno I (Innoprot, P8188).
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's (de sus siglas en inglés DMEM) (Sigma, D6429).
- Suero fetal bovino (SFB) (Sigma, F7524). Se descomplementa antes de usar.
- Penicilina y estreptomycin (Sigma, P4333).
- Reactivo MTT preparado a 5 mg/ml en PBS 1x (Sigma, M2003).
- Tripán blue (Sigma, T8154).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, 131954.1611).
- Cámara de recuento Neubauer.
- Flasks de cultivo T75 con filtro en el tapón.
- Incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub>.
- Incubadora a 32 °C.
- Espectrofotómetro.

## Metodología

### Ensayo de eficacia por placas OCR

1. Retirar el medio de cultivo de flasks de cultivo con trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 en fase exponencial y añadir PBS 1x.
2. Se despegan los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento del flask de cultivo T25 por shock frío de.
3. En la cabina de flujo laminar, transferir desde los flasks el cultivo con las amebas a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de medio de cultivo correspondiente.
5. Retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % en una proporción 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
6. Ajustar el inóculo de trofozoítos a 10<sup>5</sup> por pocillo. Añadir 10 µl de la solución ajustada a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de OCR.
7. Se prepara TTO a 0,125 y 1 % (v/v) y DMSO a 1,125 y 5 % (v/v) en PBS 1x. Se añaden 90 µl de cada concentración a los pocillos correspondientes (mínimo 3 pocillos por concentración de cada compuesto).
8. Se incluye en la placa multipocillo sulfato cúprico a una concentración final de 0,1 mg/ml en el pocillo como control negativo y sulfito sódico a una concentración final de 0,01 mg/ml en el pocillo como control positivo.
9. Sellar cada pocillo con 100 µl de aceite mineral para evitar el intercambio de oxígeno.
10. Incubar la placa multipocillo en el lector de placas VICTOR® que está programado para obtener dos lecturas por pocillo cada hora durante 72 h. La fluorescencia (excitación a 340 nm / emisión a 642 nm) fue leída con un retraso de 30 y 70 microsegundos.

### **Ensayo de eficacia por recuento manual**

1. Retirar el medio de cultivo de flasks de cultivo con trofozoítos en fase exponencial y añadir PBS 1x.
2. Se despegan los trofozoítos del flask de cultivo T25 por shock frío de cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento.
3. En la cabina de flujo laminar, transferir el cultivo con las amebas libres en el medio desde los flasks a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de medio de cultivo correspondiente a 1x y 2x.
5. Retirar una alícuota y mezclar con rojo congo al 0,2 % a una proporción 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
6. Ajustar el inóculo de trofozoítos a  $10^5$  por pocillo.
7. Añadir a cada pocillo 300  $\mu$ l de la suspensión ajustada de trofozoítos (la concentración de los medios de cultivo se reducirá a la mitad, quedando en los pocillos a 0,5x y 1x).
8. Preparar soluciones stock de los compuestos en PBS 1x. El TTO se prepara a 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 y 40 % (v/v %). El DMSO a 0,30; 0,60; 1,25; 2,5; 5 y 10 % (v/v %). Y las combinaciones de TTO y DMSO a 0,06 % + 0,3 %; 0,12 % + 0,62 %; 0,25 % + 1,25 %; 0,5 % + 2,5 % y 1 % + 5% (v/v %), respectivamente.
9. Añadir a cada pocillo 300  $\mu$ l de las correspondientes concentraciones de los compuestos, quedando las concentraciones anteriores diluidas a la mitad en los pocillos.
10. Las placas se incuban a la temperatura de crecimiento correspondiente de cada aislado durante 4 y 24 h.
11. Transcurridos los tiempos de incubación, se retira una alícuota de cada pocillo y se mezcla con rojo congo al 0,2 % en una proporción 1:1 para su recuento en la cámara de Fuchs-Rosenthal.

### **Ensayo de citotoxicidad**

1. Se preparan placas de 24 pocillos con 20.000 células CEpiCH o 10.000 células HeLa, tal y como se explica en el capítulo 3.
2. Una vez que se ha establecido la monocapa, se retira el medio de los pocillos y se añaden 250  $\mu$ l del medio fresco correspondiente para cada tipo de célula.
3. Se preparan las soluciones stock de los compuestos en PBS 1x (tal y como se describe en el apartado anterior).
4. Añadir a cada pocillo 250  $\mu$ l de las correspondientes concentraciones de los compuestos, quedando las concentraciones de ensayo diluidas a la mitad.
5. A las 24 horas se realiza el ensayo de MTT (siguiendo las pautas descritas en el capítulo 3).

### **Análisis estadístico de los datos**

Todos los ensayos se realizaron siempre por triplicado y se repitieron al menos dos veces. Se calcularon y compararon las medias de los datos obtenidos. Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron usando el test t-Student o ANOVA. Los paquetes estadísticos utilizados fueron: GraphPad Prism o Statistica. Las diferencias se consideraron significativas cuando se obtenía un valor  $p < 0,05$ .


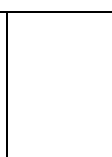
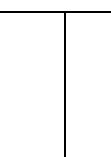

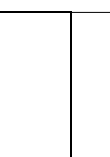
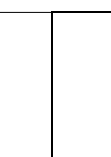
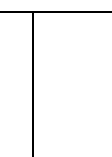
### **3.3. Nanopartículas, dendrones y dendrímeros**

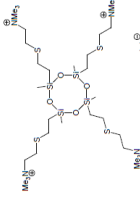
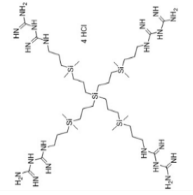
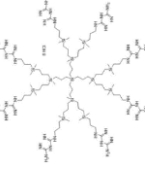
En base a los resultados previos obtenidos por el grupo de investigación, se decidió probar la eficacia de distintos compuestos sintetizados en el grupo de investigación BioNanoDen del departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la uah. Se analizaron un total de 10 nanocompuestos (**Tabla 4.2**). Además, se comparó la eficacia de estos nanocompuestos con la eficacia de la clorhexidina digluconato (CLX) dado que este es uno de los fármacos más usados en el tratamiento de la queratitis amebiana.

También se estudió la citotoxicidad de los compuestos en dos líneas celulares: CEpiCH y HeLa.



Tabla 4.2. Lista de los compuestos de nueva síntesis estudiados.

Nombre	Tipo	Generación	Grupo funcional	Estructura química
BDCP092	Dendrón catiónico	G1	2-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
BDCP093	Dendrón catiónico	G2	4-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
BDCP094	Dendrón catiónico	G3	8-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
BDCP078	Nanopartícula de oro funcionalizada con dendrones	G1	118-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
BDCP079	Nanopartícula de oro funcionalizada con dendrones	G2	528-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
BDCP086	Nanopartícula de plata funcionalizada con dendrones	G1	72-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
BDA024	Nanopartícula de plata funcionalizada con dendrones y PEG	G1	-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup> -PEG	

Nombre	Tipo	Generación	Grupo funcional	Estructura química
<b>BDIV001</b>	Dendrímero catiónico	G1	4-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
<b>BDTL072</b>	Dendrímero catiónico	G1	4-HN(C(NH)NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	
<b>BDTL073</b>	Dendrímero catiónico	G2	8-HN(C(NH)NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	

10

## Material y reactivos empleados

- Cultivo en medio axénico de la cepa *A. polyphaga* 2961 y *A. griffini* MYP2004.
- PBS 50x (Sigma). Se emplea a 1x.
- Rojo Congo (Sigma). Se emplea a 0,2 %.
- Cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
- Placas de 24 pocillos.
- Tampón fosfato de Milloning o Tampón Milloning (Milloning, 1961).
- Solución fijadora de glutaraldehído al 2 % (Merck, 104239).
- Solución de lavado.
- Soluciones de deshidratación.
- Poli-L-lisina 0,1 % (Sigma).
- Campana de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A).
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas estériles.
- Tubos de 15 ml estériles.
- Raspador de células.
- Microscopio óptico (MOTIC, BA-300) con cámara digital acoplada de 10 Mpx.
- Desecador Polaron E-3000 (Quorum Technologies).
- Metalizador Polaron E500/5100 (Quorum Technologies).
- Microscopio electrónico de barrido DSM 950 (Zeiss).
- Células inmortalizadas epiteliales de córnea humana (CEpiCH) (Innoprot, P10871-IM).
- Células HeLa (ATCC CCL-2).
- Medio IM-Corneal Epithelial Cell (de sus siglas en inglés CEpiCM) (Innoprot, P60131)
- Suplemento de crecimiento para las células epiteliales de córnea (de sus siglas en inglés CEpiCGS) (Innoprot, P60131).
- Kit de colágeno I (Innoprot, P8188).
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's (de sus siglas en inglés DMEM) (Sigma, D6429).
- Suero fetal bovino (SFB) (Sigma, F7524). Se descomplementa antes de usar.
- Penicilina y estreptomina (Sigma, P4333).
- Reactivo MTT (Sigma, M2003). Se emplea a 5 mg/ml en PBS 1x.
- Tripán blue (Sigma, T8154).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, 131954.1611).
- Cámara de recuento Neubauer.
- Flasks de cultivo T75 con filtro en el tapón.
- Incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub>.
- Incubadora a 32 °C.
- Espectrofotómetro.

## Metodología

### Ensayo de eficacia por recuento manual

1. Retirar el medio de cultivo de flasks de cultivo con trofozoítos en fase exponencial y añadir PBS 1x.
2. Se despegan los trofozoítos en fase exponencial de crecimiento del flask de cultivo T25 por shock frío.
3. En la cabina de flujo laminar, transferir el cultivo con las amebas libres en el medio desde los flasks a un tubo de 15 ml y centrifugar 10 min a 500 rpm.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 ml de medio de cultivo PYG o CERVA (excepto cuanto se analizó la eficacia de los dendrímeros BDTL072 y BDTL073 que se resuspendió en PBS 1x).
5. Retirar una alícuota con rojo congo al 0,2 % a una proporción 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
6. Ajustar el inóculo de trofozoítos a  $10^5$  por pocillo.
7. Añadir a cada pocillo 300  $\mu$ l de la suspensión ajustada de trofozoítos.
8. Preparar soluciones stock de los compuestos en PBS 1x (ya que todos los compuestos son solubles en agua) a las siguientes concentraciones para todos los ensayos llevados a cabo frente a amebas: 256, 128, 64, 32, 16, 8 y 4 mg/l.
9. Añadir a cada pocillo 300  $\mu$ l de las correspondientes concentraciones de los compuestos, quedando las concentraciones de ensayo diluidas a la mitad: 128, 64, 32, 16, 8, 4 y 2 mg/l.
10. Las placas se incuban a la temperatura de crecimiento correspondiente de cada aislado durante 4 y 24 h.
11. Transcurridos los tiempos de incubación, se retira una alícuota de cada pocillo y se mezcla con rojo congo al 0,2 % a una proporción 1:1 para su recuento en la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.
12. Además, a las 24 horas se preparan las muestras para su observación al microscopio electrónico de barrido (metodología en el capítulo 3).

### Ensayo de citotoxicidad

1. Se preparan placas de 24 pocillos con 20.000 células CEpiCH o 10.000 células HeLa, tal y como se explica en el capítulo 3.
2. Una vez que se ha establecido la monocapa, se retira el medio de los pocillos y se añaden 250  $\mu$ l del medio fresco correspondiente para cada tipo de célula.
3. Se preparan las soluciones stock de los compuestos en PBS 1x a las siguientes concentraciones: 256, 128, 64, 32, 16, 8 y 4 mg/l.
4. Añadir a cada pocillo 250  $\mu$ l de las correspondientes concentraciones de los compuestos, quedando las concentraciones de ensayo diluidas a la mitad: 128, 64, 32, 16, 8, 4 y 2 mg/l.
5. A las 24 horas se realiza el ensayo de MTT (siguiendo las pautas descritas en el capítulo 3).

### **Análisis estadístico de los datos**

Todos los ensayos se realizaron siempre por triplicado y se repitieron al menos dos veces. Se calcularon y compararon las medias de los datos obtenidos. Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron usando el test t-Student o ANOVA. Los paquetes estadísticos utilizados fueron: GraphPad Prism o Statistica. Las diferencias se consideraron significativas cuando se obtenía un valor  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Clorhexidina digluconato

El efecto de la CLX ha sido ampliamente investigado tanto en estudios *in vitro* como en tratamientos en pacientes infectados (Lim et al., 2008; Martín-Navarro et al., 2008; Heredero-Bermejo et al., 2013; Sunada et al., 2014; Aqeel et al., 2016; Heredero-Bermejo et al., 2018).

Al igual que en el resto de las investigaciones, la CLX es eficaz contra los dos aislados estudiados *in vitro* (Figura 4.2). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de 4 y 24 h, ni entre las dos cepas de *Acanthamoeba* spp, a pesar de observarse valores medios distintos. La CLX, a una concentración de 8 mg/l es capaz de matar todos los trofozoítos a las 4 horas en el caso de *A. polyphaga* 2961, y los de *A. griffini* MYP2004 a las 24 h con esa misma concentración. Como ocurre en otros estudios, las cepas que no pertenecen al genotipo T4 muestran más resistencia a los fármacos (Iovieno et al., 2010; Arnalich-Montiel et al., 2014).

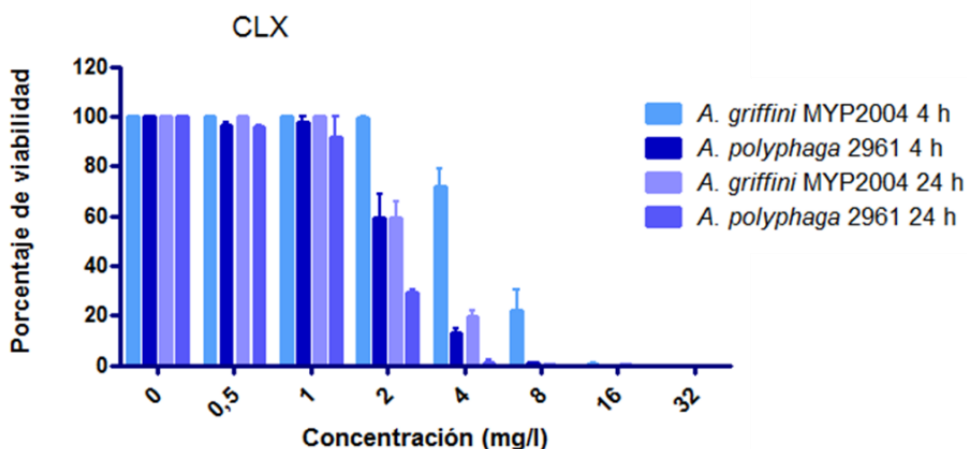


Figura 4.2. Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados con CLX durante 4 y 24 h.

En cuanto a la toxicidad de CLX, se consideró que el producto es tóxico para el hospedador cuando la  $IC_{50}$  (concentración inhibitoria máxima media) en las líneas celulares es menor que la  $IC_{50}$  en los trofozoítos de *Acanthamoeba*. Las células HeLa muestran una  $IC_{50}$  mayor que la que la de las células epiteliales corneales de humano (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Valores de  $IC_{50}$  de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961, así como de las células CEpiCH y HeLa después de ser tratadas durante 24 h con CLX. La concentración se expresa en mg/l. El análisis estadístico de t- Student se empleó para la comparación de los datos entre las dos especies de *Acanthamoeba* y las líneas celulares. Las diferencias estadísticas son significativas cuando  $p < 0,05$ .

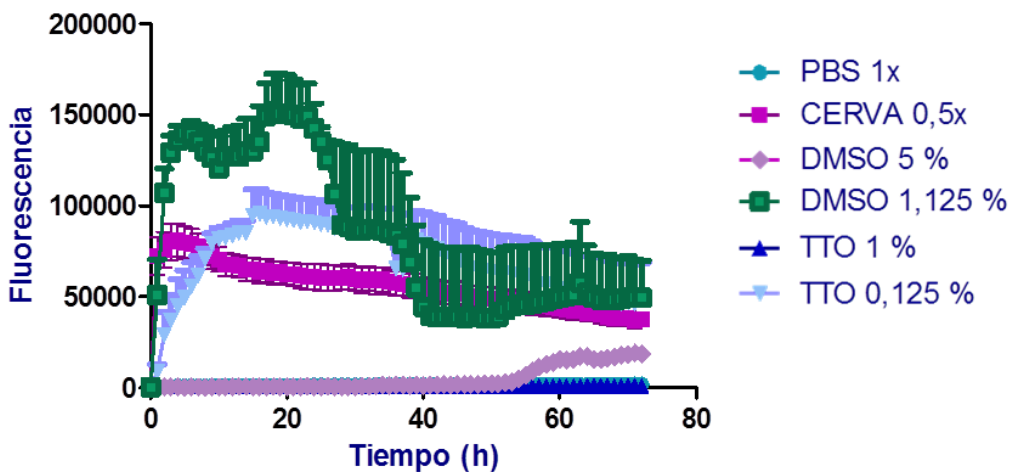
$IC_{50}$ <i>A. griffini</i> MYP2004	$IC_{50}$ CEpiCH / <i>p-value</i>	$IC_{50}$ HeLa / <i>p-value</i>
1,919 ± 1,51	1,427 ± 1,33 / 0,99	8,2 ± 1,6 / 0,000117
$IC_{50}$ <i>A. polyphaga</i> 2961	$IC_{50}$ CEpiCH / <i>p-value</i>	$IC_{50}$ HeLa / <i>p-value</i>
0,8057 ± 1,95	1,427 ± 1,33 / 0,7396	8,2 ± 1,6 / 0,000497

Se puede considerar que la CLX es citotóxica en células CEpiCH cuando se trata una queratitis producida por *Acanthamoeba* del genotipo T3 ya que la concentración que se necesita de este fármaco que es eficaz contra este aislado, también produce daños celulares en las células CEpiCH. Sin embargo, si fuera una queratitis causada por el genotipo T4, no sería citotóxico en ninguno de los dos tipos celulares ya que la concentración necesaria para eliminar los trofozoítos de una cepa T4 es más baja. La resistencia a fármacos según el genotipo del aislado de *Acanthamoeba*, se ha estudiado previamente, y tal como se observa en la presente tesis, las cepas más sensibles son las pertenecientes al genotipo T4. Por tanto, el genotipo es un factor a tener en cuenta a la hora de determinar la concentración de los fármacos a administrar, ya que, en estudios previos, se ha observado que CLX es tóxica cuando se incrementó el número de dosis y aumentó de la concentración (John et al., 1990; Seal et al., 1996; Seal, 2003).

## 4.2. Dimetilsulfóxido y aceite del árbol de té

El dimetilsulfóxido (DMSO) se lleva usando como disolvente que aumenta la penetrancia y eficacia de herbicidas, fungicidas, antibióticos y hormonas desde 1950 (Manjunath y Shivapraksh, 2013). Este fenómeno también se observó en tratamientos *in vitro* de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* (Saunders et al., 1992; Khunkitti et al., 1998). Posteriormente, otros autores también han señalado que a concentraciones de 3 % de DMSO se favorece el enquistamiento en cepas T4 (Kliescikova et al., 2011; Siddiqui et al., 2016a). En cuanto al aceite del árbol del te (TTO), se han estudiado ampliamente sus efectos como antimicrobiano y antifúngico (Carson et al., 2006). Sin embargo, su efecto antiprotozoario ha sido algo menos investigado, encontrando trabajos en los que se ensaya frente a *L. major* y *Trypanosoma* spp. (Mikus et al., 2000; Baldissera et al., 2014). En *Acanthamoeba* se han realizado solo dos estudios (Albouchi et al., 2017; Hadaś et al., 2017), ambos en cepas de genotipo T4.

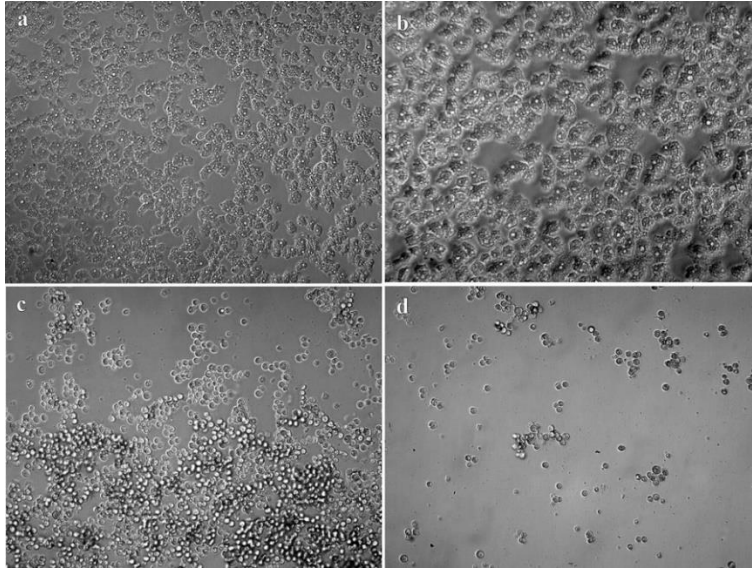
En nuestro estudio se ha evaluado tanto el efecto del DMSO y TTO conjuntamente y por separado, en dos cepas de *Acanthamoeba* pertenecientes al genotipo T4 (*A. polyphaga* 2961) y al genotipo T3 (*A. griffini* MYP2004). En un primer ensayo se evaluaron dos concentraciones de DMSO y TTO por separado mediante OCR en *A. griffini* para determinar el rango de concentraciones a ensayar. En la **Figura 4.3** se observa que los niveles de fluorescencia obtenidos en los pocillos control positivo (trofozoítos cultivados en su medio), tratados con 1,25 % de DMSO y 0,125 % de TTO son altos, a mayor fluorescencia, mayor tasa de O<sub>2</sub> consumido lo que implica un mayor número de trofozoítos viables. No se observa emisión de fluorescencia en los pocillos del control negativo (trofozoítos cultivados en PBS 1x), tratados con 5 % de DMSO y 1 % de TTO, lo cual indica que estas concentraciones son amebicidas. Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad, a partir del 3 % de DMSO los trofozoítos de *Acanthamoeba* tienden a enquistarse (Kliescikova et al., 2011; Siddiqui et al., 2016a), así pues, esta ausencia de tasa respiratoria no se puede atribuir a una muerte celular hasta comprobarse por microscopia la ausencia de trofozoítos y quistes.



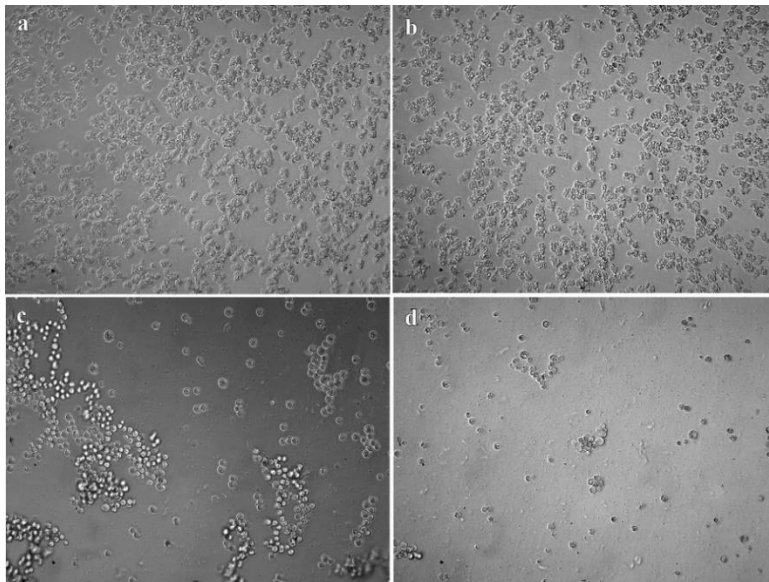
**Figura 4.3.** Gráfica obtenida por el ensayo OCR de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004.

Se determinó por microscopia, si las concentraciones de 5 % de DMSO y 1 % de TTO son amebicidas o favorecen el enquistamiento en *A. polyphaga* 2961 y *A. griffini* MYP2004 respectivamente. En estos ensayos, se observaron quistes en los pocillos tratados con 5 % de DMSO, mientras que en los tratados con 1 % de TTO no se observaron quistes ni trofozoítos viables. En base a estos resultados, se expusieron los trofozoítos de *A. griffini* y *A. polyphaga* a distintas concentraciones de DMSO (5 - 0,6 %) para determinar a partir de qué concentración de DMSO se favorece el enquistamiento. Se observaron quistes en las concentraciones iguales y mayores de 1,25 % (**Figura 4.4 y 4.5**).





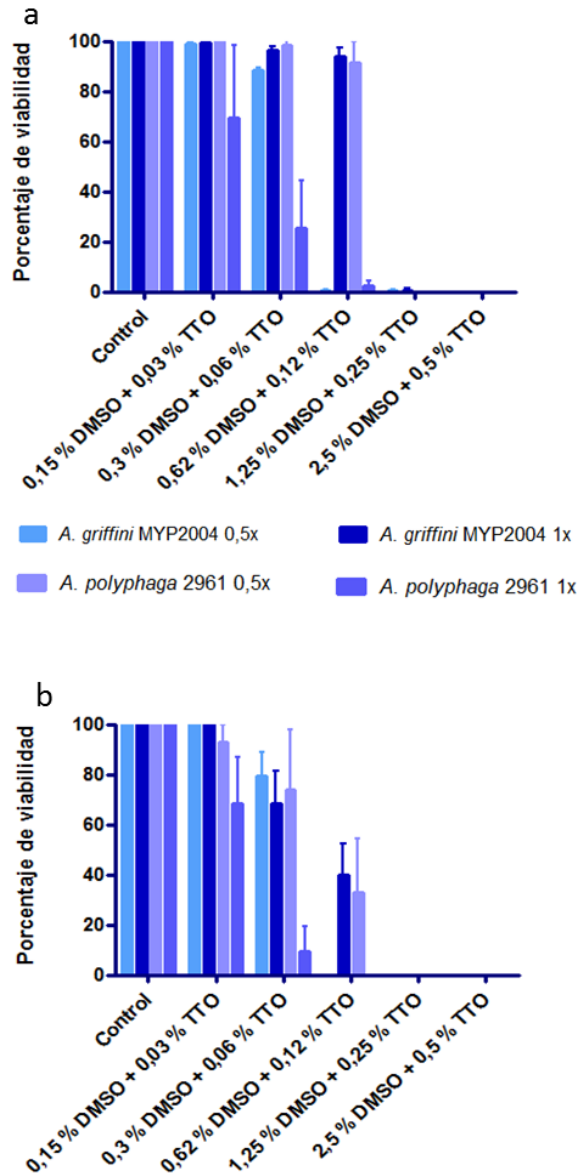
**Figura 4.4.** Experiencias de tratamiento con DMSO en trofozoítos de *A. griffini* MYP2004- Fotografías al microscopio óptico. **a.** Trofozoítos observados en el control. **b.** Trofozoítos observados a una concentración de 0,625 % de DMSO. **c.** Quistes observados a una concentración de 1,25 % de DMSO. **d.** Quistes observados a una concentración de 2,5 % de DMSO.



**Figura 4.5.** Experiencias de tratamiento con DMSO en trofozoítos de *A. polyphaga* 2961- Fotografías al microscopio óptico **a.** Trofozoítos observados en el control. **b.** Trofozoítos observados a una concentración de 0,625 % de DMSO. **c.** Quistes observados a una concentración de 1,25 % de DMSO. **d.** Quistes observados a una concentración de 2,5 % de DMSO.

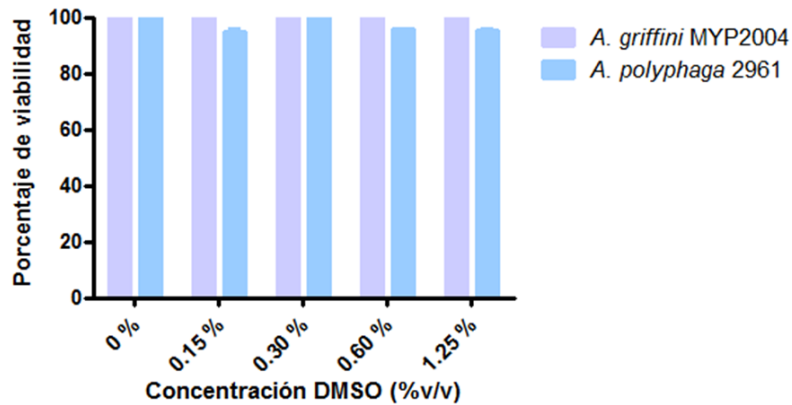
Por lo tanto, la ausencia de respiración en los pocillos tratados con 2,5 % DMSO se debe a la presencia de quistes viables y, en el caso de los tratados con 1 % TTO se debe al efecto amebicida del aceite.

Sabiendo que el DMSO es un agente que favorece el enquistamiento, no se pueden continuar haciendo ensayos de eficacia con placas OCR porque no se sabría si los trofozoítos están muertos o se han enquistado. Se probaron distintas combinaciones de DMSO y TTO con dos concentraciones de los medios de cultivos (0,5x y 1x) para determinar si la falta de nutrientes afecta a la sensibilidad de las cepas a los tratamientos (**Figura 4.6**). El análisis estadístico (t-Student) revela que no hay diferencias estadísticamente significativas entre realizar el ensayo a una concentración u otra de medio. Además, las diferencias que se observan entre el tratamiento a las 4 y 24 horas no son estadísticamente significativas, a pesar de que sí se observa una reducción mayor en la viabilidad de los trofozoítos tratados a las 24 horas. También se observan diferencias entre el genotipo T3 (*A. griffini* MYP2004) y T4 (*A. polyphaga* 2961), siendo más resistente el genotipo T3 a las 4 horas de tratamiento, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas. A las 24 horas no se observan diferencias entre un genotipo y otro. (**Figura 4.6**).

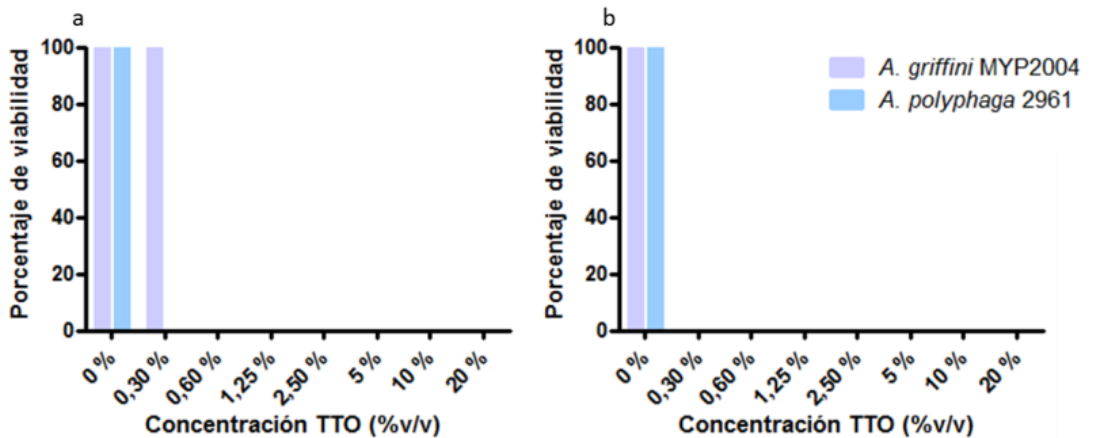


**Figura 4.6.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoitos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados con DMSO y TTO. **a.** Porcentaje de viabilidad a las 4 h del tratamiento. **b.** Porcentaje de viabilidad a las 24 h del tratamiento.

El efecto de DMSO en combinación con el TTO provoca lisis de los trofozoítos a las concentraciones de DMSO a las cuales se favorece el enquistamiento (2,5 %DMSO + 0,5 % TTO). La eficacia de la combinación de los fármacos no es dosis dependiente, ya que no se observa una reducción del porcentaje de viabilidad hasta llegar a la combinación de 0,62 % DMSO + 0,12 % TTO, donde disminuye drásticamente (**Figura 4.6**). Al estudiar ambos compuestos por separado, se observa que el DMSO no tiene efecto amebicida en los trofozoítos de *Acanthamoeba* ni a las 4 ni a las 24 h (**Figura 4.7**), mientras que el TTO es capaz de matar a todos los trofozoítos a la concentración de 0,3 % a las 4 horas en el caso de *A. polyphaga* 2961 y a las 24 horas en el caso de *A. griffini* MYP2004 (**Figura 4.8**).

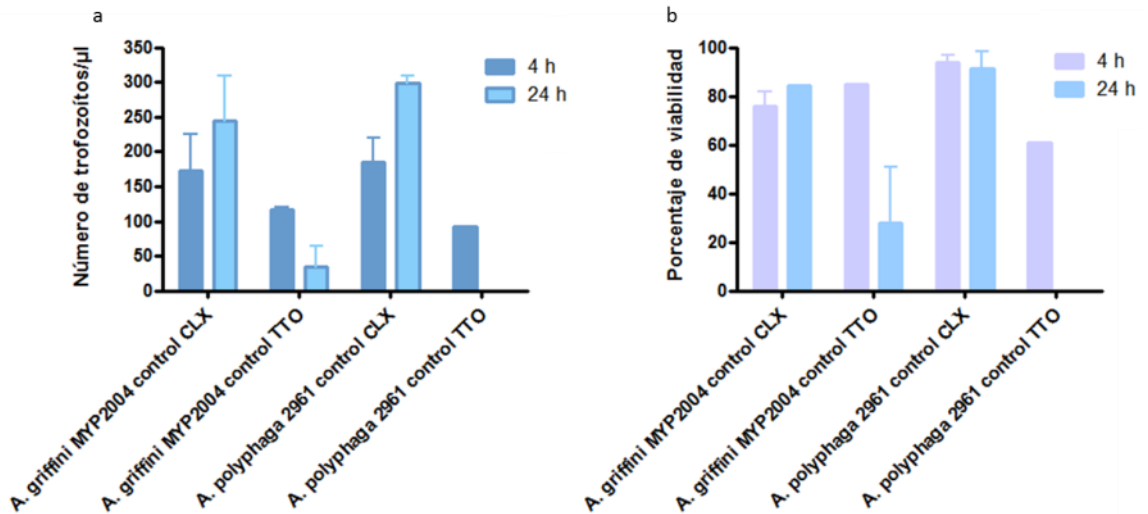


**Figura 4.7.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados con DMSO después de 24 h.



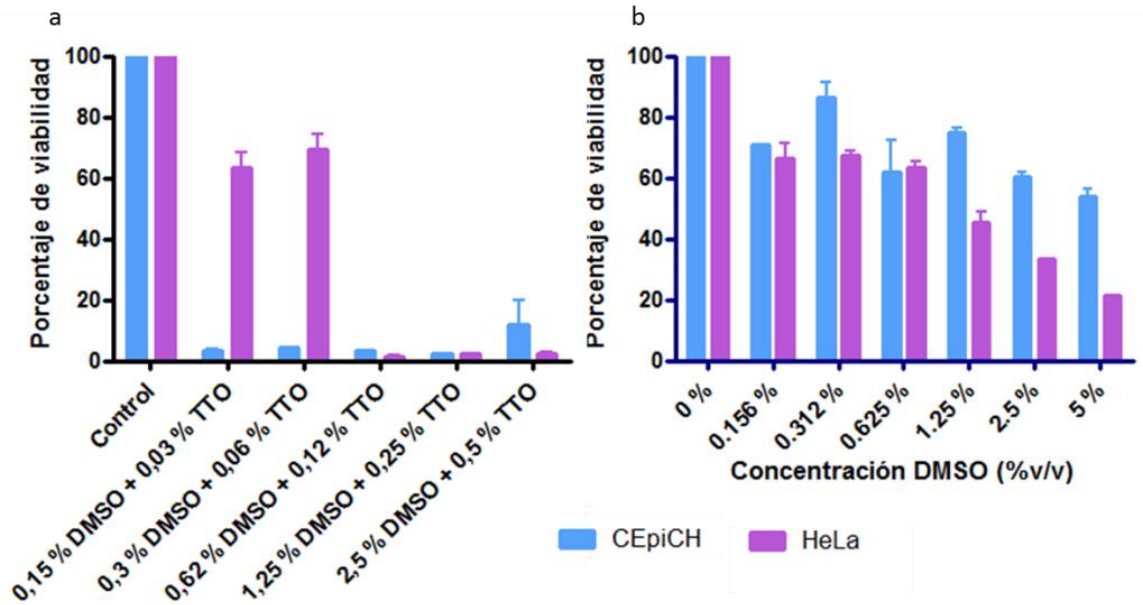
**Figura 4.8.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados con TTO. **a.** Porcentaje de viabilidad a las 4 h del tratamiento. **b.** Porcentaje de viabilidad a las 24 h del tratamiento.

Sin embargo, el control del ensayo de eficacia del TTO también está afectado. Se observa una disminución del porcentaje de viabilidad de los trofozoítos y el número de estos, fenómeno que no se observa en otros ensayos de eficacia con otros compuestos (**Figura 4.9**). Una posible explicación a esto es la toxicidad de los vapores emitidos por el TTO tal y cómo se describe en el trabajo de Hadaś et al., (2017), en el cual explican que los ratones a los que se les inoculó trofozoítos de *Acanthamoeba* e inhalaban los vapores del aceite, no desarrollaron la infección.

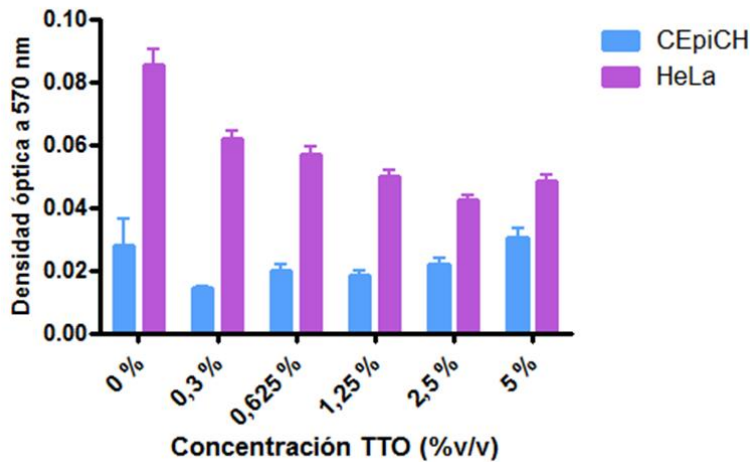


**Figura 4.9.** Comparación de controles de los ensayos de eficacia con CLX y con TTO. **a.** Número de trofozoítos viables/μl de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961. **b.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961.

En cuanto a la toxicidad en células CEpiCH y HeLa de estos compuestos, se advierte que cuando se combinan, la mezcla es citotóxica en CEpiCH incluso a bajas concentraciones, mientras que en células HeLa sólo es tóxico a las combinaciones que son eficaces contra los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 (**Figura 4.10a**). El DMSO es más tóxico en células humanas que en *Acanthamoeba* (**Figura 4.10b**): la IC<sub>50</sub> en células CEpiCH es de 5 % y en las células HeLa es de 0,8 %, mientras que los trofozoítos de ambas cepas no causan reducción, y por tanto no se puede calcular la IC<sub>50</sub>. Aunque la IC<sub>50</sub> del DMSO es más baja en las células humanas que en los trofozoítos de *Acanthamoeba*, se consideró no citotóxico. En el ensayo de citotoxicidad del TTO en ambas líneas celulares, las células de los pocillos control estaban también muertas, al igual que en el caso de los ensayos de eficacia. Como ya hemos indicado, esto podría ser debido a los vapores emitidos por el aceite, ya que en ningún caso previo hemos tenido dificultad alguna para mantener elevados porcentajes de vitalidad en las células de mamífero de los controles (**Figura 4.11**), por lo que, lo hemos considerado tóxico.



**Figura 4.10.** Porcentaje de viabilidad de células humanas CEpiCH y HeLa. **a.** Frente a combinaciones de DMSO + TTO. **b.** Frente a DMSO.



**Figura 4.11.** Densidad óptica obtenida en los ensayos de citotoxicidad del TTO en células humanas CEpiCH y HeLa.

El DMSO fue propuesto por Siddiqui et al., (2016a) para ser incluido como un componente de las soluciones de limpieza de lentes debido a que es capaz de enquistar los trofozoítos y, los quistes no son capaces de adherirse a células epiteliales de la córnea (Dudley et al., 2005), por tanto, no habría transferencia de este parásito desde las lentes a la córnea. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral apoyan el uso del DMSO en soluciones desinfectantes de

lentillas para prevenir la queratitis amebiana. Sin embargo, se ha comprobado que la concentración de DMSO puede ser más baja que la señalada por Siddiqui et al., (2016a). Además, el DMSO no es citotóxico en las concentraciones en las que favorece el enquistamiento. No obstante, habría que estudiar la interacción del DMSO con los desinfectantes presentes en las soluciones de lentillas tales como poliaminopropil biguanida también denominado como polihexanida (PHMB), miristamido propil dimetil amina, policuaturnio (Stevenson y Seal, 1998; Shoff et al., 2008). Se ha apuntado que el DMSO presenta una acción transportadora para ciertos antibióticos, como la propamidina isetonado (Saunders et al., 1992), haciendo que estos sean más eficaces, y por tanto, podrían ser más tóxicos para las amebas y para las células del epitelio corneal.

La actividad antimicrobiana y la citotoxicidad del TTO ha sido ampliamente estudiada (Carson et al., 2006; Hammer et al., 2006)., no cabe duda del efecto bactericida y bacteriostático del TTO frente a diversas especies bacterianas, así como su capacidad antifúngica (Carson et al., 2006). Igualmente se ha señalado un notable efecto acaricida (Walton et al., 2000), aparente con la simple exposición de los ácaros a los vapores del TTO (Iori et al., 2005). En cuanto a la toxicidad del TTO, se sabe que la ingestión de altas cantidades es tóxica y puede ocasionar reacciones alérgicas en uso tópico (Carson et al., 2006). Además, se ha estudiado la citotoxicidad en líneas celulares humanas tales como monocitos humanos y neutrófilos, siendo el TTO citotóxico a partir de concentraciones de 0,016 % (v/v) (Brand et al., 2001). Sin embargo, se desconoce la relación entre la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, el TTO suele usarse por vía tópica, y la aplicación de cualquier otra forma debe de ser estudiada cuidadosamente antes de ser aplicada ya que no existen estudios al respecto (Hammer et al., 2006). Con los estudios realizados en la presente tesis, se puede observar que incluso los vapores del TTO causan pérdida de viabilidad en las células CEpiCH y HeLa. Por lo tanto, sugerir el uso del TTO como un posible candidato para tratar la QA es arriesgado, ya que se desconoce realmente su citotoxicidad. Por ello, deben de realizarse más ensayos de citotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

### 4.3. Nanopartículas, dendrones y dendrímeros

Recientes estudios realizados con nanopartículas de oro y de plata conjugadas con fármacos han revelado que, en la mayoría de los casos, la eficacia del fármaco es mayor que cuando se ensaya solo (Ashraf et al., 2012; Aqeel et al., 2016; Anwar et al., 2018a). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual la combinación de fármacos con nanopartículas hace que sean más eficaces. Dado que las nanopartículas se emplean como transportadores de fármacos, es posible que estas nanopartículas faciliten la entrada de los productos quimioterapéuticos al interior de los microorganismos, incluidos los protozoos del género *Acanthamoeba* (Ashraf et al., 2012; Aqeel et al., 2016; Anwar et al., 2018a).

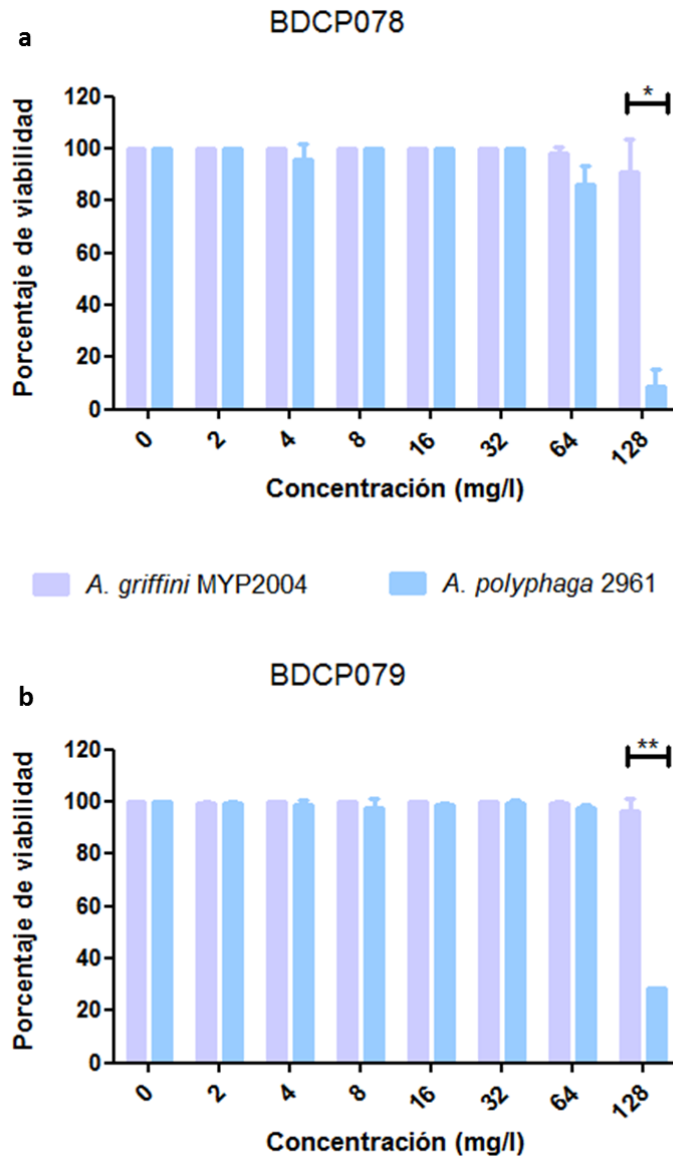
Dados estos antecedentes, se decidió estudiar el efecto de nanopartículas de plata y oro funcionalizadas con dendrones catiónicos de primera (BDCP078 y BDCP086) y segunda generación (BDCP079), nanopartículas de plata con dendrones catiónicos de primera generación ligados a polietilenglicol-PEG (BDAB024). También se han evaluado los dendrones catiónicos (BDCP092, BDCP093 y BDCP094). Estos últimos compuestos se han mostrado eficaces previamente frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* ZMF KSK (resistente a metilina), *S. hemolyticus* ZMF SV212 (multiresistente), *Enterobacter fecalis* ZMF BD156, *E. coli*

ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata* ZMF40 (Peña-Gonzalez et al., 2017).

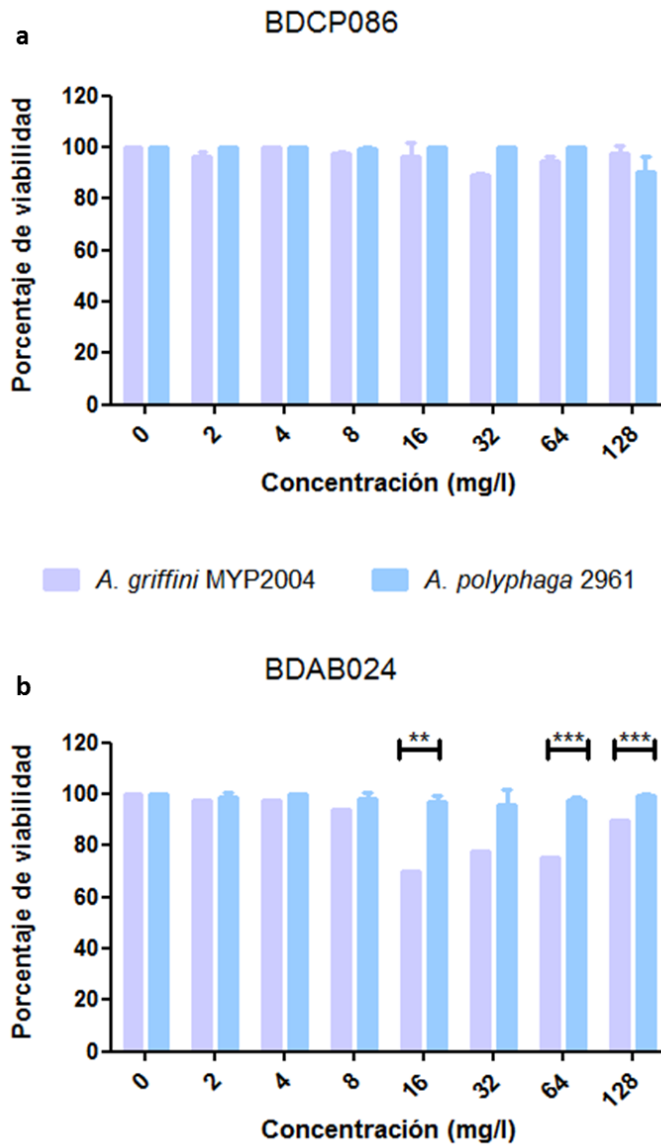
Al enfrentar trofozoítos de *A. griffini* y *A. polyphaga* con estos compuestos sólo se observó una disminución del porcentaje de viabilidad a las 24 h de incubación. Las nanopartículas de oro (BDCP078 y BDCP079) son más eficaces que las nanopartículas de plata (BDCP086 y BDAB024) (**Figura 4.12** y **4.13**), a diferencia de lo obtenido por Peña-González et al., (2017). En estudios realizados en otras especies de amebas del género *Harmanella*, los iones de plata no mostraron actividad amebicida (Rohr et al., 2000), y es posible, que en *Acanthamoeba* spp. tampoco, de ahí que no se observe disminución en el porcentaje de viabilidad en los ensayos realizados en esta tesis. Además, a diferencia de lo observado en los otros compuestos, la cepa T3 es más sensible que la T4 cuando se trata con nanopartículas de plata (**Figura 4.14**).

En cuanto, a los dendrones analizados, se observa que cuanto mayor es la generación del dendrímero, menor es la concentración necesaria para eliminar el 100 % de trofozoítos (**Figura 4.14**) siendo, por tanto, más eficaz el dendrón de tercera generación con 8 grupos amonio (BDCP094). Sin embargo, al comparar el efecto entre las nanopartículas y los dendrones por separado, son los dendrones los que muestran mayor eficacia, al contrario de lo que se observa en otros trabajos previos (Aqeel et al., 2016; Anwar et al., 2018a y b).

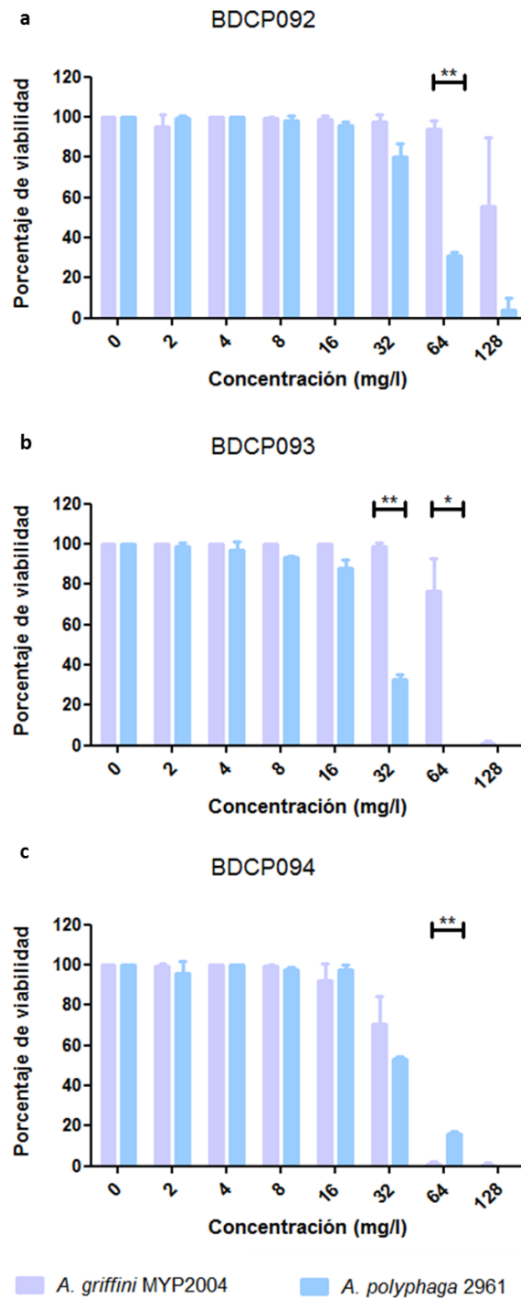




**Figura 4.12.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados durante 24 h con: **a.** Nanopartícula de oro funcionalizada con dendrones de G1 (BDCP078). **b.** Nanopartícula de oro funcionalizada con dendrones de G2 (BDCP079).



**Figura 4.13.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados durante 24 h con: **a.** Nanopartícula de plata funcionalizada con dendrones G1 (BDCP086). **b.** Nanopartícula de plata funcionalizada con dendrones G1 y PEG (BDAB024).



**Figura 4.14.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados durante 24 h con: **a.** Dendrón catiónico G1 (BDCP092). **b.** Dendrón catiónico G2 (BDCP093). **c.** Dendrón catiónico G3 (BDCP094).

Deben realizarse más estudios para entender cuál es el mecanismo de acción de estos dendrones en los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. En estudios anteriores, realizados por nuestro grupo de investigación, se determinó que los dendrímeros y dendrones catiónicos carbosilanos con grupos funcionales amonios o guanidinas son capaces de penetrar a través de la membrana celular e interactuar con ella (Heredero-Bermejo et al., 2018). Se desconoce si estos dendrones, que también son catiónicos carbosilanos y tienen grupos funcionales amonio, tienen esa misma capacidad, en cualquier caso, el efecto de los dendrones se ve disminuido cuando se integran en nanopartículas, ya sean de oro o de plata (**Tabla 4.4**).

La citotoxicidad de estas moléculas es menor en células HeLa, salvo con BDCP079, BDCP093 y BDCP094. Sin embargo, los valores de IC<sub>50</sub> son mayores en los trofozoítos de ambos genotipos que en las líneas celulares (**Tabla 4.4**), por lo que para poder eliminar estos trofozoítos habría que utilizar concentraciones que también causarían daños en las células epiteliales de córnea humana.

**Tabla 4.4.** Valores de IC<sub>50</sub> de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961, así como de las células CEpiCH y HeLa después de ser tratadas durante 24 h. La concentración se expresa en mg/l.

BD	IC <sub>50</sub> <i>A. griffini</i> MYP2004	IC <sub>50</sub> <i>A. polyphaga</i> 2961	IC <sub>50</sub> CEpiCH	IC <sub>50</sub> HeLa
BDCP078	>128	>128	47,00 ± 1,47	64,11 ± 4,53
BDCP079	>128	>128	6,06 ± 1,45	0,64 ± 0,09
BDCP086	>128	>128	1,18 ± 2,37	145,90 ± 11,33
BDAB024	>128	>128	7,83 ± 1,27	>100
BDCP092	>128	>128	7,99 ± 1,51	21,10 ± 3,57
BDCP093	79,43 ± 24,98	47,06 ± 1,50	7,64 ± 1,40	2,94 ± 0,51
BDCP094	100,7 ± 1,85	96,33 ± 1,57	3,30 ± 1,33	0,27 ± 0,15

Igualmente se estudió la primera generación de un dendrímero con núcleo ciclotetrasiloxano y grupos funcionales -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>. Con este dendrímero BDJV001 no se consiguió inhibir el crecimiento de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. después de un tratamiento de 24 horas (**Figura 4.15**). Además, este dendrímero no redujo la viabilidad de las células CEpiCH, pero sí de las células HeLa en las cuales la mitad de la población se reduce a la mitad con una concentración de 32 mg/l (**Figura 4.16**).

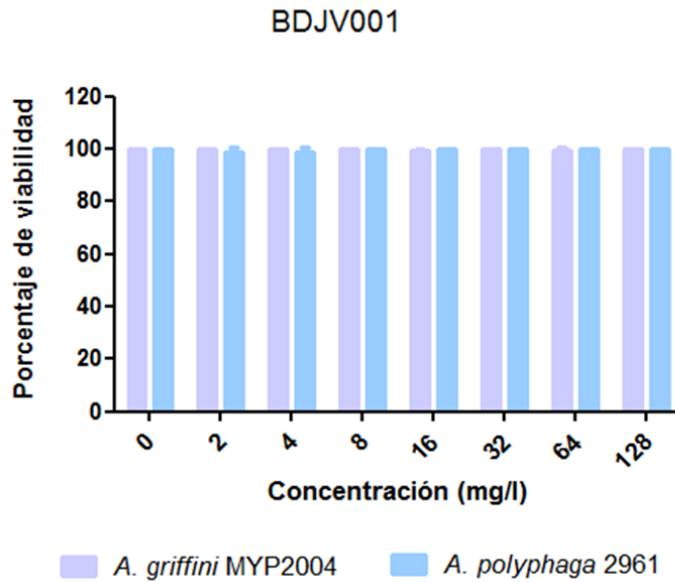


Figura 4.15. Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados durante 24 h con BDJV001.

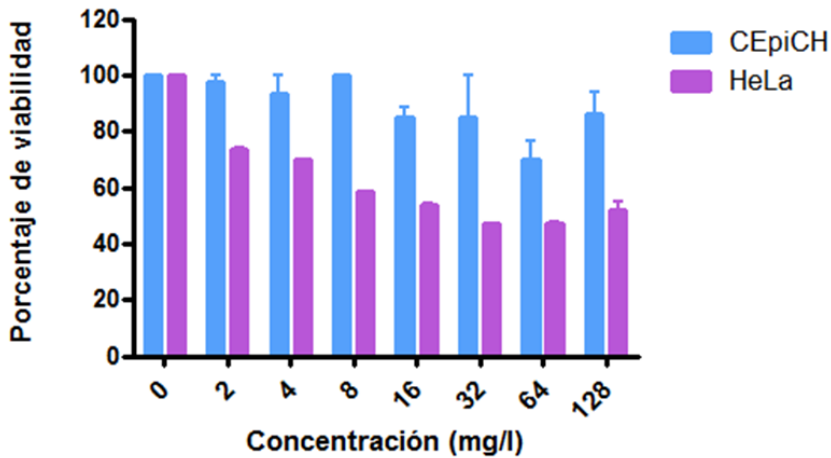
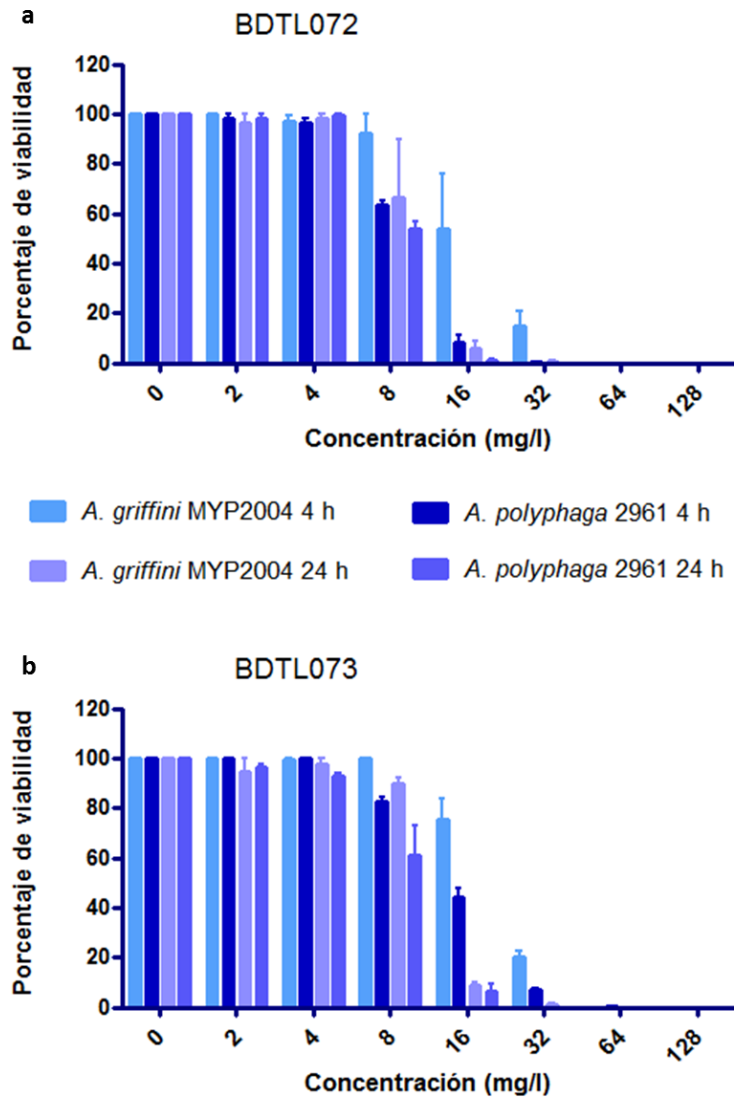


Figura 4.16. Porcentaje de viabilidad de células humanas CEpiCH y HeLa enfrentadas al dendrímero BDJV001.

Dado que este dendrímero no mostró efecto en ninguno de los dos aislados de *Acanthamoeba* estudiados, y que mostró toxicidad en una de las líneas celulares, se descartó este tipo de dendrímero como agentes para el tratamiento de trofozoítos del género *Acanthamoeba*.

Como ya hemos dicho, en estudios previos de este grupo de investigación, se analizaron dendrímeros con grupos funcionales de guanidinas (dendrímeros-GU), que mostraron una buena eficacia contra *A. polyphaga* 2961 (Heredero-Bermejo et al., 2018). Las biguanidas son derivados de las guanidinas y son los grupos activos de la CLX. Por eso, en el trabajo de Heredero-Bermejo et al., (2018), se diseñaron los dendrímeros-GU que son menos tóxicos que las biguanidas, pero curiosamente los dendrímeros con grupos funcionales de amonio mostraron una mayor eficacia contra los trofozoítos. Así pues, se diseñaron dos dendrímeros con grupos funcionales de biguanidas (BDTL072 con 4 grupos y BDTL073 con 8 grupos), y se estudió su efecto en los trofozoítos pertenecientes a dos genotipos diferentes y su toxicidad en líneas celulares humanas (Martín-Pérez et al., 2019).

Estos dendrímeros son capaces de eliminar la población de trofozoítos al 100 % *in vitro* después de 4 h de incubación, cuando son tratados a concentraciones de 64 y 128 mg/l. Además, notamos que *A. polyphaga* es más sensible que *A. griffini* y no se observan trofozoítos viables a concentraciones de 32 mg/l, incluso con solo 4 h de tratamiento con el dendrímero BDTL072 durante 4 h (**Figura 4.17**).



**Figura 4.17.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados durante 4 y 24 h con. **a.** Dendrímero carbosilano G1 con grupos funcionales de biguanida (BDCP072). **b.** Dendrímero carbosilano G2 con grupos funcionales de biguanida (BDCP073). Unidades en mg/l.

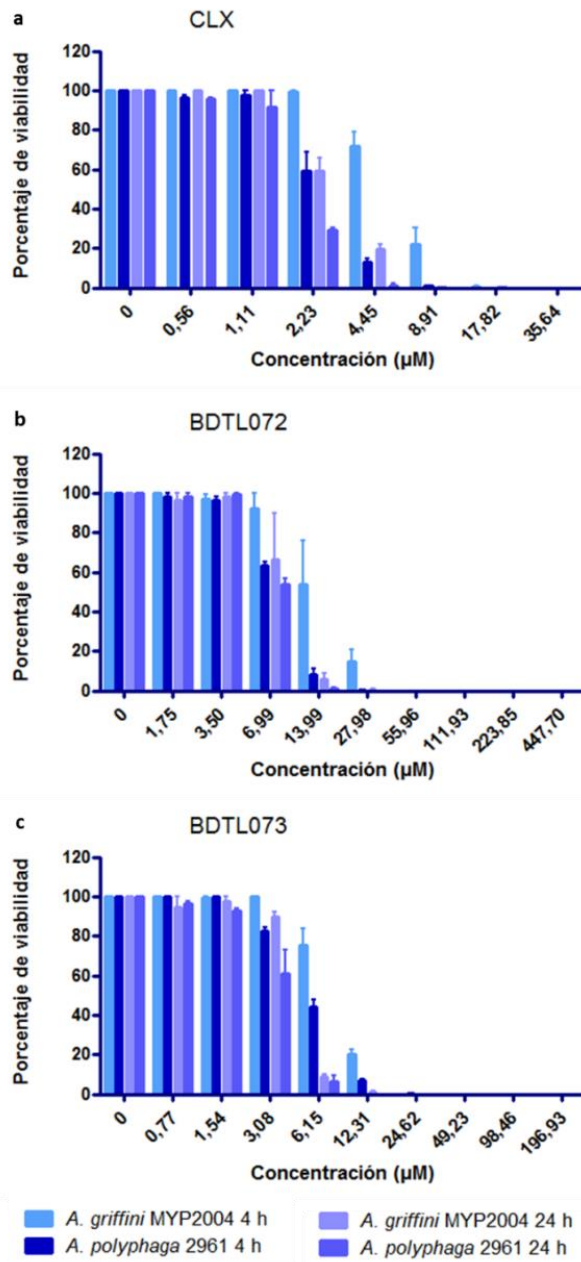
Transcurridas 24 horas del tratamiento, no se observan trofozoítos viables en concentraciones iguales o mayores de 32 mg/l. De todos los compuestos dendríticos ensayados en la presente tesis doctoral, estos dos dendrímeros-biGU (BDTL072 y BDTL073) son los más prometedores. No obstante, si se comparan con la CLX, ésta tiene una mayor eficacia, dado que es capaz de eliminar el 100 % de los trofozoítos a concentraciones menores que las que necesitan los dendrímeros (16 mg/l) y, por tanto, su IC<sub>50</sub> es menor (**Tabla 4.5**). En cuanto a la citotoxicidad, en las dos líneas celulares ensayadas, estos dos dendrímeros son menos tóxicos que la CLX, incluso el BDTL073 no disminuye la viabilidad de las células a ninguna de las concentraciones ensayadas. Así pues, a pesar de que se necesitan concentraciones menores de CLX para eliminar el 100 % de la población de trofozoítos también es tóxica a menores concentraciones. Sin embargo, los dendrímeros, aunque requieren de concentraciones mayores para matar los trofozoítos, son menos tóxicos y por tanto la ventana terapéutica es mayor. En otras palabras, se puede aumentar la concentración de los dendrímeros para eliminar las formas de resistencia sin peligro de toxicidad en las células humanas.

**Tabla 4.5.** Valores de IC<sub>50</sub> de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961, así como de las células humanas CEpiCH y HeLa después de ser tratadas durante 24 h. La concentración se expresa en mg/l.

	IC <sub>50</sub> <i>A. griffini</i> MYP2004	IC <sub>50</sub> <i>A. polyphaga</i> 2961	IC <sub>50</sub> CEpiCH	IC <sub>50</sub> HeLa
CLX	1,50 ± 1,47	0,64 ± 1,90	1,43 ± 1,33	8,2 ± 1,6
BDTL072	6,674 ± 1,44	5,568 ± 1,34	12,48 ± 2,00	27,13 ± 1,48
BDTL073	8,81 ± 1,52	6,08 ± 1,40	>128	>128

Por otro lado, si los datos de las concentraciones se expresan en µM, es decir, teniendo en cuenta la masa molecular, y, por tanto, el número de moléculas necesarias para alcanzar la actividad, se puede observar como BDTL073 es capaz de eliminar el 100 % de los trofozoítos a concentraciones similares que la CLX. Por otra parte, el dendrímero BDTL072 tiene que ser aplicado a mayores concentraciones para conseguir el mismo efecto (**Figura 4.18**).





**Figura 4.18.** Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961 tratados durante 4 y 24 h con: **a.** Clorhexidina digluconato. **b.** Dendrímero carbosilano G1 con grupos funcionales de biguanida (BDL072). **c.** Dendrímero carbosilano G2 con grupos funcionales de biguanida (BDL073). Unidades en μM.

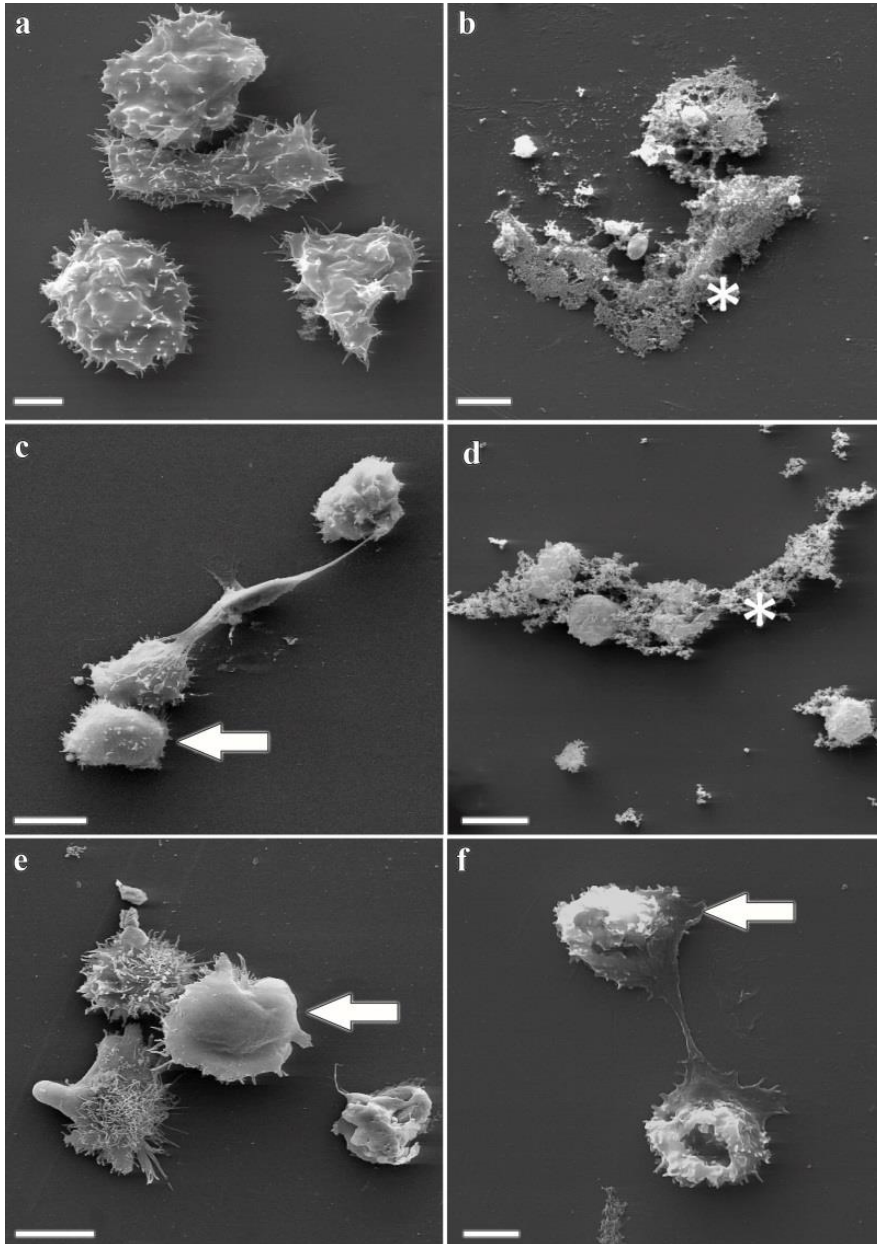
Cuando los valores de IC<sub>50</sub> también se expresan en μM, se observa que en ambas amebas (*A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961) la actividad de los dendrímeros-biGU no difiere tanto de los de la CLX (**Tabla 4.6**).

**Tabla 4.6.** Valores de IC<sub>50</sub> de los trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 y *A. polyphaga* 2961, así como de las células humanas CEpiCH y HeLa después de ser tratadas durante 24 h. La concentración se expresa en μM.

	IC <sub>50</sub> <i>A. griffini</i> MYP2004	IC <sub>50</sub> <i>A. polyphaga</i> 2961	IC <sub>50</sub> CEpiCH	IC <sub>50</sub> HeLa
CLX	1,67 ± 1,47	0,72 ± 1,90	1,59 ± 1,33	9,13 ± 1,6
BDTL072	5,58 ± 1,45	4,61 ± 1,35	10,77 ± 2,03	23,72 ± 1,49
BDTL073	2,62 ± 1,70	1,61 ± 1,57	>49,23	>49,23

En cuanto a las unidades a emplear para expresar las concentraciones de fármacos, no están estandarizadas por el momento (Stewart y Watson, 1983). En la actualidad, las unidades más empleadas son unidades de masa (mg/l) o unidades molares (μM) (Jones et al., 2013). Por lo tanto, lo más recomendable es siempre dar los datos en ambas unidades, tal y como se realiza en algunos libros de texto internacionales (Jones et al., 2013). En la presente tesis, sólo se muestran los datos en ambas unidades para los dendrímeros BTL072 y BTL073, ya que el resto de los compuestos no muestran eficacia contra los trofozoítos de *Acanthamoeba*.

En las fotografías realizadas al microscopio electrónico de barrido, se observa que los trofozoítos del control tienen un tamaño normal con numerosos acantópodos, mientras que los tratados ya sean con los dendrímeros-biGU o CLX muestran una notable pérdida de acantópodos y tienen una forma más redondeada (**Figura 4.19**).



**Figura 4.19.** Efectos del tratamiento con CLX y dendrímeros-biGU en la morfología de los trofozoítos después de 24 h de incubación, observados al MEB. **a.** Trofozoítos control de *A. polyphaga* 2961. **b.** Trofozoítos de *A. polyphaga* 2961 tratados con 4 mg/l (3,50  $\mu$ M) del dendrímero BDTL072. **c.** Trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 tratados con 4 mg/l (3,50  $\mu$ M) del dendrímero BDTL072. **d.** Trofozoítos de *A. polyphaga* 2961 tratados con 4 mg/l (1,53  $\mu$ M) del dendrímero BDTL073. **e.** Trofozoítos de *A. griffini* MYP2004 tratados con 4 mg/l (1,53  $\mu$ M) del dendrímero BDTL073. **f.** Trofozoítos de *A. polyphaga* 2961 tratados con 2 mg/l (1,11  $\mu$ M) de CLX. La barra de la escala es de 5  $\mu$ m en todas las imágenes, excepto en a y f, que es de 10  $\mu$ m. En algunas concentraciones los trofozoítos están lisados (marcados con un asterisco). La pérdida de acantópodos en los trofozoítos están marcados con flechas.

Se cree, aunque todavía no se ha probado, que el mecanismo propuesto para la acción de compuestos catiónicos como las biguanidas se basa, como se describió para bacterias, en la interacción de sus cargas positivas con las cargas negativas presentes en la membrana plasmática de la ameba, penetrándola y desplazando los cationes  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando así la lisis celular (Seal, 2003). Deben realizarse más estudios para entender exactamente el mecanismo de acción, y así poder sintetizar nuevos dendrímeros o dendrones que puedan actuar de la misma manera (pero a menores concentraciones) y, además que sean menos tóxicos que los que se han estudiado en el presente trabajo. Por otra parte, creemos que una posible opción sería funcionalizar nanopartículas de plata u oro con los dendrímeros BDTL072 y BDTL073 para analizar si el efecto de estos dendrímeros-biGU tienen mayor actividad cuando están incluidos en las nanopartículas.

Muchos estudios proponen el uso de nanopartículas y dendrímeros como un buen recurso para futuros tratamientos (Heredero-Bermejo et al., 2013; Heredero-Bermejo et al., 2015; Aqeel et al., 2016; Anwar et al., 2018a y b; Heredero-Bermejo et al., 2018). La presente tesis doctoral corrobora que estos compuestos son buenos candidatos para futuros tratamientos o como desinfectantes en soluciones de lentillas dado que pueden ser sintetizados a placer eligiendo el núcleo y el tipo y número de grupos funcionales. Además, las nanopartículas se pueden funcionalizar tanto con dendrímeros como con fármacos haciendo que estos sean más eficaces o crear efectos sinérgicos.

## 5. CONCLUSIONES

1. El DMSO es un producto que favorece el enquistamiento de los trofozoítos de *Acanthamoeba*, pero no consigue matar a las amebas. Sin embargo, cuando este disolvente orgánico se usa en combinación con TTO, tanto los trofozoítos como los quistes son eliminados.
2. Las placas de OCR pueden ser útiles en el cribado de fármacos activos frente a *Acanthamoeba*, pero fallan cuando éstos favorecen el enquistamiento. Por tanto, los análisis de respiración deben acompañarse de exámenes microscópicos, a fin de controlar posibles falsos resultados.
3. Los dendrímeros carbosilanos con funciones biguanidas ensayados en este estudio son compuestos que presentan propiedades amebicidas prometedoras, mostrando tanto un bajo IC<sub>50</sub> en trofozoítos amebianos como una baja toxicidad sobre células humanas en cultivo.

# Bibliografía





Abbasi, E., Aval, S.F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H.T., Joo, S. W., Pashaei-Asl, R., (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett*, 9(1), 247.

Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G., Forsman, M., (2003). Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*, 69(1), 600 - 606.

Abe, N., Kimata, I., (2010). Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from corneal scrapings and contact lens cases of *Acanthamoeba* keratitis patients in Osaka, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 63(63), 299 - 301.

Adam, K.M.G., (1959). The growth of *Acanthamoeba* sp, in a chemically defined medium. *J Gen Microbiol*, 21, 519 - 529.

Adam, K.M.G., Blewett, D.A., (1967). Carbohydrate utilization by the soil amoeba *Hartmannella castellanii*. *J Protozool*, 14, 227 - 282.

Adamska, M., Leonska-Duniec, A., Lanocha, N., Skotarczak, B., (2014). Thermophilic potentially pathogenic amoebae isolated from natural water bodies in Poland and their molecular characterization. *Acta Parasitol*, 59, 433 - 441.

Aditya, N.P., Vathsala, P.G., Vieira, V., Murthy, R.S.R., Souto, E.B., (2013). Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Adv Colloid Interfac*, 201, 1 - 17.

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

Adl, S.M., Simpson, A., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., (2012). The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, 59, 429 - 493.

Aichelburg, A.C., Walochnik, J., Assadian, O., Prosch, H., Steuer, A., Perneczky, G., Vetter, N., (2008). Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine. *Emerg Infect Dis*, 14(11), 1743.

Albouchi, F., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., López-Arencibia, A., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., Abderrabba, M., (2017). Chemical composition and anti-*Acanthamoeba* activity of *Melaleuca styphelioides* essential oil. *Exp Parasitol*, 183, 104 - 108.

Alizadeh, H., Neelam, S., Cavanagh, H.D., (2009). Amoebicidal activities of alexidine against 3 pathogenic strains of *Acanthamoeba*. *Eye Contact Lens*, 35, 1 - 5.



- 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. *J Infect*, 51, 150 - 156.
- Alves, J.M.P., Gusmão, C.X., Teixeira, M.M.G., Freitas, D.D., Foronda, A.S., Affonso, H.T., (2000). Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Braz J Med Biol Res*, 33(1), 19 - 26.
- Alves, D.S.M.M., Gonçalves, G.S., Moraes, A.S., Alves, L.M., Neto, C., Hecht, M.M., Chalita, M.R., (2018). The first *Acanthamoeba* keratitis case in the Midwest region of Brazil: diagnosis, genotyping of the parasite and disease outcome. *Rev Soc Bras Med Tro*, 51(5), 716 - 719.
- Anwar, A., Siddiqui, R., Hussain, M.A., Ahmed, D., Shah, M.R., Khan, N.A., (2018a). Silver nanoparticle conjugation affects antiacanthamoebic activities of amphotericin B, nystatin, and fluconazole. *Parasitol Res*, 117(1), 265 - 271.
- Anwar, A., Siddiqui, R., Shah, M.R., Khan, N.A., (2018b). Gold nanoparticle-conjugated cinnamic acid exhibits antiacanthamoebic and antibacterial properties. *Antimicrob Agents Ch*, 62(9), e00630-18.
- Arance-Gil, Á., Gutiérrez-Ortega, Á.R., Villa-Collar, C., Nieto-Bona, A., Lopes-Ferreira, D., González-Méijome, J.M., (2014). Corneal cross-linking for *Acanthamoeba* keratitis in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. *Contact Lens Anterio*, 37(3), 224 - 227.
- Arnalich-Montiel, F., Almendral, A., Arnalich, F., Valladares, B., Lorenzo-Morales, J., (2012). Mixed *Acanthamoeba* and multidrug-resistant *Achromobacter xyloxidans* in late-onset keratitis after laser *in situ* keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*, 38, 1853 - 1856.
- Arnalich-Montiel, F., Lumbreras-Fernández, B., Martín-Navarro, C.M., Valladares, B., Lopez-Velez, R., Morcillo-Laiz, R., Lorenzo-Morales, J., (2014). Influence of *Acanthamoeba* genotype on clinical course and outcomes for patients with *Acanthamoeba* keratitis in Spain. *J Clin Microbiol*, 52(4), 1213 - 1216.
- Ashraf, S., Akhtar, N., Ghauri, M.A., Rajoka, M.I., Khalid, Z.M., Hussain, I., (2012). Polyhexamethylene biguanide functionalized cationic silver nanoparticles for enhanced antimicrobial activity. *Nanoscale Res Lett*, 7(1), 267.
- Atalay, H.T., Dogruman-Al, F., Sarzhanov, F., Özmen, M.C., Tefon, A.B., Arıbaş, Y.K., Bilgihan, K., (2018). Effect of riboflavin/rose bengal-mediated PAK-CXL on *Acanthamoeba* trophozoites and cysts *in vitro*. *Curr Eye Res*, 43(11), 1322 - 1325.

Aqeel, Y., Siddiqui, R., Anwar, A., Shah, M.R., Khan, N.A., (2016). Gold nanoparticle conjugation enhances the antiacanthamoebic effects of chlorhexidine. *Antimicrob Agents Ch*, 60(3), 1283 - 1288.

Bacon, A.S., Frazer, D.G., Dart, J.K.G., Matheson, M.M., Ficker, L.A., Wright, P., (1993). A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984–1992. *Eye*, 7(6), 719.

Baldissera, M.D., Da Silva, A.S., Oliveira, C.B., Santos, R.C., Vaucher, R.A., Raffin, R.P., Athayde, M.L., (2014). Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. *Exp Parasitol*, 141, 21 - 27.

Baltaza, W., Padzik, M., Dybicz, M., Szaflik, J., Chomicz, L., (2019). Promising *in vitro* effects of selected antiseptics against *Acanthamoeba Polyphaga* strain-the etiological agent of vision-threatening keratitis identified in polish patient. *Int J Infect Dis*, 79, 84.

Band, R.N., (1961). Biotin, a growth requirement for four soil amoebae, *Nature*, 192, 674.

Band, R.N., (1962). The amino acid requirements of the soil ameba *Hartmannella rhyssodes* Singh. *J Protozool*, 9, 377 - 379.

Barbeau, J., Buhler, T., (2001). Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol*, 152, 753 - 760.

Barker, J., Brown, M.R.W., (1994). Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 140, 1253 - 1259.

Barker, J., Scaife, H., Brown, M.R.W., (1995). Intraphagocytic growth induces an antibiotic resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2684 - 2688.

Behera, H.S., Satpathy, G., Tripathi, M., (2016). Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp, from *Acanthamoeba* meningitis/meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasite Vector*, 9(1), 442.

Behera, H.S., Panda, A., Satpathy, G., Bandivadekar, P., Vanathi, M., Agarwal, T., Tandon, R., (2016). Genotyping of *Acanthamoeba* spp. and characterization of the prevalent T4 type along with T10 and unassigned genotypes from amoebic keratitis patients in India. *J Med Microbiol*, 65(5), 370 - 376.

Benitez, L.B., Caumo, K., Brandelli, A., Rott, M.B., (2011). Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*. *Parasitol Res*, 108, 687 - 691.

Berger, P., Papazian, L., Dancourt, M., La Scola, B., Auffray, J.P., Raoult, D., (2006). Ameba associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis*, 12, 248 - 255.

Bhagwandeem, S.B., Carter, F., Naik, F.R., Levitt, D., (1975). A case of hartmannellid amebic meningoencephalitis in Zambia. *Am J Clin Pathol*, 63(4), 483 - 492.

Bogler, S.A, Zarley, C.D., Burianek, L.L., Fuerst, P.A., Byers, T.J., (1983). Interisolate mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. *Mol Biochem Parasitol*, 8, 145 - 163.

Boletín Oficial del Estado, (2015). Real Decreto 2210/1995.

Bonanno, J.A., Polse, K.A., (1987). Measurement of *in vivo* human corneal stromal pH: open and closed eyes. *Invest Opth Vis Sci*, 28(3), 522 - 530.

Boonman, N., Prachya, S., Boonmee, A., Kittakoo, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Warit, S., Dharmkrong-At Chusattayanond, A., (2012). *In vitro* acanthamoebicidal activity of fusaric acid and dehydrofusaric acid from an endophytic fungus *Fusarium* sp. Tlau3. *Planta Med*, 78, 1562 - 1567.

Booton, G.C., Kelly, D.J., Chu, Y.W., Seal, D.V., Houang, E., Lam, D.S.C., Fuerst, P.A., (2002). 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol*, 40(5), 1621 - 1625.

Booton, G.C., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelly, D.J., Fuerst, P.A., (2005). Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol*, 43(4), 1689 - 1693.

Booton, G.C., Joslin, C.E., Shoff, M., Tu, E.Y., Kelly, D.J., Fuerst, P.A., (2009). Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp, isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis (AK). *Cornea*, 28(6), 673.

Borase, H.P., Patil, C.D., Sauter, I.P., Rott, M.B., Patil, S.V., (2013). Amoebicidal activity of phytosynthesized silver nanoparticles and their *in vitro* cytotoxicity to human cells. *FEMS Microbiol Lett*, 345, 127 - 131.

Brand, C., Ferrante, A., Prager, R.H., Riley, T.V., Carson, C.F., Finlay-Jones, J.J., Hart, P.H., (2001). The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro*. *Inflamm Res*, 50(4), 213 - 219.

Buck, S.L., Rosenthal, R.A., (1996). A quantitative method to evaluate neutralizer toxicity against *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microb*, 62(9), 3521 - 3526.

Buchele, M.L.C., Wopereis, D.B., Casara, F., de Macedo, J.P., Rott, M.B., Monteiro, F.B.F., Caumo, K.S., (2018). Contact lens-related polymicrobial keratitis: *Acanthamoeba* spp. genotype T4 and *Candida albicans*. *Parasitol Res*, 117(11), 3431 - 3436.

Buerano, C.C., Trinidad, A.D., Fajardo, L.S.N., Cua, I.Y., Baclig, M.O., Natividad, F.F., (2014). Isolation of *Acanthamoeba* genotype T4 from a non-contact lens wearer from the Philippines. *Trop Med Int Health*, 42(4), 145 - 147.

Byers, T.J., Akins, R.A., Maynard, B.J., Lefken, R.A., Martin, S.M., (1980). Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation. *J Protozool*, 27, 216 - 219.

Byers, T.J., Kim, B.G., King, L.E., Hugo, E.R., (1991). Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*, 13, S373 - S384.

Carlesso, A.M., Mentz, M.B., da Machado, M.L.S., Carvalho, A., Nunes, T.E.T., Maschio, V.J., Rott, M.B., (2014). Characterization of isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs. *Curr Microbiol*, 68(6), 702 - 707.

Carnt, N., Stapleton, F., (2016). Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Ophthalmic Physiol Opt*, 36, 77 - 92.

Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*, 19(1), 50 - 62.

Casero, R.D., Mongi, F., Laconte, L., Rivero, F., Sastre, D., Teherán, A., Ramírez, J.D., (2017). Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol*, 54, 170 - 175.

Casper, T., Basset, D., Leclercq, C., Fabre, J., Peyron-Raison, N., Reynes, J., (1999). Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS: response to 5-fluorocytosine therapy. *Clin Infect Dis*, 29, 944 - 945.

Castellano-Sanchez, A., Popp, A.C., Nolte, F.S., Visvesvara, G.S., Thigpen, M., Redei, I., Somani, J., (2003). *Acanthamoeba castellanii* encephalitis following partially mismatched related donor peripheral stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, 5(4), 191 - 194.

Castillo, R.D., Garza, J.X., Shamszadeh, M., Reiff, A.O., Marzan, K.A., (2012). *Acanthamoeba* meningoencephalitis presenting as neuropsychiatric lupus in a pediatric patient. *Clin Exp Rheumatol*, 30(2), 272 - 276.

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

Cerva, L., (1969). Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*, *Science*, 163, 576.

Cerva, L., (1989). *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immuno*, 33, 99 - 103.

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 Trop*, 117(1), 23 - 30.

Chandra, S.R., Adwani, S., Mahadevan, A., (2014). *Acanthamoeba* meningoencephalitis. *Ann Indian Acad Neur*, 17(1), 108.

Chandrasekar, P.H., Nandi, P.S., Fairfax, M.R., Crane, L.R., (1997). Cutaneous infections due to *Acanthamoeba* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med*, 157, 569 - 572.

Chang, J.M., Di Tommaso, P., Notredame, C., (2014). TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. *Mol Bio Evol*, 31, 1625 - 1637.

ChaoJiang, Z.W., Zhang, Y., (2019). Differences in the cysticidal activity of topical agents against three genotypes of *Acanthamoeba* isolated from patients with Keratitis. *Acta Microsc*, 28(5).

Chen, F.S., Maurice, D.M., (1990). The pH in the precorneal tear film and under a contact lens measured with a fluorescent probe. *Exp Eye Res*, 50(3), 251 - 259.

Cheng, L.L., Young, A.L., Lau, T.T.Y., Tam, P.T.H., Lam D.S.C., (2013). Review of *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses in Hong Kong Chinese people. *HKJ Ophthalmol*, 13, 9 - 14.

Chomicz, L., Padzik, M., Szaflik, J.P., Nahorski, W.L., Kryczka, T., Szaflik, J., (2014). Monitoring of *in vitro* dynamics of *Acanthamoeba* strains isolated from infected eyes as a useful tool in keratitis management. *Exp Parasitol*, 145, S73 - S77.

Chomicz, L., Conn, D.B., Padzik, M., Szaflik, J.P., Walochnik, J., Zawadzki, P.J., Dybicz, M., (2015). Emerging threats for human health in Poland: pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis monitored in terms of their *in vitro* dynamics and temperature adaptability. *BioMed Res Int*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/231285>.

Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E., (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 65, 3759 - 3767.

Clarke, B., Sinha, A., Parmar, D.N., Sykakis, E., (2012). Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *J Ophthalmol*, 2012, doi:10.1155/2012/484892

Cloninger, M.J., (2002). Biological applications of dendrimers. *Curr Opin Chem Biol*, 6(6), 742 - 748.

Cordingley, J.S., Willis, R.A., Villedomez, C.L., (1996). Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *J Cell Biochem*, 61(2), 167 - 171.

Corsaro, D., Venditti, D., (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res*, 107(1), 233 - 238.

Corsaro, D., Venditti, D., (2011). More *Acanthamoeba* genotypes: limits to use rDNA fragments to describe new genotype. *Acta Protozool*, 2011(1), 49 - 54.

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). *Parasitol Res*, 114(7), 2481 - 2490.

Corsaro, D., Köhler, M., Di Filippo, M.M., Venditti, D., Monno, R., Di Cave, D., Walochnik, J., (2017). Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol Res*, 116(4), 1273 - 1284.

Corsaro, D., Venditti, D., (2018a). An apparent *Acanthamoeba* genotype is the product of a chimeric 18S rDNA artefact. *Parasitol Res*, 117(2), 571 - 577.

Corsaro, D., Venditti, D., (2018b). Unusual 18S rDNA of *Acanthamoeba* containing intron turned out to be a T5/T4 chimera. *Parasitol Res*, 1 - 6.

Costa, A.O., Castro, E.A., Ferreira, G.A., Furst, C., Crozeta, M.A., Thomaz-Soccol, V., (2010). Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. *J Eukaryot Microbiol*, 57(1), 70 - 75.

Costa de Aguiar, A.P., Oliveira-Silveira, C., Todero-Winck, M.A., Brittes-Rott, M., (2013). Susceptibility of *Acanthamoeba* to multipurpose lens-cleaning solutions. *Acta Parasitol*, 58, 304 - 308.

Costas, M., Griffiths, A.J., (1986). Physiological characterizations of *Acanthamoeba* strains. *J Protozool*, 33 (2), 304 - 309.

Criado-Fornelio, A., Verdú-Expósito, C., Martín-Pérez, T., Moracho-Vilrriales, C., Heredero-Bermejo, I., Copa-Patiño, J.L., Soliveri de Carranza, J., Pérez-Serrano, J., (2017). Laboratory analysis of soil respiration using oxygen-sensitive microplates. *Geoderma*, 305, 12 - 20.

Cucina, A., Filali, S., Risler, A., Febvay, C., Salmon, D., Pivot, C., Pirot, F., (2019). Dual 0.02% chlorhexidine digluconate–0.1% disodium EDTA loaded thermosensitive ocular gel for *Acanthamoeba* keratitis treatment. *Int J Pharm*, 556, 330 - 337.

Culbertson, C.G., Smith, J.W., Miner, J.R., (1958). *Acanthamoeba*: Observation on animal pathogenicity, *Science*, 127, 1506.

Cursons, R.T., Brown, T.J., (1978). Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J Clin Pathol*, 31(1), 1 - 11.

Cursons, R.T., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M., Till, D., (1980). Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun*, 29, 401 - 407.

Da Silva, M.A., da Rosa, J.A., (2003). Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust. *Rev Saude Publ*, 37(2), 242 - 246.

Daggett, P.M., Lipscomb, D., Sawyer, T.K., Nerad, T.A., (1985). A molecular approach to the phylogeny of *Acanthamoeba*. *Biosystems*, 18(3 - 4), 399 - 405.

Das, S., Saha, R., Rani, M., Goyal, R., Shah, D., Asish, J.K., (2016). Central nervous system infection due to *Acanthamoeba*: a case series. *Trop parasitol*, 6(1), 88.

Date, A.A., Joshi, M.D., Patravale, V.B., (2007). Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliver Rev*, 59(6), 505 - 521.

De Jonckheere, J., (1980). Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol*, 39, 681 - 685.

De Jonckheere, J.F., (1983). Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J Protozool*, 30 (4), 701 - 706.

De Jonckheere, J.F., (1987). Taxonomy in amphizoic amoebae human pathology. E.G. Rondanelli, Ed. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italy pp. 25 - 48.

De Jonckheere, J.F., Michel, R., (1988). Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol Res*, 74, 314 - 316.

- De Jonckheere, J.F., (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*, 13, 385 - 387.
- De Jonckheere, J.F., (2003). Epidemiological typing of *Acanthamoeba* strains isolated from keratitis cases in Belgium. *B Soc Belge d'ophtalmologie*, 287, 27 - 36.
- Debnath, A., Tunac, J.B., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Shibayama, M., McKerrow, J.H., (2014). *In vitro* efficacy of corifungin against *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 1523 - 1528.
- Degerli, S., Tepe, B., Celiksoz, A., Berk, S., Malatyali, E., (2012a). *In vitro* amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Exp Parasitol*, 131, 20 - 24.
- Degerli, S., Berk, S., Malatyali, E., Tepe, B., (2012b). Screening of the *in vitro* amoebicidal activities of *Pastinaca armenea* (Fisch. & Mey.) and *Inula oculus-christi* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res*, 110, 565 - 570.
- Del Chierico, F., Di Cave, D., Accardi, C., Santoro, M., Masotti, A., D'Alfonso, R., Putignani, L., (2016). Identification and typing of free-living *Acanthamoeba* spp, by MALDI-TOF MS Biotyper. *Exp Parasitol*, 170, 82 - 89.
- Dendana, F., Sellami, H., Trabelsi, H., Neji, S., Cheikhrouhou, F., Makni, F., Ayadi, A., (2013). *Acanthamoeba* T4 genotype associated with keratitis infections in Tunisia. *Parasitol Res*, 112(1), 401 - 405.
- Deng, Y., Ran, W., Man, S., Li, X., Gao, H., Tang, W., Tachibana, H., Cheng, X., (2015). Artemether exhibits amoebicidal activity against *Acanthamoeba castellanii* through inhibition of the serine biosynthesis pathway. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 4680 - 4688.
- Derda, M., Hadaś, E., Thiem, B., (2009). Plant extracts as natural amoebicidal agents. *Parasitol Res*, 104, 705 - 708.
- Derda, M., Thiem, B., Budzianowski, J., Wojt, W.J., Wojtkowiak-Giera, A., (2013). The evaluation of the amoebicidal activity of *Eryngium planum* extracts. *Acta Pol Pharm*, 70, 1027 - 1034.
- Derda, M., Hadaś, E., (2014). The use of phytotherapy in diseases caused by parasitic protozoa. *Acta Parasitol*, 60(1), 1 - 8.
- Derda, M., Solarczyk, P., Cholewiński, M., Hadaś, E., (2015). Genotypic characterization of amoeba isolated from *Acanthamoeba* keratitis in Poland. *Parasitol Res*, 114(3), 1233 - 1237.
- Diaz, J., Osuna, A., Rosales, M.J., Cifuentes, J., Mascaro, C., (1991). Sucker-like structures in two strains of *Acanthamoeba*: scanning electron microscopy study. *Int J Parasitol*, 21(3), 365 - 367.



Di Cave, D., Monno, R., Bottalico, P., Guerriero, S., D'amelio, S., D'orazi, C., Berrilli, F., (2009). *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur J Clin Microbiol*, 28(6), 607 - 612.

Di Cave, D., D'Alfonso, R., Comlavi, K.A.D., D'Orazi, C., Monno, R., Berrilli, F., (2014). Genotypic heterogeneity based on 18S rRNA gene sequences among *Acanthamoeba* isolates from clinical samples in Italy. *Exp Parasitol*, 145, S46 - S49.

Di Gregorio, C., Rivasi, F., Mongiardo, N., De Rienzo, B., Wallace, S., Visvesvara, G.S., (1992). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, 116(12), 1363 - 1365.

Dickson, J.M., Zetler, P.J., Walker, B., Javer, A.R., (2009). *Acanthamoeba* rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 38, E87 - E90.

Doan, N., Rozansky, G., Nguyen, H.S., Gelsomino, M., Shabani, S., Mueller, W., Johnson, V., (2015). Granulomatous amebic encephalitis following hematopoietic stem cell transplantation. *Surg Neurol Int*, 6(Suppl 18), S459.

Dodangeh, S., Niyiyati, M., Kamalinejad, M., Lorenzo-Morales, J., Moshfe, A., Haghighi, A., Azargashb, E., (2018). *In-vitro* activity of *Trigonella foenum graecum* seeds against a clinical strain of *Acanthamoeba* genotype T4. *Iran J Pharm Res*, 17(2), 661.

Duarte, J.L., Furst, C., Klisiowicz, D.R., Klassen, G., Costa, A.O., (2013). Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Exp Parasitol*, 135(1), 9 - 14.

Dudley, R., Matin, A., Alsam, S., Sissons, J., Maghsood, A.H., Khan, N.A., (2005). *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Trop*, 95(2), 100 - 108.

Duluol, A.M., Teilhac, M.F., Poirot, J.L., (1996). Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba* sp, in patients with AIDS. *J Eukaryot Microbiol*, 43, 130 - 131.

Durham, K.A., (2012). Molecular studies of the pathogenic free-living amoeba, *Acanthamoeba*. Tesis Doctoral. University of Leicester.

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

Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Teske, A., de Vera, G.A., Sogin, M.L., (2002). Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 7658 - 7662.

El-Sayed, N.M., Ismail, K.A., Ahmed, S.A., Hetta, M.H., (2012). *In vitro* amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancreaticum maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitol Res*, 110, 1985 - 1992.

Epperla, N., Olteanu, H., Hamadani, M., (2016). Think outside the box: *Acanthamoeba* encephalitis following autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Brit J Haematol*, 175(5), 758 - 758.

Ertabaklar, H., Türk, M., Dayanir, V., Ertuğ, S., Walochnik, J., (2007). *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res*, 100(2), 241 - 246.

Ertabaklar, H., Dayanir, V., Apaydin, P., Ertuğ, S., Walochnik, J., (2009). Case report: *Acanthamoeba* keratitis. *Turkiye parazitolojii dergisi*, 33(4), 283 - 285.

Fabres, L.F., Maschio, V.J., dos Santos, D.L., Kwitko, S., Marinho, D.R., de Araújo, B.S., Rott, M.B., (2018). Virulent T4 *Acanthamoeba* causing keratitis in a patient after swimming while wearing contact lenses in Southern Brazil. *Acta Parasitol*, 63(2), 428 - 432.

Feingold, J.M., Abraham, J., Bilgrami, S., Ngo, N., Visvesara, G.S., Edwards, R.L., Tutschka, P.J., (1998). *Acanthamoeba* meningoencephalitis following autologous peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl*, 22(3), 297.

Fernández, M.T., (2014). Caracterización molecular de amebas de vida libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincial de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Fuentes-Paniagua, E., Sánchez-Nieves, J., Hernández-Ros, J.M., Fernández-Ezequiel, A., Soliveri, J., Copa-Patiño, J.L., Gómez, R., de la Mata, F.J., (2016). Structure–activity relationship study of cationic carbosilane dendritic systems as antibacterial agents. *RSC Adv*, 6(9), 7022 - 7033.

Fuerst, P.A., Booton, G.C., Crary, M., (2015). Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*, 62, 69 - 84.

Fung, K.T.T., Dhillon, A.P., McLaughlin, J.E., Lucas, S.B., Davidson, B., Rolles, K., Burroughs, A.K., (2008). Cure of *Acanthamoeba* cerebral abscess in a liver transplant patient. *Liver Transplant*, 14(3), 308 - 312.

Galarza, C., Ramos, W., Gutierrez, E.L., Ronceros, G., Teran, M., Uribe, M., Ortega-Loayza, A.G., (2009). Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *Int J Dermatol*, 48(12), 1324 - 1329.

García, L.S., Bruckner, D.A., Diagnostic Medical Parasitology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993.

Gast, R.J., Ledee, D.R., Fuerst, P.A., Byers, T.J., (1996). Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: Four nuclear 18S rDNA sequencetypes. *J Euk Microbiol*, 43, 498 - 504.

Gast, R.J., (2001). Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol*, 48(6), 609 - 615.

Gatti, S., Rama, P., Matuska, S., Berrilli, F., Cavallero, A., Carletti, S., Di Cave, D., (2010). Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. *J Med Microbiol*, 59(11), 1324 - 1330.

Geith, S., Walochnik, J., Prantl, F., Sack, S., Eyer, F., (2018). Lethal outcome of granulomatous acanthamoebic encephalitis in a man who was human immunodeficiency virus-positive: a case report. *J Med Case Rep*, 12(1), 201.

Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Müller, N., Schürch, N., Gottstein, B., (2009). Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Exp Parasitol*, 121(2), 180 - 186.

Giarolla, J., Rando, D.G., Pasqualoto, K.F., Zaim, M.H., Ferreira, E.I., (2010). Molecular modelling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery. *J Mol Struc-THEOCHEM*, 939(1 - 3), 133 - 138.

Giasuddin, A.S.M., Jhuma, K.A., Haq, A.M., (2012). Use of gold nanoparticles in diagnostics, surgery and medicine: a review. *Bangl J Med Biochem*, 5(2), 56 - 60.

Gomart, G., Denis, J., Bourcier, T., Dory, A., Abou-Bacar, A., Candolfi, E., Sauer, A., (2018). *In vitro* amoebicidal activity of titanium dioxide/UV-A combination against *Acanthamoeba*. *Invest Opth Vis Sci*, 59(11), 4567 - 4571.

Gomes, T., Magnet, A., Izquierdo, F., Vaccaro, L., Redondo, F., Bueno, S., del Aguila, C., (2016). *Acanthamoeba* spp. in contact lenses from healthy individuals from Madrid, Spain. *PLoS one*, 11(4), e0154246.

González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Lorenzo-Morales, J., Martínez-Palomo, A., (2013). *Acanthamoeba royreba*: morphological features and *in vitro* cytopathic effect. *Exp Parasitol*, 133, 369 - 375.

González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Reyes-Batlle, M., Martín-Navarro, C.M., Lorenzo-Morales, J., (2014). Morphological features and *in vitro* cytopathic effect of *Acanthamoeba griffini* trophozoites isolated from a clinical case. *J Parasitol Res*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/256310>

Goze, I., Alim, A., Dag, S., Tepe, B., Polat, Z.A., (2009). *In vitro* amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *J Ocul Pharmacol Ther*, 25, 293 - 298.

Gordon, S.M., Steinberg, J.P., DuPuis, M.H., Kozarsky, P.E., Nickerson, J.F., Visvesvara, G.S., (1992). Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. *Clin Infect Dis*, 15(6), 1024 - 1030.

Greub, G., Raoult, D., (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, 17, 413 - 433.

Griffiths, A.J., Hughes, D.E., (1968). Starvation and encystment of a soil amoeba *Hartmannella castellanii*. *J Protozool*, 15(4), 673 - 677.

Grün, A.L., Stemplewitz, B., Scheid, P., (2014). First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. *Parasitol Res*, 113(6), 2395 - 2400.

Grunnet, M.L., Cannon, G.H., Kushner, J.P., (1981). Fulminant amebic meningoencephalitis due to *Acanthamoeba*. *Neurology*, 31(2), 174.

Guindon, S., Gascuel, O., (2003). A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, 52(5), 696 - 704.

Gupta, S., Shrivastava, R.M., Tandon, R., Gogia, V., Agarwal, P., Satpathy, G., (2011). Role of voriconazole in combined *Acanthamoeba* and fungal corneal ulcer. *Cont Lens Anterio*, 34, 287 - 289.

Hadaś, E., Derda, M., Winięcka-Krusnell, J., Sulek, A., (2004). *Acanthamoeba* spp. as vehicles of pathogenic bacteria. *Acta Parasitol*, 49, 276 - 280.

Hadaś, E., Derda, M., Cholewinski, M., (2017). Evaluation of the effectiveness of tea tree oil in treatment of *Acanthamoeba* infection. *Parasitol Res*, 116, 997 - 1001.

Hajjalilo, E., Behnia, M., Tarighi, F., Niyiyati, M., Rezaeian, M., (2016). Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. *Parasitol Res*, 115(8), 3147 - 3151.

Hall, T.A., (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S*, 41, 95 - 98.

Hamide, A., Sarkar, E., Kumar, N., Das, A.K., Narayan, S.K., Parija, S.C., (2002). *Acanthameba* meningoencephalitis: a case report. *Neurol India*, 50(4), 484.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., Nielsen, J.B., (2006). A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol*, 44(5), 616 - 625.

Hay, J., Kinnear, F., Kirkness, C.M., (1995). *Acanthamoeba* keratitis: laboratory diagnosis, characterization of protozoa and treatment. *Scottish Centre Infect Environ Health*, 29, 90 - 91.

Helton, J., Loveless, M., White, Jr. C.R., (1993). Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. *Am J Dermatopathol*, 15, 146 - 149.

Herederó-Bermejo, I., Martín, C.S.J., Soliveri de Carranza, J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., (2012). *Acanthamoeba castellanii*: *in vitro* UAH-T17c3 trophozoite growth study in different culture media. *Parasitol Res*, 110(6), 2563 - 2567.

Herederó-Bermejo, I., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., Gómez, R., De La Mata, F.J., Pérez-Serrano, J., (2013). *In vitro* comparative assessment of different viability assays in *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Parasitol Res*, 112(12), 4087 - 4095.

Herederó-Bermejo, I., Criado-Fornelio, A., De Fuentes, I., Soliveri, J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., (2015). Characterization of a human-pathogenic *Acanthamoeba griffini* isolated from a contact lens-wearing keratitis patient in Spain. *Parasitol*, 142(2), 363 - 373.

Herederó-Bermejo, I., (2015). Caracterización de nuevos aislados de *Acanthamoeba* y evaluación *in vitro* de la actividad amebicida de nanopartículas dendríticas. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá.

Herederó-Bermejo, I., Criado-Fornelio, A., Soliveri, J., Díaz-Martín, J. A., Matilla-Fuentes, J., Sánchez-Arias, J. A., Pérez-Serrano, J. (2015). Development of a new oxygen consumption rate assay in cultures of *Acanthamoeba* (Protozoa: Lobosea) and its application to evaluate viability and amoebicidal activity *in vitro*. *Exp Parasitol*, 155, 35 - 39.

Herederó-Bermejo, I., Sánchez-Nieves, J., Soliveri, J., Gómez, R., de la Mata, F.J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., (2016). *In vitro* anti-*Acanthamoeba* synergistic effect of chlorhexidine and cationic carbosilane dendrimers against both trophozoite and cyst forms. *Int J Pharm*, 25, 1 - 7.

Herederó-Bermejo, I., Hernández-Ros, J.M., Sánchez-García, L., Maly, M., Verdú-Expósito, C., Soliveri, J., de la Mata, F.J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., Sánchez-Nieves, J., Gómez, R., (2018). Ammonium and guanidine carbosilane dendrimers and dendrons as microbicides. *Eur Polym J*, 101, 159 - 168.

Hewett, M.K., Robinson, B.S., Monis, P.T., Saint, C.P., (2003). Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool*, 42(4), 325 - 330.

Hirukawa, Y., Nakato, H., Izumi, S., Tsuruhara, T., & Tomino, S., (1998). Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *BBA-Gene Struct Expr*, 1398(1), 47 - 56.

Hiti, K., Walochnik, J., Faschinger, C., Haller-Schober, E.M., Aspöck, H., (2001). Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea*, 20 (5), 467 - 470.

Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.H., Wagner, M., (1999). Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol*, 1(4), 357 - 367.

Hughes, R., Heaselgrave, W., Kilvington, S., (2003). *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. *Antimicrob Agents Ch*, 47(10), 3080 - 3084.

Ibrahim, Y.W., Boase, D.L., Cree, I.A., (2009). How could contact lens wearers be at risk of *Acanthamoeba* infection? A review. *J Optom*, 2(2), 60 - 66.

Imran, M., Muazzam, A.G., Habib, A., Matin, A., (2016). Synthesis, characterization and amoebicidal potential of locally synthesized TiO<sub>2</sub> nanoparticles against pathogenic *Acanthamoeba* trophozoites *in vitro*. *J Photochem Photobiol B*, 159, 125 - 132.

Ingalls, C.S., Brent, M.M., (1983). Defined minimal growth medium for *Acanthamoeba polyphaga*. *J Protozool*, 30(3), 606 - 608.

Iori, A., Grazioli, D., Gentile, E., Marano, G., Salvatore, G., (2005). Acaricidal properties of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree oil) against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Vet Parasitol*, 129(1 - 2), 173 - 176.

Iovieno, A., Ledee, D.R., Miller, D., Alfonso, E.C., (2010). Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. *Ophthalmology*, 117(3), 445 - 452.

Jacobson, L.M., Band, R.N., (1987). Genetic heterogeneity in a natural population of *Acanthamoeba polyphaga* from soil, an Isoenzyme analysis 1. *J Protozool*, 34 (1), 83 - 86.

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

Jensen, T., Barnes, W.G., Meyers, D., (1970). Axenic cultivation of large populations of *Acanthamoeba castellanii* (JBM). *J Parasitol*, 56, 904 - 906.

Jercic, M.I., Aguayo, C., Saldarriaga-Córdoba, M., Muiño, L., Chenet, S.M., Lagos, J., Fernández, J., (2019). Genotypic diversity of *Acanthamoeba* strains isolated from Chilean patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Parasite Vector*, 12(1), 58.

Jha, B.K., Jung, H.J., Seo, I., Kim, H.A., Suh, S.I., Suh, M.H., Baek, W.K., (2014). Chloroquine has a cytotoxic effect on *Acanthamoeba* encystation through modulation of autophagy. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 6235 - 6241.

John, T., Lin, J., Sahm, D.F., (1990). *Acanthamoeba* keratitis successfully treated with prolonged propamidine isethionate and neomycin-polymyxin-gramicidin. *Ann Ophthalmol*, 22(1), 20 - 23.

John, D.T., Howard, M.J., (1995). Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res*, 81(3), 193 - 201.

Johnson, A.M., Feikle, R., Christy, P.E., Robinson, B., Baverstock, P.R., (1990). Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *J Gen Microbiol*, 136, 1689 - 1698.

Jones, D.B., Visvesvara, G.S., Robinson, N.M., (1975). *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc UK*, 95(2), 221 - 232.

Jones, G.R., Bryant, S., Fullinfaw, R., Ilett, K., Miners, J.O., Morris, R.G., Doogue, M.P., (2013). Mass or molar? Recommendations for reporting concentrations of therapeutic drugs. *Med J Australia*, 198(7), 368 - 369.

Kanavi, M.R., Naghshgar, N., Javadi, M.A., Hashemi, M.S., (2012). Various confocal scan features of cysts and trophozoites in cases with *Acanthamoeba* keratitis. *Eur J Ophthalmol*, 22 (7S), 46 - 50.

Kaushal, V., Chhina, D.K., Kumar, R., Pannu, H.S., Dhooira, H.P.S., Chhina, R.S., (2008). *Acanthamoeba* encephalitis. *Indian J Med Microbi*, 26(2), 182.

Kaya, Y., Baldemir, A., Karaman, Ü., Ildiz, N., Arıcı, Y.K., Kaçmaz, G., Konca, Y., (2019). Amebicidal effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) against *Acanthamoeba* cysts. *Food Sci Nutr*, <https://doi.org/10.1002/fsn3.849>

Kennedy, G.M., Hooley, G.C., Champion, M.M., Mba-Medie, F., Champion, P.A., (2014). A novel ESX-1 locus reveals that surface-associated ESX-1 substrates mediate virulence in *Mycobacterium marinum*. *J Bacteriol*, 196, 1877 - 1888.

Khan, N.A., Jarroll, E.L., Panjwani, N., Cao, Z., Paget, T.A., (2000). Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol*, 38(8), 2858 - 2861.

Khan, N.A., (2001). Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol*, 43(6), 391 - 395.

Khan, N.A., Jarroll, E.L., Paget, T.A., (2002). Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol*, 45(3), 197 - 202.

Khan, N.A., (2003). Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathogenesis*, 34(6), 277 - 285.

Khan, N.A., Tareen, N.K., (2003). Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasit*, 50(2), 97 - 104.

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

Khan, N.A., (2010). Novel *in vitro* and *in vivo* models to study central nervous system infections due to *Acanthamoeba* spp. *Exp Parasitol*, 126, 69 - 72.

Khan, N.A., (2015). *Acanthamoeba*, Biology and Pathogenesis. Second Edition, Caister Academic Press, Norfolk, UK, ISBN: 978-1-908230-50-8.

Khanna, V., Shastri, B.A., Anusha, G., Mukhopadhyay, C., Khanna, R., (2014). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in immunocompetent: A case report and review of literature. *Trop Parasitol*, 4(2), 115.

Khunkitti, W., Lloyd, D.F.J.R., Furr, J.R., Russell, A.D., (1998). *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J Infection*, 36(1), 43 - 48.

Kilic, A., Tanyuksel, M., Sissons, J., Jayasekera, S., Khan, N.A., (2004). Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol*, 49(3), 246 - 252.

Kilvington, S., Larkin, D.F., White, D.G., Beeching, J.R., (1990). Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol*, 28, 2722 - 2725.

Kilvington, S., Lonnen, J.A., (2009). Comparison of regimen methods for the removal and inactivation of bacteria, fungi and *Acanthamoeba* from two types of silicone hydrogel lenses. *Contact Lens Anterio*, 32, 73 - 77.

Kinnear, F.B., (2003). Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella*: quantitative & qualitative *in vitro* studies on keratocytes. *J Infection*, 46, 228 - 237.

Kliescikova, J., Kulda, J., Nohynkova, E., (2011). Stress-induced pseudocyst formation-a newly identified mechanism of protection against organic solvents in *Acanthamoebae* of the T4 genotype. *Protist*, 162(1), 58 - 69.



Köhler, M., Leitsch, D., Duchêne, M., Nagl, M., Walochnik, J., (2009). *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. *FEMS Microbiol Lett*, 299(2), 121 - 127.

Kong, H.H., (2009). Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol*, 47(Suppl), S21.

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

Kuzma, L., Derda, M., Hadaś, E., Wysokinska, H., (2015). Abietane diterpenoids from *Salvia sclarea* transformed roots as growth inhibitors of pathogenic *Acanthamoeba* spp. *Parasitol Res*, 114, 323 - 327.

La Scola, B., Raoult, D., (2001). Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infec*, 7(2), 75 - 79.

Lackner, P., Beer, R., Broessner, G., Helbok, R., Pfausler, B., Brenneis, C., Schmutzhard, E., (2010). Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. *Neurocrit care*, 12(1), 91 - 94.

Lahiri, K.R., Shetti, S.S., Nadkarni, Ü.S., (1991). Complicating pyogenic meningitis. *Indian Pediatr*, 28.

Lahr, D.J.G., Parfrey, L.W., Mitchell, E.A.D., Katz, L.A., Lara, E., (2011). The chastity of amoebae: re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. *Proc Roy Soc B: Biological Sciences*, 278, 2081 - 2090.

Lakhundi, S., Khan, N.A., Siddiqui, R., (2014). The effect of environmental and physiological conditions on excystation of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Parasitol Res*, 113(8), 2809 - 2816.

Lalitha, M.K., Anandi, V., Srivastava, A., Thomas, K., Cherian, A.M., Chandi, S.M., (1985). Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. *J Clin Microbiol*, 21(4), 666 - 667.

Lam, D.S.C., Houang, E., Fan, D.S.P., Lyon, D., Seal, D., Wong, E., (2002). Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. *Eye*, 16(5), 608.

Łanocha, N., Kosik-Bogacka, D., Maciejewska, A., Sawczuk, M., Wilk, A., Kuzna-Grygiel, W., (2009). The occurrence *Acanthamoeba* (free living amoeba) in environmental and respiratory samples in Poland. *Acta Protozool*, 48(3), 271.

Ledee, D.R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., Fell, J., Alfonso, E.C., (2009). Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *J Clin Microbiol*, 47(5), 1458 - 1462.

Lee, X., Reimann, C., Greub, G., Sufrin, J., Croxatto, A., (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbes Infect*, 14(3), 268 - 272.

Lim, N., Goh, D., Bunce, C., Xing, W., Fraenkel, G., Poole, T.R., Ficker, L., (2008). Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol*, 145(1), 130 - 135.

Lindsay, R.G., Watters, G., Johnson, R., Ormonde, S.E., Snibson, G.R., (2007). *Acanthamoeba* keratitis and contact lens wear. *Clin Exp Optom*, 90, 351 - 360.

Liu, Y., Schmidt, B., Maskell, D.L., (2010). MSAProbs: multiple sequence alignment based on pair hidden Markov models and partition function posterior probabilities. *Bioinformatics*, 26, 1958 - 1964.

Lloves, M., Lores, B., Pascual, S., Arias, C., Paniagua, E., (1996). Isolation of *Acanthamoeba* spp. in intensive aquaculture areas of Vigo estuary (NM, Spain). *Sci Mar*, 60(4), 549 - 551.

López, L., De Fernando, S., Gaztelurrutia, L., Vilar, B., Pérez-Irezábal, J., Barrón, J., (2000). Queratitis por *Acanthamoeba* spp.: presentación de diez casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 18(5), 229 - 233.

Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martínez, E., Valladares, B., (2005a). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res*, 95(4), 273 - 277.

Lorenzo-Morales, J., Monteverde-Miranda, C.A., Jiménez, C., Tejedor, M. L., Valladares, B., Ortega-Rivas, A., (2005b). Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agr Env Med*, 12(2), 233 - 236.

Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Martínez, E., Khoubbane, M., Artigas, P., María Periago, V., Foronda, P., Abreu-Acosta, N., Valladares, B., Mas-Coma, S., (2006). *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region. *Egy Acta Trop*, 100, 67 - 69.

Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Álvarez-Marín, J., Bahaya, Y., Walochnik, J., Valladares, B., (2007). Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res*, 102(1), 167 - 169.

Lorenzo-Morales, J., Morcillo-Laiz, R., Martín-Navarro, C.M., López-Vélez, R., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Martínez-Carretero, E., (2011). *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain. *Contact Lens Anterior*, 34(2), 83 - 86.

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

Maciver, S.K., (2016). Asexual Amoebae Escape Muller's Ratchet through Polyploidy. *Trends Parasitol*, 32, 855 - 862.

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. *J Med Microbiol*, 54(8), 755 - 759.

Magliano, A.C., da Silva, F.M., Teixeira, M.M., Alfieri, S.C., (2009). Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol*, 123(3), 231 - 235.

Magnet, A., Galvan, A.L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Vadillo, C.F., Del Aguila, C., (2012). Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res*, 111(1), 383 - 392.

Magnet, A., Fenoy, S., Galván, A.L., Izquierdo, F., Rueda, C., Vadillo, C.F., Del Aguila, C., (2013). A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res*, 47(19), 6966 - 6972.

Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galván-Díaz, A.L., Izquierdo, F., Fenoy, S., Del Aguila, C., (2014). Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res*, 113(8), 2845 - 2850.

Malatyali, E., Tepe, B., Degerli, S., Berk, S., Akpulat, H.A., (2012). *In vitro* amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res*, 110, 167 - 174.

Manjunath, P., Shivaprakash, B.V., (2013). Pharmacology and clinical use of dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Int J Mol Vet Res*, 3(1).

Marciano-Cabral, F., Cabral, G., (2003). *Acanthamoeba* sp, as agents of disease in humans. *Clin Microb Rev*, 16, 273 - 307.

Maritschnegg, P., Sovinz, P., Lackner, H., Benesch, M., Nebl, A., Schwinger, W., Urban, C., (2011). Granulomatous amebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen. *J Clin Microbiol*, 49(1), 446 - 448.

Martín-Navarro, C.M., Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M.G., Rancel, F., Coronado-Alvarez, N.M., Pinero, J.E., Valladares, B., (2008). The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *J Med Microbiol*, 57(11), 1399 - 1404.

Martín-Pérez, T., Criado-Fornelio, A., Martínez, J., Blanco, M.A., Fuentes, I., Pérez-Serrano, J., (2017). Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in Spain. *Eur J Protistol*, 61, 244 - 252.

Martín-Pérez, T., Criado-Fornelio, A., Ávila-Blanco, M., Pérez-Serrano, J., (2018). Development and optimization of new culture media for *Acanthamoeba* spp. (Protozoa: Amoebozoa). *Eur J Protistol*, 64, 91 - 102.

Martín-Pérez, T., Lozano-Cruz, T., Criado-Fornelio, A., Ortega, P., Gómez, R., de la Mata, F.J., Pérez-Serrano, J., (2019). Synthesis and *in vitro* activity of new biguanide-containing dendrimers on pathogenic isolates of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba griffini*. *Parasitol Res*, 118(6), 1953 - 1961.

Martinez, A.J., Janitschke, K., (1985). *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection*, 13(6), 251 - 256.

Martinez, A.J., (1991). Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*, 13(S5), S399 - S402.

Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*, 7(1), 583 - 598.

Martinez, M.S., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., De Lope, A.R., Diz, J., Conde, C., Visvesvara, G.S., (2000). Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol*, 38(10), 3892 - 3895.

Mayer, P.L., Larkin, J.A., Hennessy, J.M., (2011). Amebic encephalitis. *Surg Neurol Int*, 2.

Mazur, T., Hadaś, E., (1994). The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissue on their virulence and its biochemical markers. *Parasitol Res*, 80(5), 431 - 434.

McKellar, M.S., Mehta, L.R., Greenlee, J.E., Hale, D.C., Booton, G.C., Kelly, D.J., Visvesvara, G.S., (2006). Fatal granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis mimicking a stroke, diagnosed by correlation of results of sequential magnetic resonance imaging, biopsy, *in vitro* culture, immunofluorescence analysis, and molecular analysis. *J Clin Microbiol*, 44(11), 4265 - 4269.

McMillen, J., Nazario, M., Jensen, T., (1974). Changes in transfer ribonucleic acids accompanying encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *J Bacteriol*, 117(1), 242 - 251.

Meersseman, W., Lagrou, K., Sciote, R., De Jonckheere, J., Haberler, C., Walochnik, J., Van Wijngaerden, E., (2007). Rapidly fatal *Acanthamoeba* encephalitis and treatment of cryoglobulinemia. *Emerg Infect Dis*, 13(3), 469.

Megha, K., Sehgal, R., Khurana, S., (2018). Genotyping of *Acanthamoeba* spp. isolated from patients with granulomatous amoebic encephalitis. *Indian J Med Res*, 148(4), 456.

Merchant, M., Thibodeaux, D., Loubser, K., Elsey, R.M., (2004). Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Parasitol*, 90(6), 1480 - 1483.

Mikus, J., Harkenthal, M., Steverding, D., Reichling, J., (2000). *In vitro* effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med*, 66, 366 - 368.

Milloning, G., (1961). Advantage of a phosphate buffer for OsO<sub>4</sub> solutions in fixation. *J Appl Phys*, 32, 1637.

Mito, T., Suzuki, T., Kobayashi, T., Zheng, X., Hayashi, Y., Shiraishi, A., Ohashi, Y., (2012). Effect of photodynamic therapy with methylene blue on *Acanthamoeba* *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 6305 - 6313.

Molina-Navarro, E., Pérez, S.M., Merlín, A.S., (2010). El Limnoembalse de Cola de Pareja (Guadalajara): aspectos medioambientales e hidrológicos. *Boletín geológico y minero*, 121(1), 69 - 80.

Moon, E.K., Park, H.R., Quan, F.S., Hong, H.H., (2016). Efficacy of Korean multipurpose contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol*, 54, 697 - 702.

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

Mortazavi, P.N., Goldsworthy, G., Kirk, R., Khan, N.A., (2009). Novel model for the *in vivo* study of central nervous system infection due to *Acanthamoeba* spp (T4 genotype). *J Med Microbiol*, 58, 503 - 508.

Moura, H., Wallace, S., Visvesvara, G.S., (1992). *Acanthamoeba healyi* n. sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of *Acanthamoeba* spp., groups 1 and 3. *J Protozool*, 39 (5), 573 - 583.

Mullis, K.B., Erlich, H.A., Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., Scharf, S.J., (1987). U.S. Patent No. 4., 683.195, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Murakawa, G.J., McCalmont, T., Altman, J., Telang, G.H., Hoffman, M.D., Kantor, G.R., Berger, T.G., (1995). Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. *Arch Dermatol*, 131, 291 - 1296.

Nagyová, V., Nagy, A., Timko, J., (2010). Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. *Parasitol Res*, 106(4), 861 - 872.

Nakisah, M.A., Muryany, M.I., Fatimah, H., Fadilah, R.N., Zalilawati, M.R., Khamsah, S., Habsah, M., (2012). Anti-amoebic properties of a Malaysian marine sponge *Aaptos* sp. on *Acanthamoeba castellanii*. *World J Microb Biot*, 28(3), 1237 - 1244.

Nampoothiri, R.V., Malhotra, P., Jain, A., Batra, N., Gupta, K., Saj, F., Radotra, B., (2018). An unusual cause of central nervous system infection during acute myeloid leukemia induction chemotherapy: *Acanthamoeba* brain abscess. *Indian J Hematol Blo*, 34(1), 153 - 155.

Ndiaye, M., Diop, A.G., Dieng, Y., Seydi, M., Diouf, F.S., Diop, B.M., Ndiaye, I.P., (2005). A case of meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba* sp. in Dakar. *Med Trop (Mars)*, 65(1), 67 - 68.

Neff, R.J., Neff, R.H., (1969). The biochemistry of amoeba encystment. *Symp Soc Exp Biol*, 23, 51 - 81.

Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaie, S., Rahimi, F., Mohebbali, M., Maghsood, A.H., Rezaeian, M., (2009). Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp Parasitol*, 121(3), 242 - 245.

Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaie, S., Rahimi, F., Martín-Navarro, C.M., Mohebbali, M., Rezaeian, M., (2010). First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype T3 and *Vahlkampfia* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Exp Parasitol*, 126(1), 89 - 90.

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. *J Clin Microbiol*, 48(12), 4636 - 4640.

Ofori-Kwakye, S.K., Sidebottom, D.G., Herbert, J., Fischer, E.G., Visvesvara, G.S., (1986). Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*: Case report. *J Neurosurg*, 64(3), 505 - 509.

Olry, A., Schneider-Belhaddad, F., Heintz, D., Werck-Reichhart, D., (2007). A medium-throughput screening assay to determine catalytic activities of oxygen-consuming enzymes: a new tool for functional characterization of cytochrome P450 and other oxygenases. *Plant J*, 51(2), 331 - 340.

Omaña-Molina, M., Vanzzini-Zago, V., Hernandez-Martinez, D., Gonzalez-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Ramirez-Flores, E., Martinez-Palomo, A., (2016). *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. *Parasitol Res*, 115(2), 873 - 878.

Omaña-Molina, M., Vanzzini-Zago, V., Hernández-Martínez, D., Reyes-Batlle, M., Castelan-Ramírez, I., Hernández-Olmos, P., Flores-Alvarado, V. (2019). *Acanthamoeba* keratitis in Mexico: Report of a clinical case and importance of sensitivity assays for a better outcome. *Exp Parasitol*, 196, 22 - 27.

Orosz, E., Farkas, Á., Kucsera, I., (2016). Laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in Hungary. *Acta Microbiol Imm H*, 63(3), 293 - 299.

Orosz, E., Szentmáry, N., Kiss, H.J., Farkas, Á., Kucsera, I., Nagy, Z.Z. (2018). First report of *Acanthamoeba* genotype T8 human keratitis. *Acta Microbiol Imm H*, 65(1), 73 - 79.

Orosz, E., Kriskó, D., Shi, L., Sándor, G.L., Kiss, H.J., Seitz, B., Szentmáry, N., (2019). Clinical course of *Acanthamoeba* keratitis by genotypes T4 and T8 in Hungary. *Acta Microbiol Imm H*, 1 - 12.

Ortillés, Á., Belloc, J., Rubio, E., Fernández, M.T., Benito, M., Cristóbal, J.Á., Goñi, P., (2017). *In-vitro* development of an effective treatment for *Acanthamoeba* keratitis. *Int J Antimicrob Ag*, 50(3), 325 - 333.

Ozkoc, S., Tuncay, S., Delibas, S.B., Akisu, C., Ozbek, Z., Durak, I., Walochnik, J., (2008). Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. *J Med Microbiol*, 57(3), 392 - 396.

Pacella, E., La Torre, G., De Giusti, M., Brillante, C., Lombardi, A.M., Smaldone, G., Pacella, F., (2013) Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Ophthalmol*, 7, 991.

Padzik, M., Szaflik, J.P., Izdebska, J., Szostakowska, B., Szaflik, J., Chomicz, L., (2017). *Acanthamoeba polyphaga* strain—causative agent of vision-threatening keratitis uncommonly detected in Poland, susceptible *in vitro* to toyocamycin. *Klinika Oczna*, 2017(2), 77 - 82.

Page, F.C., (1988). A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture. Freshwater Biological Association.

Page, M.A., Mathers, W.D., (2013). *Acanthamoeba* keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. *J Ophthalmol*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/670242>

Panateri, L.F., Brazil, N.T., Faber, K., Medeiros-Neves, B., von Poser, G.L., Rott, M.B., Teixeira, H.F., (2017). Nanoemulsions containing a coumarin-rich extract from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) for the treatment of ocular *Acanthamoeba* keratitis. *AAPS PharmSciTech*, 18(3), 721 - 728.

Paniagua-Crespo, E., Marti-Mallen, M., Penas-Ares, M.P.M., Arias-Fernandez, M.C., Combarro-Combarro, M.P., (1990). Isolation of amoebae of the genera *Naegleria* and *Acanthamoeba* from public fountains in Galicia (NW Spain). *Water Air Soil Poll*, 53(1-2), 103 - 111.

Penas-Ares, M., Paniagua-Crespo, E., Madriñan-Choren, R., Marti-Mallen, M., Arias-Fernandez, M.C., (1994). Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in NW Spain. *Water Air Soil Poll*, 78(1-2), 83 - 90.

Peretz, A., Geffen, Y., Socea, S.D., Pastukh, N., Graffi, S., (2015). Comparison of fluorescence microscopy and different growth media culture methods for *Acanthamoeba* keratitis diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*, 93, 316 - 318.

Petry, F., Torzewski, M., Bohl, J., Wilhelm-Schwenkmezger, T., Scheid, P., Walochnik, J., Michel, R., Zoller, L., Werhahn, K.J., Bhakdi, S., Lackner, K.J., (2006). Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 44, 1903 - 1904.

Pettit, D.A., Williamson, J., Cabral, G.A., Marciano-Cabral, F., (1996). *In vitro* destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. *J Parasitol*, 82, 769 - 777.

Pemán, J., Jarque, I., Frasset, J., Alberola, C., Salavert, M., Sanz, J., Esteban, G., (2008). Unexpected *postmortem* diagnosis of *Acanthamoeba* meningoencephalitis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Transplant*, 8(7), 1562 - 1566.

Penland, R.L., Wilhelmus, K.R., (1997). Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol*, 35(4), 915 - 922.

Penland, R.L., Wilhelmus, K.R., (1998). Laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using buffered charcoal-yeast extract agar. *Am J Ophthalmol*, 126(4), 590 - 592.



Peña-González, C.E., Pedziwiatr-Werbicka, E., Martín-Pérez, T., Szewczyk, E.M., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., Pérez-Serrano, J., Gómer, R., Bryszewska, M., Sánchez-Nieves J., de la Mata, F.J., (2017). Antibacterial and antifungal properties of dendronized silver and gold nanoparticles with cationic carbosilane dendrons. *Int J Pharm*, 528(1-2), 55 - 61.

Pemán, J., Jarque, I., Frasset, J., Alberola, C., Salavert, M., Sanz, J., Esteban, G., (2008). Unexpected postmortem diagnosis of *Acanthamoeba* meningoencephalitis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Transplant*, 8(7), 1562 - 1566.

Pietrucha-Dilanchian, P., Chan, J.C., Castellano-Sanchez, A., Hirzel, A., Laowansiri, P., Tuda, C., Ratzan, K.R., (2012). *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* amoebic encephalitis with neurotoxoplasmosis coinfection in a patient with advanced HIV infection. *J Clin Microbiol*, 50(3), 1128 - 1131.

Pigon, A., (1970). *Hartmannella*: growth-controlling substances in culture medium. *Protoplasma*, 70, 405 - 414.

Polat, Z.A., Vural, A., Ozan, F., Tepe, B., Ozcelik, S., Cetin A., (2008). *In vitro* evaluation of the amoebicidal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. *J Ocul Pharmacol Ther*, 24, 8 - 14.

Polat, Z.A., Savage, P.B., Genberg, C., (2011). *In vitro* amoebicidal activity of a ceragenin, cationic steroid antibiotic-13, against *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential. *J Ocul Pharmacol Ther*, 27, 1 - 5.

Prashanth, K., Pasricha, G., Sharma, S., (2011). Fluorescence amplified fragment length polymorphism for subtyping of genotypes of *Acanthamoeba* isolated from patients with keratitis. *Indian J Med Res*, 133(1), 83.

Pumidonming, W., Koehler, M., Walochnik, J., (2010). *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitol Res*, 106(3), 553 - 559.

Pussard, M., Pons, R., (1977). Morphology of cystic wall and taxonomy of genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 8, 557 - 598.

Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R., da Silva, A.J., (2006). Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol*, 44(10), 3589 - 3595.

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. *J Eukaryot Microbiol*, 60(6), 626 - 633.

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

Rahdar, M., Niyati, M., Salehi, M., Fegghi, M., Makvandi, M., Pourmehdi, M., Farnia, S., (2012). Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in Ahvaz City, Khuzestan Province, Southern Iran. *Iran J Parasitol*, 7(4), 22.

Rahman, M.M., Yagita, K., Kobayashi, A., Oikawa, Y., Hussein, A.I., Matsumura, T., Tokoro, M., (2013). Genetic characterization of clinical *Acanthamoeba* isolates from Japan using nuclear and mitochondrial small subunit ribosomal RNA. *Korean J Parasitol*, 51(4), 401.

Ranjan, R., Handa, A., Choudhary, A., Kumar, S., (2009). *Acanthamoeba* infection in an interhemispheric ependymal cyst: a case report. *Surg Neurol*, 72(2), 185 - 189.

Raza, R., Matin, A., Sarwar, S., Barsukova-Stuckart, M., Ibrahim, M., Kortz, U., Iqbal, J., (2012). Polyoxometalates as potent and selective inhibitors of alkaline phosphatases with profound anticancer and amoebicidal activities. *Dalton Trans*, 41, 14329 - 14336.

Reddy, R., Vijayasaradhi, M., Uppin, M.S., Challa, S., Jabeen, A., Borghain, R., (2011). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in an immunocompetent patient: an autopsy case report. *Neuropathology*, 31(2), 183 - 187.

Reyes-Batlle, M., Todd, C.D., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Cabello-Vilchez, A.M., González, A.C., Lorenzo-Morales, J., (2014). Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res*, 113(4), 1383 - 1388.

Reyes-Batlle, M., Zamora-Herrera, J., Vargas-Mesa, A., Valerón-Tejera, M.A., Wagner, C., Martín-Navarro, C.M., Piñero, J.E., (2016). *Acanthamoeba* genotypes T2, T4, and T11 in soil sources from El Hierro Island, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res*, 115(8), 2953 - 2956.

Ringsted, J.M.D., Jager, B.V., Suk, D., Vivesvara, G.S., (1976). Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. *Am J Clin Pathol*, 66(4), 723 - 730.

Risler, A., Coupat-Goutaland, B., Pélandakis, M., (2013). Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis, *Parasitol Res*, 112(11), 3807 - 3816.

Rodio, C., da Rocha-Vianna, D., Kowalski, K.P., Panatieri, L.F., von Poser, G., Rott, M.B., (2008). *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res*, 104, 191 - 194.

Rohr, U., Weber, S., Selenka, F., Wilhelm, M., (2000). Impact of silver and copper on the survival of amoebae and ciliated protozoa *in vitro*. *Int J Hyg Envir Heal*, 203(1), 87 - 89.

Rondanelli, E.G., Carosi, G., Lanzarini, P., Filice, G., (1987). Ultrastructure of *Acanthamoeba-Naegleria* free-living amoebae, p. 87-125, In: E. G. Rondanelli (Ed.), *Amphizoic amoebae: human pathology*. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italy.

Rosales, M.J., Ximenis, M., Costa, A., Rotger, C., Romero, D., Olmo, F., Sánchez, M., (2018). *In vitro* activity of squaramides and acyclic polyamine derivatives against trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *J Biosci Med*, 6(08), 1 - 14.

Sadaka, H.A., Emam, E.E., (2001). Is the intestinal tract a portal of entry for *Acanthamoeba* infection? *J Egypt Soc Parasitol*, 31, 781 - 790.

Salameh, A., Bello, N., Becker, J., Zangeneh, T., (2015). Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with kidney transplant: a case report. *Open Forum Infect Dis*, 2(3), ofv104, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv104>

Salata, O.V., (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J nanobiotechnol*, 2(1), 3.

Sangruchi, T., Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., (1994). Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand. *Se Asian J Trop Med*, 25, 309.

Sanguan, S., Wannasan, A., Junkum, A., Jitpakdi, A., Riyong, D., Champakaew, D., Pitasawat, B., (2018). Screening for *in vitro* amoebicidal activity of plant essential oils against *Acanthamoeba* sp. *Chiang Mai Medical Journal*, 57(2), 89 - 98.

Santos, I.G., Scher, R., Rott, M.B., Menezes, L.R., Costa, E.V., Cavalcanti, S.C., Blank, A.F., Aguiar, J., da Silva, T.G., Dolabella, S.S., (2016). Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Parasitol Res*, 115, 535 - 540.

Santos-Magalhães, N.S., Furtado Mosqueira, V.C., (2010). Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Adv Drug Deliver Rev*, 62(4-5), 560 - 575.

Saunders, P.P., Proctor, E.M., Rollins, D.F., Richards, J.S., (1992). Enhanced killing of *Acanthamoeba* cysts *in vitro* using dimethylsulfoxide. *Ophthalmology*, 99(8), 1197 - 1200.

Sawyer, T., (1971). *Acanthamoeba griffini*, a new species of marine amoeba, *J Protozool*, 18, 650 - 654.

Saxena, A., Mittal, S., Burman, P., Garg, P., (2009). *Acanthameba* meningitis with successful outcome. *Indian J Pediatr*, 76(10), 1063.

Schuster, F.L., (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*, 15(3), 342 - 354.

Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*, 34, 1001 - 1027.

Schroeder, J.M., Booton, G., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markis, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J., (2001). Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*, 39, 1903 - 1911.

Seal, D., Hay, J., Kirkness, C., Morrell, A., Booth, A., Tullo, A., Armstrong, M., (1996). Successful medical therapy of *Acanthamoeba* keratitis with topical chlorhexidine and propamidine. *Eye*, 10(4), 413.

Seal, D.V., Kirkness, C.M., Bennett, H.G.B., Peterson, M., (1999). Population-based cohort study of microbial keratitis in Scotland: incidence and features. *Contact Lens Anterior*, 22(2), 49 - 57.

Seal, D.V., (2003). *Acanthamoeba* keratitis update—incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye*, 17(8), 893.

Sengor, T., Yuzbasioglu, E., Aydin-Kurna, S., Irkeç, M., Altun, A., Kökçen, K., Yalcin, N.G., (2017). Dacryoadenitis and extraocular muscle inflammation associated with contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: A case report and review of the literature. *Orbit*, 36, 43 - 47.

Sharifi, N., Botero-Kleiven, S., Öhman, D., Barragan, A., Winięcka-Krusnell, J., (2010). Genotypic characterization of *Acanthamoeba* spp. causing ocular infections in Swedish patients: identification of the T15 genotype in a case of protracted keratitis. *Scand J Infect Dis*, 42(10), 781 - 786.

Sharma, P.P., Gupta, P., Murali, M.V., Ramachandran, V.G., (1993). Primary amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba*: Successfully treated with cotrimoxazole. *Indian Pediatr*, 30, 1219 - 1219.

Sharma, S., Pasricha, G., Das, D., Aggarwal, R.K., (2004). *Acanthamoeba* Keratitis in Non-Contact Lens Wearers in India: DNA Typing-Based Validation and a Simple Detection Assay. *Arch Ophthalmol-chic*, 122(10), 1430 - 1434.

Sheng, W.H., Hung, C.C., Huang, H.H., Liang, S.Y., Cheng, Y.J., Ji, D.D., Chang, S.C., (2009). First case of granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*, 81(2), 277 - 279.

Shoff, M.E., Joslin, C.E., Tu, E.Y., Kubatko, L., Fuerst, P.A., (2008). Efficacy of contact lens systems against recent clinical and tap water *Acanthamoeba* isolates. *Cornea*, 27, 713 - 719.

Shukla, O.P., Kaul, S.M., Mehlotra, R.K., (1989). Development of improved media for axenic cultivation of *Acanthamoeba culbertsoni*, Singh and Das 1970. *Indian J Exp Biol*, 27, 785 - 791.

Shukla, O.P., Kaul, S.M., Mehlotra, R.K., (1990). Nutritional studies on *Acanthamoeba culbertsoni* and development of chemically defined medium. *J Protozool*, 37(3), 237 - 242.

Siddiqui, R., Khan, N.A., (2013). Infection control strategy by killing drug-resistant bacteria. *Pathog Glob Health*, 107, 215 - 216.

Siddiqui, R., Lakhundi, S., Khan, N.A., (2015). Status of the effectiveness of contact lens solutions against keratitis-causing pathogens. *Contact Lens Anterio*, 38, 34 - 38.

Siddiqui, R., Aqeel, Y., Khan, N.A., (2016a). The use of dimethyl sulfoxide in contact lens disinfectants is a potential preventative strategy against contracting *Acanthamoeba* keratitis. *Contact Lens Anterio*, 39, 389 - 393.

Siddiqui, R., Lakhundi, S., Iqbal, J., Khan, N.A., (2016b). Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on biological properties of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Exp Parasitol*, 168, 45 - 50.

Singhal, T., Bajpai, A., Kalra, V., Kabra, S.K., Samantaray, J.C., Satpathy, G., Gupta, A.K., (2001). Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. *Pediatr Infect Dis J*, 20(6), 623 - 627.

Slater, C.A., Sickel, J.Z., Visvesvara, G.S., Pabico, R.C., Gaspari, A.A., (1994). Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *N Engl J Med*, 331, 85 - 87.

Spanakos, G., Tzanetou, K., Miltsakakis, D., Patsoula, E., Malamou-Lada, E., Vakalis, N.C., (2006). Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece—report of a clinical isolate presenting T5 genotype. *Parasitol Int*, 55(2), 147 - 149.

Stahl, U., Willcox, M., Stapleton, F., (2012). Osmolality and tear film dynamics. *Clin Exp Optom*, 95(1), 3 - 11.

Stapleton, F., Keay, L., Edwards, K., Naduvilath, T., Dart, J.K.G., Brian, G., Holden, B.A., (2008). The incidence of contact lens related microbial keratitis, *Ophthalmology*, 115, 1655 - 1662.

Steinberg, J.P., Galindo, R.L., Kraus, E.S., Ghanem, K.G., (2002). Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. *Clin Infect Dis*, 35, E43 - E49.

Stevenson, R.W.W., Seal, D.V., (1998). Has the introduction of multi-purpose solutions contributed to a reduced incidence of *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearers?: a review. *Contact Lens Anterio*, 21(3), 89 - 92.

Stewart, M.J., Watson, I.D., (1983). Standard units for expressing drug concentrations in biological fluids. *Brit J Clin Pharmacol*, 16(1), 3 - 7.

Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Byers, T.J., (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol*, 45(1), 45 - 54.

Stratford, M.P., Griffiths, A.J., (1978). Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiology*, 108(1), 33 - 37.

Sunada, A., Kimura, K., Nishi, I., Toyokawa, M., Ueda, A., Sakata, T., Iwatani, Y., (2014). *In vitro* evaluations of topical agents to treat *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*, 121(10), 2059 - 2065.

Sütçü, M., Aktürk, H., Gülümser-Şişko, S., Acar, M., Erol, O. B., Somer, A., Salman, N., (2018). Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in an immunocompetent child. *Turkish J Pediatr*, 60(3), 340 - 343.

Szénási, Z., Endo, T., Yagita, K., Nagy, E., (1998). Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J Med Microbiol*, 47(1), 5 - 16.

Tan, J.H., Ng, E.Y.K., Acharya, U.R., Chee, C., (2009). Infrared thermography on ocular surface temperature: a review. *Infrared Phys Technol*, 52, 97 - 108.

Tan, S.K., Gajurel, K., Tung, C., Albers, G., Deresinski, S., Montoya, J.G., Ha, R., (2014). Fatal *Acanthamoeba* encephalitis in a patient with a total artificial heart (syncardia) device. *Open Forum Infect Dis*, 1 (2), ofu057. doi:10.1093/ofid/ofu057

Taneja, M., Ashar, J.N., Mathur, A., Nalamada, S., Garg, P., (2013). Microbial keratitis following vegetative matter injury. *Int Ophthalmol*, 33(2), 117 - 123.

Tepe, B., Malatyali, E., Degerli, S., Berk, S., (2012). *In vitro* amoebicidal activities of *Teucrium polium* and *T. chamaedrys* on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Parasitol Res*, 110, 1773 - 1778.

Thamtam, V.K., Uppin, M.S., Pyal, A., Kaul, S., Rani, J.Y., Sundaram, C., (2016). Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a newly diagnosed patient with systemic lupus erythematosus. *Neurol India*, 64(1), 101.

Timko, L., Fischer-Fodor, E., Garajova, M., Mrva, M., Chereches, G., Ondriska, F., Bukovsky, M., Lukac, M., Karlovská, J., Kubincova, J., Devinsky, F., (2015). Synthesis of structural analogues of hexadecylphosphocholine and their antineoplastic, antimicrobial and amoebicidal activity. *Eur J Med Chem*, 93, 263 - 273.

Todd, C.D., Reyes-Batlle, M., Piñero, J.E., Martínez-Carretero, E., Valladares, B., Streete, D., Lorenzo-Morales, J., Lindo, J.F., (2015). Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotypes in recreational and domestic water sources from Jamaica, West Indies. *J Water Health*, 13, 909 - 919.

Tu, E.Y., Joslin, C.E., Shoff, M.E., (2010). Successful treatment of chronic stromal *Acanthamoeba* keratitis with oral voriconazole monotherapy. *Cornea*, 29, 1066 - 1068.

Turner, N.A., Biagini, G.A., Lloyd, D., (1997). Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Lett*, 157(1), 149 - 153.

Tzanetou, K., Miltsakakis, D., Droutsas, D., Alimisi, S., Petropoulou, D., Ganteris, G., Dolapsaki, E., Markomichelakis, N., Mallias, I., Malamou-Lada., (2006). *Acanthamoeba* keratitis and contact lens disinfecting solutions. *Ophthalmologica*, 220, 238 - 241.

Ubelaker, J.E., Moore, M.B., Martin, J.H., Silveny, R., Dougherty, J.M., Meyer, D.R., McCulley, J.P., (1991). *In vitro* intercellular adherence of *Acanthamoeba castellanii*: a scanning and transmission electron microscopy study. *Cornea*, 10(4), 299 - 304.

Üstüntürk, M., Zeybek, Z., (2014). Amoebicidal efficacy of a novel multi-purpose disinfecting solution: first findings. *Exp Parasitol*, 145, S93 - S97.

Vaddavalli, P.K., Garg, P., Sharma, S., Sangwan, V.S., Rao, G.N., Thomas, R., (2011). Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*, 118(1), 29 - 35.

Vijay, A.K., Bandara, M., Zhu, H., Willcox, M.D., (2013). Protamine as a potential amoebicidal agent for contact lens disinfection. *Optom Vis Sci*, 90, 119 - 124.

Visvesvara, G.S., (1991). Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*, 13 (Supplement 5), S369 - S372.

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

Visvesvara, G.S., Sriram, R., Qvarnstrom, Y., Bandyopadhyay, K., Da Silva, A.J., Pieniazek, N., Cabral, G.A., (2009). *Paravahlkampfia francinae* n. sp masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *J Eukaryotic Microbiol*, 56 (4), 357 - 366.

Voshtina, E., Huang, H., Raj, R., Atallah, E., (2018). Amebic encephalitis in a patient with chronic lymphocytic leukemia on ibrutinib therapy. *Case Reports Hematology*, 2018, <https://doi.org/10.1155/2018/6514604>

Vunda, S.L., Sauter, I.P., Cibulski, S.P., Roehe, P.M., Bordignon, S.A., Rott, M.B., Apel, M.A., von Poser, G.L., (2012). Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitol Res*, 111, 961 - 966.

Wagner, C., Reyes-Batlle, M., Ysea, M.A.V., Pérez, M.V.G., de Rondón, C.G., Paduani, A.J.N., de Suárez, E.P., (2016). Genotyping of clinical isolates of *Acanthamoeba* genus in Venezuela. *Acta Parasitol*, 61(4), 796 - 801.

Walochnik, J., Obwaller, A., Aspöck, H., (2000). Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microb*, 66(10), 4408 - 4413.

Walochnik, J., Scheikla, U., Haller-Schoberb, E.M., (2014). Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J Eukar Microb*, 62, 3 - 11.

Walton, S.F., Myerscough, M.R., Currie, B.J., (2000). Studies *in vitro* on the relative efficacy of current acaricides for *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*. *T Roy Soc Trop Med H*, 94(1), 92 - 96.

Wara-Asawapati, S., Intapan, P.M., Chotmongkol, V., (2017). *Acanthamoeba* brain abscess confirmed by molecular identification. *Am J Trop Med Hyg*, 97(2), 307.

Webster, D., Umar, I., Kolyvas, G., Bilbao, J., Guiot, M.C., Duplisea, K., Visvesvara, G.S., (2012). Treatment of granulomatous amoebic encephalitis with voriconazole and miltefosine in an immunocompetent soldier. *Am J Trop Med Hyg*, 87(4), 715 - 718.

Weekers, P.H.H., Wijen, J.P.H., Lomans, B.P., Vogels, G.D., (1996). Axenic mass cultivation of the free-living soil amoeba, *Acanthamoeba castellanii* in a laboratory fermentor. *A Van Leeuw J Microb*, 69, 317 - 322.

Wiley, C.A., Safrin, R.E., Davis, C.E., Lampert, P.W., Braude, A.I., Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., (1987). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with AIDS. *J Infect Dis*, 155(1), 130 - 133.

Winck, M.A.T., Caumo, K., Rott, M.B., (2011). Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol*, 63(5), 464.

Woese, C.R., Fox, G.E., (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5088 - 5090.

Wong, K.K., Liu, X., (2010). Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *Med Chem Comm*, 1(2), 125 - 131.

Yagita, K., Endo, T., (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J Protozool*, 37, 570 - 575.



Yera, H., Zamfir, O., Bourcier, T., Ancelle, T., Batellier L., Dupouy-Camet, J., Chaumeil, C., (2006). Comparison of PCR, microscopy examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26, 221 - 224.

Yera, H., Zamfir, O., Bourcier, T., Viscogliosi, E., Noël, C., Dupouy-Camet, J., Chaumeil, C., (2008). The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. *British J Ophthalmology*, 92(8), 1139 - 1141.

Yim, B., Park, J.H., Jeong, H., Hong, J., Kim, M., Chang, M., Park, C.Y., (2018). Effect of nitric oxide on *Acanthamoeba castellanii*. *Invest Ophth Vis Sci*, 59(8), 3239 - 3248.

Zamora, A., Henderson, H., Swiatlo, E., (2014). *Acanthamoeba* encephalitis: a case report and review of therapy. *Surg Neurol Int*, 5, 68.

Zantl, N., Weirich, G., Zall, H., Seiffert, B.M., Fischer, S.F., Kirschnek, S., Häcker, G., (2007). Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene*, 26(49), 7038.

Zhang, B., Pulinthanathu, R., (2016). *Acanthamoeba* encephalitis and skin infection in a patient with renal transplantation. *Am J Clin Pathol*, 146(Suppl 1), 279.

Zhang, Y., Sun, X., Wang, Z., Li, R., Luo, S., Jin, X., Chen, W., (2004). Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in North China. *Invest Ophth Vis Sci*, 45(6), 1904 - 1907.

Zhao, G., Sun, S., Zhao, J., Xie, L., (2010). Genotyping of *Acanthamoeba* isolates and clinical characteristics of patients with *Acanthamoeba* keratitis in China. *J Med Microbiol*, 59(4), 462 - 466.

Zimmermann, A.B., Nixon, A.D., Rueff, E.M., (2016). Contact lens associated microbial keratitis: practical considerations for the optometrist. *Clin Optom*, 8, 1 - 12.

Anexos







## Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in Spain

T. Martín-Pérez<sup>a,\*</sup>, A. Criado-Fornelio<sup>a</sup>, J. Martínez<sup>a</sup>, M.A. Blanco<sup>b</sup>, I. Fuentes<sup>c</sup>,  
J. Pérez-Serrano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Laboratorio de Parasitología, Grupo ECOMYP, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

<sup>c</sup>Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Ciencias de la Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo km 2, 28224 Majadahonda, Madrid, Spain

Received 8 March 2017; received in revised form 23 June 2017; accepted 28 June 2017

### Abstract

In order to improve our knowledge on the epidemiology of amoebic keratitis, as well as the identification of *Acanthamoeba* isolates, we have isolated *Acanthamoeba* spp. from five symptomatic patients in Spain in the present study. All isolates were grown in axenic liquid medium, with only one exception. The morphology of these isolates were characterized by optical and scanning electron microscopy. Their structural features corresponded to those of amphizoic amoebae (namely *Acanthamoeba* spp.). The molecular characterization of the five *Acanthamoeba* isolates yielded six sequences. Almost complete 18S rRNA gene sequences (>2000 bp) were obtained from three isolates and partial sequences (~1500 bp) from the other two. A robust phylogenetic analysis based on the almost complete 18S rRNA sequence showed that four isolates belonged to the T4 genotype and the other one to the T3 genotype. However, all isolates were identified as T4 genotype using the ASA.S1 fragment. As previously suggested by other researchers, only a robust phylogenetic approach may be helpful in identifying *Acanthamoeba* genotypes. In addition, new data on the phylogenetic relationships among the *Acanthamoeba* genotypes is provided and discussed.

© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** 18S rRNA gene; *Acanthamoeba*; Clinical isolates; Genotypes; Phylogeny

### Introduction

*Acanthamoeba* keratitis (AK) is a rare disease which presents as a corneal inflammation and is caused by the infection of different species of *Acanthamoeba*. The genus *Acanthamoeba* belongs to the group named free-living amoebae (FLA), which includes also other important genera, such as *Balamuthia* and *Naegleria*. These organisms are environmentally wide spread (Martinez and Visvesvara 1997). Some amoebic isolates are pathogens, occasionally causing AK and granulomatous amoebic encephalitis (GAE), an infection of the central nervous system. The incidence of the former illness (AK) is increasing due to the growing numbers of contact lens wearers and to improvements in diagnostic methods (Hereadero-Bermejo et al. 2013a). In con-

\*Corresponding author.

E-mail address: [tania.martinp@gmail.com](mailto:tania.martinp@gmail.com) (T. Martín-Pérez).

trast to GAE, AK occurs in immunocompetent individuals. The current diagnostic procedure is based on the isolation and culture of the protozoa, followed by identification of the 18S rRNA gene by amplification and sequencing (Gast et al. 1996; Stothard et al. 1998). Later, Schroeder et al. (2001) studied molecular diagnosis targets in the diverse *Acanthamoeba* isolates and designed different primer pairs, one which amplifies the GTSA.B1 region (~1500 bp) and other that amplifies the ASA.S1 (~500 bp), which contains the shorter DF3 region. Since then, there had been no consensus on which part of the gene is the most convenient for identification: some researchers have been identifying the isolates with the GTSA.B1 region, while many more have used the short ASA.S1 fragment. Unfortunately, the latter seems to be unreliable for identification (Corsaro and Venditti 2010; Corsaro et al. 2015) and the GTSA.B1 region must be analyzed instead. In agreement with this idea, Fuerst et al. (2015), has recently indicated that the best approach to determine the amoeba genotype is to study the complete 18S rRNA gene. In Spain, several cases of AK have been reported (Arnalich-Montiel et al. 2012; Arnalich-Montiel et al. 2014; Lorenzo-Morales et al. 2011) and only one of GAE (Seijo-Martinez et al. 2000), but genetic identification was not based on the sequence of the complete small ribosomal subunit gene. Most of the isolates from Spain and other Mediterranean countries belonged to T4 genotype (Gatti et al. 2010; Ozkoc et al. 2008). However, other seven genotypes (T2, T3, T4, T5, T6, T11 and T15) have been associated with AK in diverse parts of Europe (Heredero-Bermejo et al. 2015; Maghsood et al. 2005; Rislér et al. 2013; Spanakos et al. 2006). Proper identification of *Acanthamoeba* genotypes is important because it may influence the outcome of the treatment (Heredero-Bermejo et al. 2013b; Lorenzo-Morales et al. 2013). Therefore, in the present study, we have isolated protozoan organisms from five symptomatic patients in Spain. Isolates were morphologically characterized by optical and scanning electron microscopy and molecularly characterized based on the 18S rRNA gene sequence. In addition, a robust phylogenetic analysis constructed with 106 almost complete sequences previously identified at the genotype level (*Acanthamoeba* program, <http://u.osu.edu/acanthamoeba/>) allow us to discuss the relationships between *Acanthamoeba* genotypes.

## Material and Methods

### Isolation and culture of *Acanthamoeba*

A total of 5 clinical isolates from symptomatic human patients were preliminarily analyzed by the Parasitology Service of the Instituto de Salud Pública Carlos III (ISC III) and later sent to the Department of Biomedicine and Biotechnology at the Universidad de Alcalá (UAH) for further characterization. Only two of the isolates of *Acanthamoeba* came from contact lens users (ISCIU-UAH 64/13 and ISCIU-

UAH 66/14). In the ISCIU, amoebae isolation was carried out and a preliminary identification was done by culture and amplification of the ASA.S1 region. In the Parasitology Laboratory (UAH), amoebae were individually cloned by transferring a single trophozoite or cyst to non-nutrient agar plates, covered with heat-killed *Escherichia coli* and incubated at 25, 32 or 37 °C. The individual cloning step was repeated when DNA analysis showed mixed sequences, in order to ensure that the double peaks in the chromatograms were not due to a contamination of different strains but to heterozygosity of the gene. Ten isolated trophozoites or cysts of 3 different plates were placed onto non-nutrient agar plates with inactivated *E. coli*. From these plates, individual cloning was performed in triplicate.

Optimal amoebic growth was determined by measuring the speed of expansion of the trophozoite or cyst, the one which expanded faster to the periphery of the plate dish was the optimal temperature. Finally, the isolates were grown in axenic cultures using either CERVA or PYG supplemented with 2% of bactocastone (Cerva 1969; Heredero-Bermejo et al. 2012). For isolates unable to grow under such conditions, five alternative media were tested as well: Brain–Heart Infusion (BHI) (Scharlau) (Heredero-Bermejo et al. 2012), Nutrient Mixture F-10 (HAM) (Sigma) (Ham, 1963), Grave's Insect Medium (Sigma–Aldrich) (Sant'Anna et al. 2009), Dubelcco's modified eagle's medium (DMEM) (Sigma–Aldrich) (Khan, 2001) and Tryptic Soy Broth (TSY) (Scharlau) (Horn et al. 1999).

### Encystment

Cysts were obtained from confluent trophozoites layer cultures using Neff's medium as proposed by Bowers and Korn (1969).

### Morphological study

Identification of amoeba species was mainly achieved based on temperature tolerance, presence of lobopods or filopods, cyst size and number of opercula observed by light and scanning electron microscopy. Morphologic features were measured in microphotographs obtained in a Motic BA300 microscope equipped with a digital camera and employing the Motic Images Plus software version 2.0. Measurements are indicated as the mean  $\pm$  standard deviation (in  $\mu\text{m}$ ) for 15 protozoa specimens.

For scanning electron microscopy, the samples were processed as previously described (Heredero-Bermejo et al. 2015).

### Amplifying and sequencing of the 18S rRNA gene

Whole trophozoite DNA was isolated with the DNeasy Blood and tissue kit (Mobio, Carlsbad, CA, USA). The 18S

**Table 1.** Results of the study on the growth of *Acanthamoeba* isolates in different culture media at different temperatures (25, 32 or 37 °C).

Culture medium	ISCIU-UAH 64/13			ISCIU-UAH 85/13			ISCIU-UAH 66/14			ISCIU-UAH 161/15			ISCIU-UAH 163/15		
	Temperature			Temperature			Temperature			Temperature			Temperature		
	25	32	37	25	32	37	25	32	37	25	32	37	25	32	37
CERVA	+	+++	–	+	+++	–	–	–	–	+	+++	–	–	–	–
PYG + B	+	+	–	+	+	–	–	–	–	+	+	–	+	+++	–
BHI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	–	–	–	–	ND	ND	ND	ND	ND
HAM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	–	–	–	–	ND	ND	ND	ND	ND
GRACE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	–	–	–	–	ND	ND	ND	ND	ND
DMEM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	–	–	–	–	ND	ND	ND	ND	ND
TSY	ND	ND	ND	ND	ND	ND	–	–	–	–	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not done.

rRNA gene was partially amplified using three different sets of primers: CRN5-1137, JDP1-JDP2 (Schroeder et al. 2001) and E528F-1492R (Edgcomb et al. 2002). PCR reactions were performed as described by Schroeder et al. (2001) and Edgcomb et al. (2002). The amplified products were visualized by 2% agarose gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining. The bands of interest were purified with the Ultra Clean 15 DNA purification (Mobio, Carlsbad, CA, USA). Purified DNA fragments were sequenced on an ABI 3130 automated sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Three fragments (obtained in different PCR amplifications) were sequenced for the sake of consistency. In cases where chromatograms showed mixed sequences, fragments were molecularly cloned with the help of the NZY-A PCR cloning kit (NZY, Lisboa, Portugal), following manufacturer's instructions. Plasmid DNA was purified with the Mini Plasmid Prep kit (MOBIO, California, USA). Sequence data were processed with the BioEdit 5.0.9 sequence editor (Hall 1999).

## Phylogenetic analysis

The six DNA sequences (18S rRNA) obtained in the present study were aligned together with 106 other nearly complete sequences that were previously classified based on the genotype classification system implemented by the Ohio State University (*Acanthamoeba* program, <http://u.osu.edu/acanthamoeba/>). The alignment was performed using the algorithm MSAProbs (Liu et al. 2010). Later, MSAProbs alignment was evaluated using the transitive consistency score (TCS) and a weighted multiple sequence alignment (MSA) was generated (Chang et al. 2014). The weighted MSA contained 26,644 positions and 113 sequences. The substitution model GTR+I+G was selected using jModelTest 2.1.4 (Darriba et al. 2012) to perform the Bayesian analysis. This analysis consisted of two runs of four chains each, with 31,751,000 generations per run. Data was collected from each 1000 generations, but 25% of the samples (i.e., 7,937,750 generations) were discarded. Thus, the consensus tree was obtained from 23,814

trees. The parameter “temp” was fixed to 0.05 and the final standard deviation of the split frequencies was lower than 0.01. In addition, the alignment was also analyzed using a maximum likelihood inference (PhyML program; Guindon et al. 2010), using the same substitution model mentioned above. The subtree pruning and regrafting (SPR) and the nearest neighbor interchange (NNI) tree rearrangement options were selected, and a Bayesian-like transformation of aLRT (aBayes) was used to obtain the clade support (Anisimova et al. 2011). Both trees were rooted with the sister taxon *Balamuthia mandrillaris*.

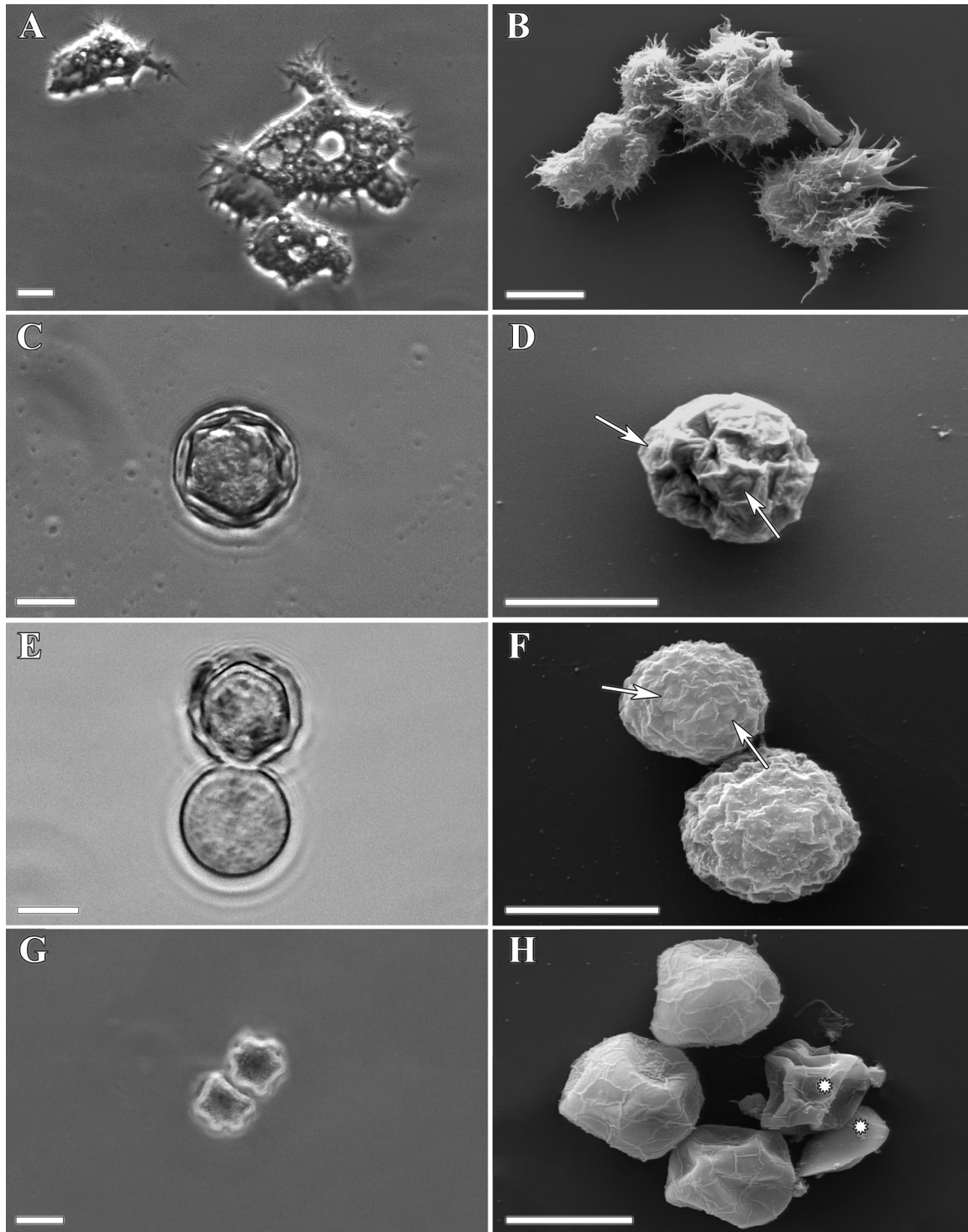
## Results

### Culture of *Acanthamoeba*

Once the five amoebic isolates were individually cloned, their thermal tolerance was studied (Table 1). All of the isolated organisms were able to grow at 25 and 32 °C in liquid media, except the isolate ISCIU-UAH 66/14, which only grew in agar plates seeded with heat-killed *E. coli* at 37 °C. The optimal growth temperature for the isolates ISCIU-UAH 63/13, 85/13, 161/15 and 163/15 was 32 °C. The best medium, leading to optimal amoebic growth, was CERVA, albeit the isolate ISCIU-UAH 163/15 grew only in PYG + bactocasitone.

### Morphological study

Observations performed by light microscopy showed that the trophozoites presented an irregular shape and numerous acanthopodia, which were evident on the amoeba surface as well when observed by SEM (Fig. 1a–b). Trophozoite's average lengths are shown in Table 2. Only amoebic cysts could be studied in the isolate ISCIU-UAH 66/14 because of its inability to grow in liquid media. Based on cyst morphology criteria, the five isolates were identified as members of the morphological group II, albeit the size and aspect of the different resistance stages were to some extent variable. In



**Fig. 1.** (a) Phase-contrast micrographs of ISCIU-UAH 64/13 trophozoites. (b) ISCIU-UAH 85/13 trophozoites as observed by SEM. Note the presence of abundant acanthopodia. (c) ISCIU-UAH 64/13 cyst as seen by light microscopy. Note the double-walled structure with polygonal endocyst and a thin, wrinkled exocyst. (d) ISCIU-UAH 64/13 cyst observed by SEM. The exocyst is roughly spherical, with wrinkled surface. One operculum is visible and marked with an arrow. (e) ISCIU-UAH 85/13 immature and mature cysts seen by light microscopy. The mature cyst has a polygonal endocyst and thick, wavy exocyst. The exocyst and endocyst of the immature cyst are both smooth and spherical. (f) ISCIU-UAH 85/13 cysts observed by SEM. The exocyst has a very wrinkled surface. Some opercula are visible. (g) Phase-contrast micrograph of ISCIU-UAH 66/14 cysts. Note the star-like endocyst. (h) ISCIU-UAH 163/15 cyst seen by SEM. Some of the cyst are collapsed (marked with an asterisk), but the rest show a polygonal surface. The scale bar is 5  $\mu\text{m}$ .

**Table 2.** Results of the measurements (average length  $\pm$  standard deviation in  $\mu\text{m}$ ) of trophozoites and cysts.

Strains' name	Trophozoite	Cyst
<i>Acanthamoeba</i> ISCIII-UAH 64/13	15.88 $\pm$ 5.08	9.34 $\pm$ 2.34
<i>Acanthamoeba</i> ISCIII-UAH 85/13	12.21 $\pm$ 3.08	8.52 $\pm$ 1.76
<i>Acanthamoeba</i> ISCIII-UAH 66/14	NV	4.93 $\pm$ 0.81
<i>Acanthamoeba</i> ISCIII-UAH 161/15	17.17 $\pm$ 4.15	8.03 $\pm$ 1.30
<i>Acanthamoeba</i> ISCIII-UAH 163/15	15.27 $\pm$ 2.81	8.12 $\pm$ 2.12

NV: not viable.

the isolate ISCIII-UAH 63/13, cysts had a star-like endocyst, with 5–6 arms, unlike the exocyst, which showed a thin, wrinkled spherical layer (Fig. 1c–d). The isolate ISCIII-UAH 85/13 showed cysts with a polygonal endocyst, while the exocyst was thick and spherical, with a rough surface (Fig. 1e–f). The resistant stage of the isolate ISCIII-UAH 66/14 presented a star-like endocyst with 5–6 arms, while the exocyst was of irregular spherical shape (Fig. 1g). Cysts of ISCIII-UAH 161/15 were usually polygonal, with a very thick exocyst showing a wrinkled surface. They were very similar to those of ISCIII-UAH 85/13. In the isolate ISCIII-UAH 163/15, the cysts presented an exocyst with a thick and wrinkled wall, while the endocyst was irregular in shape (Fig. 1h). The average cyst diameter is shown in Table 2.

### Sequencing of the 18S rRNA gene and phylogenetic analysis

A preliminary identification of the ASA.S1 region of the 18S rRNA gene by amplification and sequencing was carried out. Based on this information, the five isolates were tentatively identified as *Acanthamoeba* sp. T4. Further molecular and phylogenetic analyses based on the almost complete 18S rRNA sequence led to a definitive identification of the amoebic isolates. Sequencing of the 18S rRNA gene in most isolates returned univocal readings, with the exception of ISCIII-UAH 163/15, where the fragment obtained by amplification with primers CRN5-1137 had to be molecularly cloned in order to obtain unambiguous sequences (namely, 2 different clones, identified as “a” and “b”).

The phylogenetic tree based on the almost complete 18S rRNA showed that the sequences from isolates ISCIII-UAH64/13 (KY072778) and ISCIII-UAH163/15 (KY072782 and KY072783) grouped together with members of the genotype T4B, whereas the sequences obtained from ISCIII-UAH85/13 (KY072780) and ISCIII-UAH66/14 (KY072779) isolates belong to the genotypes T4A and T3, respectively (Fig. 2). Finally, the sequence from ISCIII-UAH161/15 (KY072781) isolate does not group with any of the T4 subclades, although it is phylogenetically close to the subclades T4neff and T4B (Fig. 2).

The phylogenetic analysis clearly resolved the relationships among *Acanthamoeba* genotypes. In this sense, four main monophyletic clades were identified (Fig. 2). On the one hand, the monophyletic group constituted by the geno-

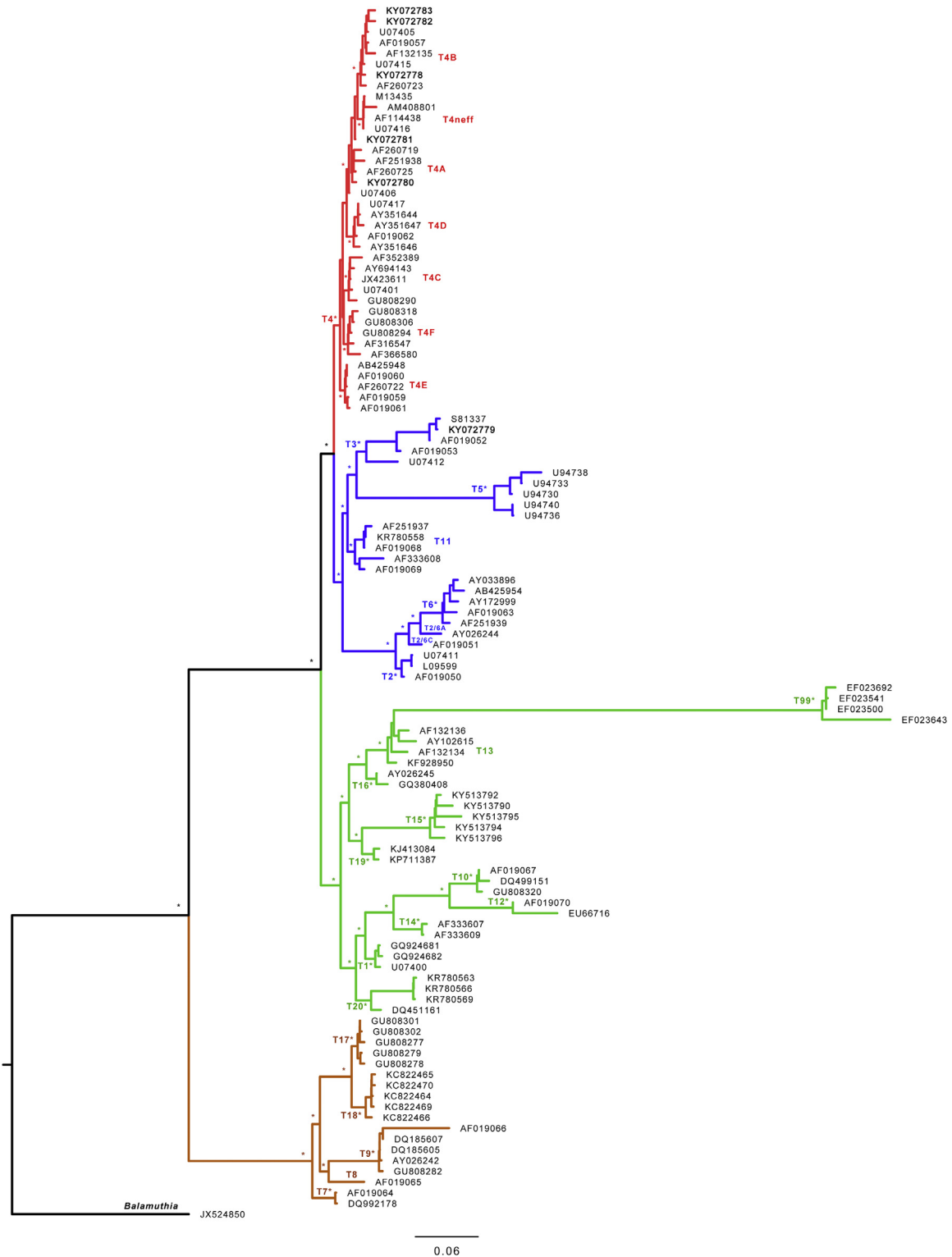
types T2, T3, T5, T11, T6 is a sister clade to the group T4. On the other hand, the group formed by the genotypes T10, T12, T14, T1, T20, T13, T16, T99 and T19 is a sister clade to the previous groups. The fourth monophyletic group is basal and formed by the genotypes T7, T8, T9, T17 and T18. Besides, it is possible to establish subclades within the monophyletic groups. For example, the genotypes T3, T5 and T11 form a sister clade to the genotypes T6 and T2 or the genotypes T10, T12, T14, T1 and T20 form a sister clade to the genotypes T13, T16, T99 and T19.

### Discussion

In the present study, the five individually cloned strains were able to grow in agar plates, but in order to undertake further studies it was necessary to culture amoebae in axenic liquid media. Our individually cloned strains were able to grow in PYG+bactocastone and CERVA except the isolate ISCIII-UAH 66/14. For this reason, we tried to grow the latter in other media, but unfortunately these attempts were unsuccessful. However, previous cultivation of pathogenic *Acanthamoeba* isolates in CERVA medium was achieved in our laboratory (Heredero-Bermejo et al. 2015). Indeed, fastidious amoeba strains have been already reported by other authors (De Jonckheere 1980; Hiti et al. 2001; Nagyvó et al. 2010). On the other hand, some morphological traits were useful to define the clinical isolates as members of *Acanthamoeba* spp.: the presence of double-walled cysts and filopods (Page 1967). Moreover, SEM observations confirmed high numbers of acanthopodia in amoeba surface, which is indicative of pathogenicity (Heredero-Bermejo et al. 2015; Khan 2001).

The size of the amplicons used in phylogenetic analyses of the 18S rRNA gene is essential to achieve a proper amoeba isolate identification. In this sense, the fragment ASA.S1 (~500 bp) or the fragment GTSA.B1 (~1,500 bp fragment; Schroeder et al. 2001) have been frequently used for the identification of *Acanthamoeba* isolates, but the phylogenies obtained are not consistent with those obtained using the almost complete 18S rRNA gene (Chan et al. 2011; Corsaro et al. 2015; Fuerst et al. 2015; Kong 2009; Nuprasert et al. 2010). Therefore, this sequencing strategy is ideal for a correct molecular identification as proposed by Gast et al. (1996). At present, the genus is divided into 20 genotypes,





**Fig. 2.** Phylogenetic tree derived from Bayesian inference using the GTR+I+G substitution model. The tree was rooted with the sister taxon *Balamuthia mandrillaris*. Asterisks indicate support values between 99% and 100% in both Bayesian and maximum-likelihood (ML) inference. The ML inference was performed in PhyML using the GTR+I+G substitution model. Bayesian-like transformation of aLRT (aBayes) was used to obtain the clade support. *Acanthamoeba* genotypes are indicated on the branches. Support values within genotype clades are not shown. Sequences that were obtained in the present study are in bold.

according to a recent proposal (*Acanthamoeba* program, <http://u.osu.edu/acanthamoeba/>; Fuerst et al. (2015)).

In the present study, phylogenetic analysis coherently grouped *Acanthamoeba* sequences by the current genotype classification system implemented by the Ohio State University (*Acanthamoeba* program, <http://u.osu.edu/acanthamoeba/>). In this sense, five sequences could be assigned to genotype T4 (three of them to the subtype T4B, one of them to the subtype T4A and the fifth was phylogenetically close to the subtypes T4B/T4neff) and the sixth sequence was grouped together with other sequences belonging to genotype T3. However, the identification obtained using the fragment ASA.S1 indicated that all the isolates should be classified as genotype T4. Thus, misidentification caused by sequencing of short amplicons could have serious clinical consequences since Arnalich-Montiel et al. (2014) pointed out that non-T4 genotypes had a worse response to medical therapy than isolates belonging to genotype T4.

In this study we found some allelic divergence in *Acanthamoeba* sp., in agreement with previous results by other authors (Booton et al. 2002; Stothard et al. 1998; Qvarnstrom et al. 2013). In fact, limited genetic variability seems to be typical of diverse amoebae (including *Acanthamoeba*). Organisms that reproduce asexually may accumulate harmful mutations. The solution is a strategy based on polyploidy and homologous recombination, which leads to a moderate to low allelic divergence (Maciver 2016).

Phylogenies based on single genes can be incorrect (Maddison and Knowles 2006; Townsend and Lopez-Giraldez 2010). However, the use of multiple genes is not enough to resolve phylogenetic inconsistencies (Philippe et al. 2011). Some authors suggest that the use of representative genes within each group of species could be the more efficient way (in cost/benefit terms) to resolve phylogenies (Horreo 2012). In this sense, we would like to highlight that, in the present study, the *Acanthamoeba* genotypes were coherently grouped and the phylogenetic relationships among genotypes were clearly resolved. Therefore, the use of the 18S rRNA gene as representative to perform phylogenies within this genus is fully justified.

Relative to the phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* genotypes, we demonstrated that some of them are coherent with those described in previous studies, but others are not. Among similarities, the clade formed by the genotypes T17, T18, T7, T8 and T9 (i.e., the morphological group I; see Corsaro et al. 2017; Fuerst 2014) present a basal position on the phylogenetic tree. Some genotypes are closely related in the present and previous studies (e.g., clade T10/T12/T14 or T2/T6 or T13/T16 or T1/T20; see Corsaro et al. 2017; Fuerst 2014). Among dissimilarities, the clade T2/T6 was reported as a sister group to the clade T12/T10/T14 (Fuerst et al. 2015). However, in the present study the clade T2/T6 is closely related to the genotypes T3, T11 and T5. On the contrary, the clade T12/T10/T14 formed a monophyletic group together with the genotypes T1 and

T20. This relationship was previously found by other authors (Corsaro et al. 2017), although with lower statistical support. As in the present study, these authors also confirmed the close relationship between the genotypes T15 and T19. In addition, the genotype T99 whose phylogenetic relationship is unknown (Fuerst et al. 2015) forms a monophyletic group together with the genotypes T13, T16 and T19. These differences could probably be due to the number and length of the sequences used in the alignments, the methodology used to perform alignments and/or the method used to perform the phylogenetic inference. However, the identical topology achieved using ML and Bayesian inferences suggest that the selection of sequences and the alignment methodology are more important.

## Conclusions

The finding of new axenic culture media to facilitate the growth of fastidious strains is essential. Also, it is necessary to establish the identification of amoebic strains using phylogenetic analysis based on an almost complete 18S rRNA gene. In this sense, the phylogenetic analysis showed that (i) the clade formed by genotypes T6/T2 is a sister group to genotypes T3, T5 and T11, (ii) genotypes T1, T20, T10, T12 and T14 form a monophyletic clade, (iii) genotypes T15 and T19 form a monophyletic clade and (iv) genotype T99 are phylogenetically close to genotypes T13, T16 and T19.

## Acknowledgements

This work has been supported by grants from MINECO CTQ-2014-54004-P and Universidad de Alcalá CCG2016/BIO-023.

We wish to thank Antonio Priego and Mr José Antonio Pérez (Microscopy Unit – CAI Medicina y Biología de la Universidad de Alcalá) for assistance with scanning electron microscopy and Ángel Pueblas (Photography Unit – CAI Medicina y Biología de la Universidad de Alcalá) for expert help with photographic work.

## References

- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J.F., Dessimoz, C., Gascuel, O., 2011. Survey of branch support methods demonstrates accuracy power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Syst. Biol.* 60, 685–699.
- Arnalich-Montiel, F., Almendral, A., Arnalich, F., Valladares, B., Lorenzo-Morales, J., 2012. Mixed *Acanthamoeba* and multi-drug resistant *Achromobacter xyloxidans* in late-onset keratitis after laser in situ keratomileusis. *J. Cataract. Refract. Surg.* 38, 1853–1856, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2012.08.022>.
- Arnalich-Montiel, F., Lumbreras-Fernández, B., Martín-Navarro, C.M., Valladares, B., Lopez-Velez, R., Morcillo-Laiz, R., Lorenzo-Morales, J., 2014. Influence of *Acanthamoeba* geno-

- type on clinical course and outcomes for patients with *Acanthamoeba* keratitis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1213–1216, <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00031-14>.
- Booton, G.C., Kelly, D.J., Chu, Y.W., Seal, D.V., Houang, E., Lam, D.S.C., Byers, T.J., Fuerst, P.A., 2002. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1621–1625.
- Bowers, B., Korn, E.D., 1969. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain) II. Encystment. *J. Cell. Biol.* 41, 786–805.
- Cerva, L., 1969. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science* 163, 576.
- 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 Trop.* 117, 23–30.
- Chang, J.M., Di Tommaso, P., Notredame, C., 2014. TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1625–1637.
- Corsaro, D., Venditti, D., 2010. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol. Res.* 107, 233–238.
- 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). *Parasitol. Res.* 114, 2481–2490.
- Corsaro, D., Köhler, M., Di Filippo, M.M., Venditti, D., Monno, R., Di Cave, D., Walochnik, J., 2017. Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol. Res.* 116, 1273–1284.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772.
- De Jonckheere, J.F., 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 681–685.
- Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Teske, A., de Vera, G.A., Sogin, M.L., 2002. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7658–7662.
- Fuerst, P.A., 2014. Insights from the DNA databases: approaches to the phylogenetic structure of *Acanthamoeba*. *Exp. Parasitol.* 145, S39–S45.
- Fuerst, P.A., Booton, G.C., Crary, M., 2015. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62, 69–84.
- Gast, R.J., Ledee, D.R., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 498–504.
- Gatti, S., Rama, P., Matuska, S., Berrilli, F., Cavallero, A., Carletti, S., Bruno, A., Maserati, R., Di Cave, D., 2010. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. *J. Med. Microbiol.* 59, 1324–1330, <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.019786-0>.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Ham, R.G., 1963. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp. Cell. Res.* 29, 515–526.
- Hereder-Bermejo, I., San Juan Martín, C., Soliveri de Carranza, J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., 2012. *Acanthamoeba castellanii*: in vitro UAH-T17c3 trophozoite growth study in different culture media. *Parasitol. Res.* 110, 2563–2567.
- Hereder-Bermejo, I., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., Gómez, R., De La Mata, F.J., Pérez-Serrano, J., 2013a. In vitro comparative assessment of different viability assays in *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Parasitol. Res.* 112, 4087–4095.
- Hereder-Bermejo, I., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., García-Gallego, S., Rasines, B., Gómez, R., de la Mata, F.J., Pérez-Serrano, J., 2013b. In vitro evaluation of the effectiveness of new water-stable cationic carbosilane dendrimers against *Acanthamoeba castellanii* UAH-T17c3 trophozoites. *Parasitol. Res.* 112, 961–969.
- Hereder-Bermejo, I., Criado-Fornelio, A., De Fuentes, I., Soliveri, J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., 2015. Characterization of a human-pathogenic *Acanthamoeba griffini* isolated from a contact lens-wearing keratitis patient in Spain. *Parasitology* 142, 363–373.
- Hiti, K., Walochnik, J., Faschinger, C., Haller-Schober, E.M., Aspöck, H., 2001. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea* 20, 467–470.
- Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ. Microbiol.* 1, 357–367.
- Horreo, J.L., 2012. ‘Representative Genes’, is it OK to use a small amount of data to obtain a phylogeny that is at least close to the true tree? *J. Evol. Biol.* 25, 2661–2664.
- Khan, N.A., 2001. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr. Microbiol.* 43, 391–395.
- Kong, H.H., 2009. Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean. J. Parasitol.* 47, <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2009.47.s.21>.
- Liu, Y., Schmidt, B., Maskell, D.L., 2010. MSAProbs: multiple sequence alignment based on pair hidden Markov models and partition function posterior probabilities. *Bioinformatics* 26, 1958–1964.
- Lorenzo-Morales, J., Morcillo-Laiz, R., Martín-Navarro, C.M., López-Vélez, R., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Maciver, S.K., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., 2011. *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain. *Cont. Lens Anterior Eye* 34, 83–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2010.10.007>.
- 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 Parasitol.* 29, 181–187.
- Maciver, S.K., 2016. Asexual amoebae escape Muller’s ratchet through polyploidy. *Trends Parasitol.* 32, 855–862.
- Maddison, W.P., Knowles, L.L., 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Syst. Biol.* 55, 21–30.
- 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. *J. Med. Microbiol.* 54, 755–759.
- Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7, 583–598.
- Nagyová, V., Nagy, A., Timko, J., 2010. Morphological, physiological and molecular biological characterization of isolates from first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. *Parasitol. Res.* 106, 861–872.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4636–4640.
- Ozkoc, S., Tuncay, S., Delibas, S.B., Akisu, C., Ozbek, Z., Durak, I., Walochnik, J., 2008. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. *J. Med. Microbiol.* 57, 392–396. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47650-0>.
- Page, F.C., 1967. Re-Definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.* 14 (4), 709–724.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D.V., Littlewood, D.T.J., Manuel, M., Wörheide, G., Baurain, D., 2011. Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. *PLoS Biol.* 9 (3), e1000602.
- 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. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 626–633.
- Risler, A., Coupat-Goutaland, B., Pélandakis, M., 2013. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Parasitol. Res.* 112, 3807–3816. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3572-3>.
- Sant’Anna, M.R., Diaz-Albiter, H., Mubarak, M., Dillon, R.J., Bates, P.A., 2009. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasit. Vectors* 2, 62.
- Schroeder, J.M., Booton, G., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markis, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 2001. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1903–1911. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.5>.
- Seijo-Martinez, M., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., Rodriguez De Lope, A., Diz, J., Conde, C., Visvesvara, G.S., 2000. Granulomatous amoebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3892–3895.
- Spanakos, G., Tzanetou, K., Miltsakakis, D., Patsoula, E., 2006. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece—report of a clinical isolate presenting T5 genotype. *Parasitol. Int.* 55, 147–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2005.12.001>.
- Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 45–54.
- Townsend, J.P., Lopez-Giraldez, F., 2010. Optimal selection of gene and ingroup taxon sampling for resolving phylogenetic relationships. *Syst. Biol.* 59, 446–457.





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

European Journal of Protistology 64 (2018) 91–102

European Journal of  
PROTISTOLOGY

[www.elsevier.com/locate/ejop](http://www.elsevier.com/locate/ejop)

## Development and optimization of new culture media for *Acanthamoeba* spp. (Protozoa: Amoebozoa)

Tania Martín-Pérez<sup>a,\*</sup>, Angel Criado-Fornelio<sup>a</sup>, Manuel Ávila-Blanco<sup>a,b</sup>, Jorge Pérez-Serrano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Laboratorio de Parasitología, Grupo ECOMYP, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Laboratorio de ciencias morfológicas, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Ags., México

Received 10 November 2017; received in revised form 4 April 2018; accepted 6 April 2018  
Available online 12 April 2018

### Abstract

The isolation and growth in axenic liquid media of *Acanthamoeba* strains is necessary in order to carry out primary in vitro drug screening. Amoebic isolates which are hard to grow in the current liquid media have been reported. Such circumstances hampers the ability of conducting drug sensitivity tests. Therefore, finding suitable universal growth media for *Acanthamoeba* species is required. The present study was aimed at the development of liquid medium suitable for growing a fastidious (F) genotype T3 *Acanthamoeba* isolate, and eventually for other genotypes of this genus as well. Trophozoite growth was indirectly monitored by respiration analysis with oxygen-sensitive microplates (OSM) and further confirmed by manual counting. Media were empirically designed and tested first in a non-fastidious (NF) T3 isolate and then tested with 14 different strains, including the fastidious one. Combinations of nutritive components such as meat/vegetable broth, LB medium, malt and skimmed milk led to the design of new media suitable for culturing all the isolates tested, in conditions similar to those obtained in standard culture media such as PYG or CERVA.

© 2018 Published by Elsevier GmbH.

**Keywords:** *Acanthamoeba*; Axenic liquid medium; Culture; Oxygen-sensitive microplates; Respiration; Trophozoite

### Introduction

Protozoa of the genus *Acanthamoeba* are mainly non-parasitic organisms found in soil, water and dust (Khan, 2009). These free-living amoebae (FLA) sporadically infect humans, causing *Acanthamoeba* keratitis (AK) or granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis (GAE) (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). There is no standard drug for treatment for AK, and the search for chemicals

with anti-*Acanthamoeba* properties is currently ongoing in many laboratories worldwide. In vitro drug screening of new amoebicides requires both cysts and trophozoites, since the resistance stage is far less sensitive to them than the vegetative form.

Isolation of amoebae trophozoites in patients with AK is performed by inoculating corneal scraps samples in monoxenic culture. Such a cultivation system is based on non-nutritive agar plates seeded with inactivated (heat-killed) bacteria, as these protozoa optimally feed on particulate material (De-Moraes and Alfieri, 2008). However, routine culture is conducted without bacteria, in axenic liquid media. Many cultivation procedures for FLA trophozoites have

\*Corresponding author.

E-mail address: [tania.martinp@edu.uah.es](mailto:tania.martinp@edu.uah.es) (T. Martín-Pérez).

**Table 1.** *Acanthamoeba* isolates used in the present study.

Isolate ID	Genotype and species/Genbank accession number	Origin	Growth in standard liquid medium/optimal growth temperature	Reference
ATCC – 30234	T4 – <i>A. castellanii</i>	Culture type collection	PYG + 2% Bactositone/25 °C	Not applicable
CCAP – 1501/1A	T4 – <i>A. castellanii</i>	Culture type collection	PYG + 2% Bactositone/25 °C	Not applicable
ATCC – 30171	<i>A. culbertsoni</i>	Culture type collection	CERVA/25 °C	Not applicable
CCAP – 1501/9	<i>A. astronyxis</i>	Culture type collection	PYG + 2% Bactositone/32 °C	Not applicable
2961	<i>A. polyphaga</i>	Isolate donated by Dr. Hadas <sup>a</sup>	PYG + 2% Bactositone/32 °C	Unpublished data
BYB2017	T2/MF113385	Cat with keratitis	CERVA/25 °C	Martín-Pérez et al. (2017a)
MYP 2004	T3 – <i>A. griffini</i> /KF010846	Patient with keratitis	CERVA/37 °C	Herederro-Bermejo et al. (2015b)
ISCIU-IAH 64/13	T4B/KY072778	Patient with keratitis	CERVA/32 °C	Martín-Pérez et al. (2017b)
ISCIU-IAH 85/13	T4A/KY072780	Patient with keratitis	CERVA/32 °C	Martín-Pérez et al. (2017b)
ISCIU-IAH 66/14	T3 – <i>A. griffini</i> /KY072779	Patient with keratitis	No/37 °C	Martín-Pérez et al. (2017b)
ISCIU-IAH 161/15	T4/KY072781	Patient with keratitis	CERVA/32 °C	Martín-Pérez et al. (2017b)
EV-IAH-P6	<i>Acanthamoeba</i> sp./MH087090	Environmental	PYG + 2% Bactositone/32 °C	Unpublished data
EV-IAH-V7	<i>Acanthamoeba</i> sp./MH087091	Environmental	PYG + 2% Bactositone/32 °C	Unpublished data
P-IAH-O3	T2/MH087093	Environmental	PYG + 2% Bactositone/32 °C	Unpublished data
PV-IAH-V2	T2/MH087092	Environmental	CERVA/32 °C	Unpublished data

<sup>a</sup>Poznan University of Medical Sciences, Poland.

been designed since the pioneering works by Adam (1959), Adam and Blewett (1967), Cerva (1969) and Visvesvara and Balamuth (1975). Axenic liquid culture of amoebae is usually straightforward and trophozoites of most isolates grow well in either PYG or CERVA (Schuster, 2002; Martín-Pérez et al. 2017b). Diverse alternative media, such as BSC, BHI, PPG, *Giardia* medium, etc., have been used with relative success to grow *Acanthamoeba* sp., according to the specialized literature (see Martín-Pérez et al. 2017a, for a detailed review). Interestingly, some *Acanthamoeba* isolates fail to grow in axenic liquid media (De Jonckheere, 1980; Hiti et al. 2001; Nagyová et al. 2010), a problem also observed in our laboratory with a genotype T3 isolate (Martín-Pérez et al. 2017b).

The present work was aimed at the development and optimization of an alternative liquid medium capable of supporting growth of the F genotype T3 isolate available in our laboratory (Martín-Pérez et al. 2017b) and eventually of isolates of other genotypes. Oxygen-sensitive microplates (OSM) were employed for screening media destined to grow trophozoites of NF T3 genotype, used as model system. This system provides indirect information on amoebic growth and metabolism (Herederro-Bermejo et al. 2015a).

Finally, performance of reliable media was confirmed by viability analysis and microscopic observations in fourteen *Acanthamoeba* isolates.

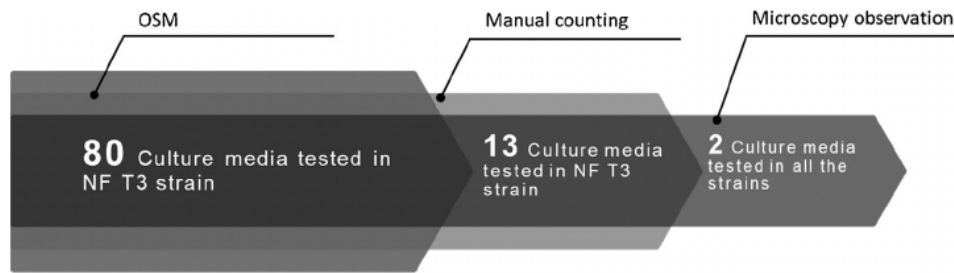
## Material and Methods

### Amoeba isolates and culture conditions

The isolates used in this study (along with their biological features) are shown in Table 1. The protocol followed in assays for evaluation of amoebic growth in new media is shown in Fig. 1.

### Experimental design for respiration studies in low-nutrient media

In order to determine the respiration profiles occurring in optimal or suboptimal culture conditions by means of OSM (see below), the NF T3 isolate (MYP 2004) was grown in CERVA medium at 1X, 0.75X, 0.5X, 0.25X, 0.125X and 0.06X. Media dilutions were made in sterile distilled water. These experiments were repeated four times. This study was



**Fig. 1.** Flow chart showing the experimental design of screening of *Acanthamoeba* growth media in this study.

combined with manual counting (see below). The hypothesis addressed was, could a unique respiration profile eventually identify a medium with good cultivation performance.

In addition, culture assays using 1X CERVA with 10% synthetic foetal bovine serum (SFBS – Panexin basic® from PAN Biotech, Aidenbach, Germany) was tested as well by OSM and manual counting, in order to ascertain if this economical component could replace the more expensive standard foetal bovine serum (FBS – SIGMA, St. Louis, MI, USA), currently in use in our laboratory. Growth with PBS was always included in assays as a negative control.

### Culture media: components and their preparation

Nutritional components used in the development of new media are: glucose (SIGMA), LB medium (Scharlab), malt extract (Scharlab), yeast extract (Scharlab), bactocasitone (Scharlab), tryptone (Scharlab), foetal bovine serum (SIGMA), grape juice, alcohol-free beer, diverse preparations of chicken-bovine-pork-vegetable broths, fish-vegetable broth, *Spirulina* + *Fucus* capsules, yeast scales food supplement, lactose-free UHT skimmed milk, soy drink and hen's egg. The composition of the eighty empirically designed liquid media is presented in Tables S1–S4 as Supplementary material. Some commercial products from local supermarkets (either Auchan-La Dehesa or Mercadona-Juan Ramón Jiménez, both located in Alcalá de Henares, Spain) were used for economic reasons. To ensure reproducibility, two production batches of the same brand (namely lactose-free skimmed milk and commercial meat/vegetable broths) were tested in culture (this was done only for the most performant liquid medium). Medium LBM (2X Luria-Bertani medium supplemented with malt extract) consisted of yeast extract at 10 g/L, triptone at 20 g/L, malt extract at 40 g/L and NaCl at 10 g/L. HEPES buffer was prepared at 0.2 M (20X solution), filtered through a filter syringe (0.22 µm), frozen in aliquots at –20 °C and used in medium at 10 mM (pH=7.4). Antibiotics (0.1 g/L streptomycin and 0.06 g/L penicillin) were added as a 100X solution.

Since all commercial liquid broths do not indicate the exact amount of components used in industrial cooking, two laboratory-made broths (with weighted ingredients) were prepared as follows:

- Chicken broth: 400 g chicken leg, 75 g carrots, 175 g potato, 130 g onion, 750 mL tap water.
- Mussel broth: 1 kg mussels (with shell), 85 g onion, 500 mL tap water.

These ingredients were purchased in the same local supermarkets mentioned above. Components were added to a three-liter wide mouth, metal screw-cap glass container and autoclaved at 121 °C as usual. All types of broth (commercial and laboratory-made), along with lactose free skimmed milk (LFSM) and soya drink were clarified/filtered (CF) in order to obtain a non-turbid medium. The process of particle elimination was carried out in five steps:

- 1) Centrifugation at 2000 × g for 10 min. The supernatant was recovered with a pipette.
- 2) The supernatant was centrifuged at 10,000 × g for 15 min. The supernatant was recovered as before.
- 3) The supernatant was filtered through 0.45 µm syringe filter
- 4) The filtrate was centrifuged again at 10,000 × g for 15 min.
- 5) Finally, the supernatant was filtered through 0.22 µm syringe filter and considered ready for use in culture assays.

Lactose-free skimmed milk and soy drink were processed in a way similar to the broth. The only difference was that they were previously diluted in sterile distilled water to facilitate CF. Skimmed milk was diluted at 15% and soy drink at 45%.

Alcohol-free beer was open in sterile conditions. Beer was transferred to 50 mL Falcon conical centrifuge tubes and left at 4 °C overnight. Tube cap was not tightly closed in order to facilitate depletion of carbonic gas from liquid, that otherwise would acidify the culture medium. *Spirulina* and *Spirulina-Fucus* capsules were opened under sterile conditions and their content was resuspended at either 50 mg/mL (*Spirulina*) or 50 + 4.1 mg/mL (*Spirulina* + *Fucus*) in sterile distilled water, mixed on an orbital shaker at 50 rpm for 10 min at room temperature and then centrifuged 10 min at 10,000 × g. The resulting supernatant was recovered and considered sterile, particle-free and transparent enough as to be used directly in cultures. The same procedure was followed to prepare yeast extract from commercial yeast scales used as food supplement. To obtain hen's egg yolk or egg white, egg surface was wiped with 70% ethanol. Once dry, an egg was slightly



**Table 2.** Ingredients (in  $\mu\text{L}$ ) used to prepare 1 mL of media 39 and 80 and medium respiration profile.

Ingredients	Media 39	Media 80
Sol. 0.2 M HEPES	50	50
Penicilin + Strept. mix 10 + 6 g/L	10	10
Aneto <sup>®</sup> chicken broth	350	350
LBM	210	210
15% LF skimmed milk	330	0
50% egg yolk in 0.9% saline sol.	0	30
<i>Spirulina</i> + <i>Fucus</i> suppl.	0	25
Extract/50 + 4.1 g/L		
Sterile water	50	325
Respiration profile	1	1

flamed and then carefully cracked in a sterile Petri dish in a laminar flow hood (to keep the content sterile). Due to the high viscosity of egg's fluids, both yolk and egg white were recovered with a 1 mL automatic pipette using wide orifice filter tips (Finntip<sup>®</sup>, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Care was taken to avoid pipetting the egg's blastoderm. Yolk could not be totally clarified. It was emulsified at 50% with sterile physiological saline solution (0.9% NaCl) and then centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. The slightly cloudy supernatant was recovered and used in media preparation. Egg white was diluted as well at 50% with sterile physiological saline solution, to facilitate pipetting. Media containing CF components was clear enough to permit microscopic observation of amoebic cultures.

### Experimental design for respiration studies in the screening of new media in the model system organism (NF T3 isolate MYP 2004)

The eighty experimental media (Tables S1–S4) were assayed with the NF T3 isolate with the aid of OSM. Only thirteen media out of 80 (showing different respiration profiles – see results) were selected for further evaluation of viability by manual counting and microscopy. In addition, one of these media (number 39) showed good performance in culture of NF genotype T3 and was tested without HEPES, in order to assess the importance of buffering the pH of cultures.

Two media (39 and 80-see Table 2) of the several reliable for growing the NF T3 isolate (MYP 2004) were selected for culture assays in the F T3 isolate (ISC-UAH66/14) and the rest of non-fastidious isolates (Table 1). Amoebic growth was only confirmed by microscopy, without performing any viability analysis. Both PYG and CERVA media were used as negative controls (no-growth) for the F T3 isolate and as positive controls for the non-fastidious strains.

Finally, the effect of refrigeration/freezing on preservation of the reliable new media was studied with OSM in the NF T3 isolate. The performance of two freshly prepared media (39 and 80) was compared with aliquots of the same media

kept in the refrigerator for two weeks or kept in the freezer for two weeks and at the same time subjected to six cycles of freezing and thawing.

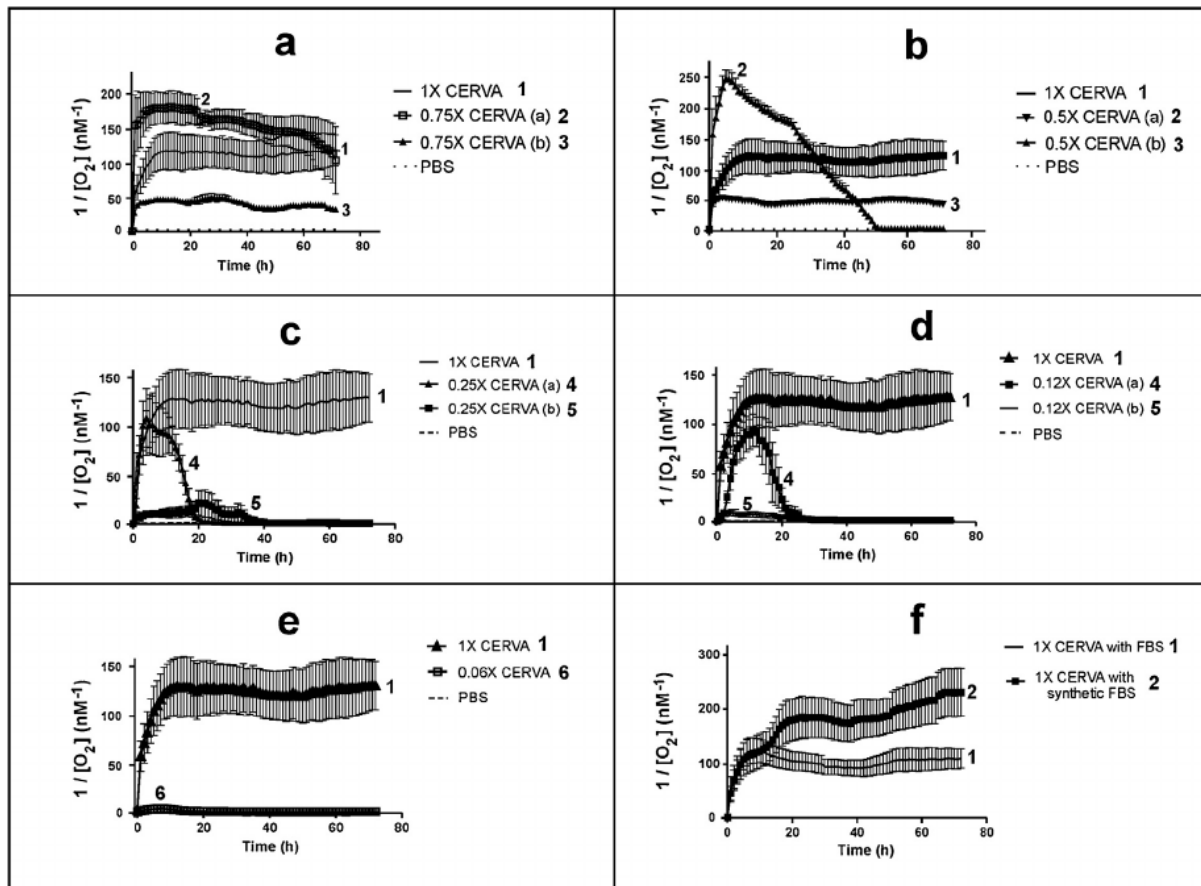
### Studies on respiration analysis (using OSM microplates) in NF genotype T3 *Acanthamoeba* (isolate MYP 2004)

The procedure employed for respiration analysis with OSM microplates has been described in detail elsewhere (Heredero-Bermejo et al. 2015b; Martín-Pérez et al. 2017a). In brief, 10  $\mu\text{L}$  of PBS containing  $10^5$  amoebae from log phase cultures (grown for 48–72 h) was added to 90  $\mu\text{L}$  of the medium being assayed. Such a high inoculum was necessary to avoid issues of background fluorescence in the control (CERVA medium). The medium with protozoa was loaded into wells and overlaid with 100  $\mu\text{L}$  of mineral oil to avoid oxygen replenishment from air. Media, amoebae and the microplate were maintained on ice during preparation, to ensure assay synchronicity as much as possible. Unless otherwise stated, culture medium was assayed in triplicate in at least two separate experiments. The plate was placed in a fluorescence reader (VICTOR<sup>®</sup> – PerkinElmer, Waltham, MA, USA), which was programmed to obtain two readings per well and hour (for up to 72 h) at 37 °C. Time-resolved fluorescence (excitation at 340 nm/emission at 642 nm) was measured at delay times of 30 and 70 microseconds. Fluorescence readings were transformed in  $\text{O}_2$  concentration using the Stern-Volmer equation (Criado-Fornelio et al. 2017). Respiration plots in this study use the variables  $1/[\text{O}_2]$  versus time, which provides exponential curves similar to those obtained by measuring trophozoite growth by manual counting.

### Viability analysis by manual counting and microscopic observations in *Acanthamoeba* isolates

Media 5, 10, 27, 30, 35, 39, 54, 63, 69, 74, 78, 79 and 80 (Tables S1–S4) were selected for performing viability studies by manual counting in NF genotype T3 isolate. They were chosen based on their different respiration profiles, as explained above. For such purposes, sterile 24-well microtiter plates were seeded with medium (0.6 mL) and trophozoites. Non-fastidious amoebae from log phase cultures were resuspended in PBS, counted and adjusted so that the medium being assayed was inoculated with 10  $\mu\text{L}$  of amoebae suspension, at a final density of  $10^5$  trophozoites/well. After different periods of incubation (1, 3 and 7 days) at either 37 or 25 °C, depending on the isolate, trophozoites were detached by cold shock and counted in a Fuchs-Rosenthal chamber using 0.2% Congo red to assess viability (Heredero-Bermejo et al. 2013).

For the rest of the NF strains used in this study, amoeba inoculation was done as explained above. No viability analysis was performed in these cases; cultured amoebae status



**Fig. 2.** Respiration plots of NF genotype T3 *Acanthamoeba* obtained in diverse media: PBS, 1X CERVA (optimal concentration), five suboptimal concentrations of CERVA and CERVA medium made with either FBS or SFBS. Fluorescence readings were transformed in  $[1/O_2]$ . (a) Curves for 0.75X CERVA, (b) curves for 0.5X CERVA, (c) curves for 0.25X CERVA, (d) curves for 0.12X CERVA, (e) curves for 0.06X CERVA, and (f) curves for FBS and SFBS. Data shown are the results obtained in four experiments; in all cases two experiments suited one of the respiration profiles (a) and the remaining two the other respiration profile (b), except in (e), where a unique curve type appeared in the four experiments. Vertical error bars represent SD.

was qualitatively checked using microscopy. The observation period lasted 30 days.

In assays for growing the F T3 isolate, amoebae resistance stage (approximately 1000 cysts in 20  $\mu$ L of sterile PBS) were inoculated in sterile 24-well microtiter plates as described above. As no trophozoites were available, cysts for inoculation were obtained by PBS washing of non-nutrient agar plates seeded with heat-killed *E. coli* where the amoeba had been grown for 2 weeks. Cultures were examined daily for excystation under an inverted microscope for 30 days.

### Statistical analyses

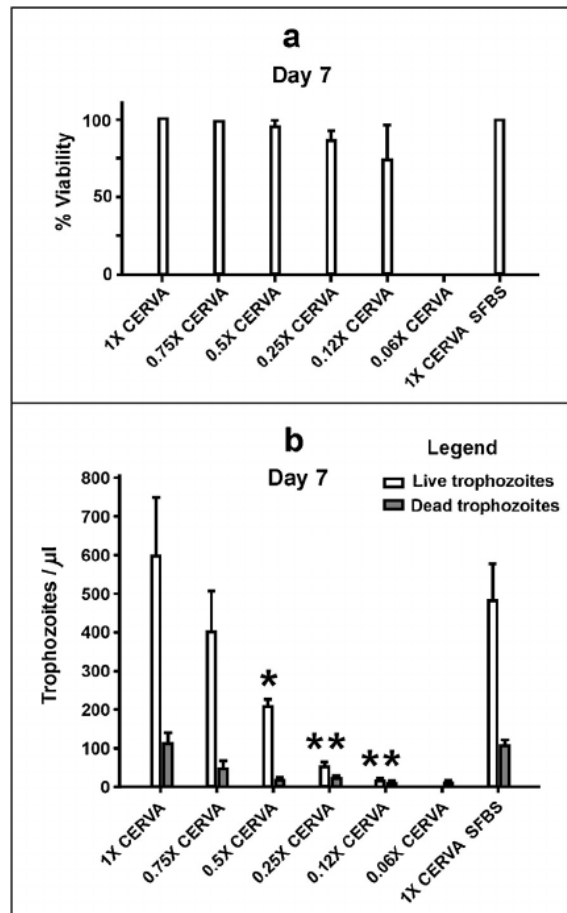
Respiration experiments were run in triplicate wells and in at least two independent experiments. Results of manual counting are provided as mean  $\pm$  SD of data obtained from at least three independent experiments. The statistical significance of the results on manual counting was determined using the unpaired Student's *t* test. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5<sup>®</sup> software package

(GraphPad Software, San Diego CA, USA). The statistical significance was defined at  $P < 0.05$ .

## Results

### Respiration profiles of the NF T3 isolate MYP 2004 in standard CERVA medium and its variants

The NF T3 isolate (MYP 2004) cultured in 1X CERVA showed exponential-shaped oxygen consumption graphs (Fig. 2a – profile 1). The use of CERVA at lower concentrations (0.75X and 0.5X) showed either enhanced (Fig. 2a and b – profile 2a) or diminished respiration curves (Fig. 2a and b – profile 2b). It is important to highlight that oxygen consumption decreased always at about 60–65 h (or sooner) in profiles 2a and 2b. As expected, CERVA at 0.75X and 0.5X showed less amoebic growth than 1X CERVA as determined by manual counting (Fig. 3), albeit trophozoite count was similar in 1X and 0.75X CERVA at  $t = 7$  days (non-significant



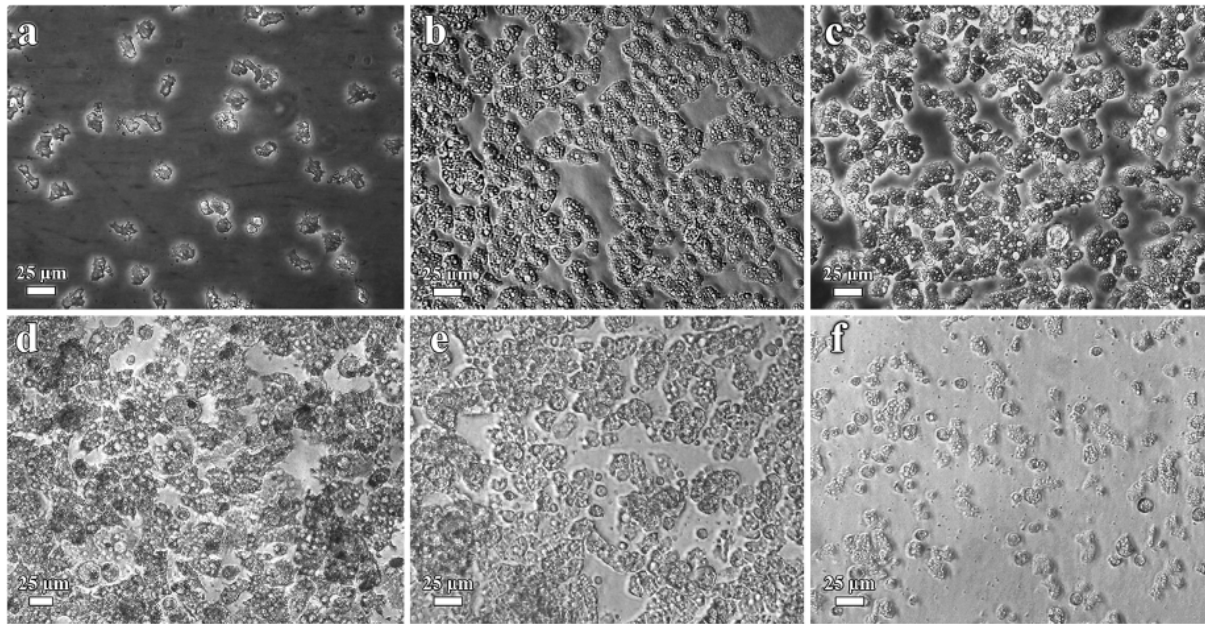
**Fig. 3.** Barplot charts showing analysis of viability (a) and trophozoite counts (b) in the same media studied by OSM in Fig. 1, obtained after 7 days of incubation. Legend for statistically significant differences in cell counts between 1X CERVA and suboptimal CERVA dilutions: \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.005$ . Data shown are the results obtained in three experiments. Vertical error bars represent SD.

difference,  $P > 0.2$ ), but significantly lower in 0.5X CERVA ( $P < 0.02$ ). When low-nutrient medium (CERVA at 0.25X or 0.12X) was tested for growth, two types of respiration graphs were observed: (1) a curve with an initial burst of respiratory activity, followed by fast decline to the basal level in about 24–30 h (Fig. 2c and d – profile 4a), or (2) a smooth exponential curve followed by plateau and a decay period, reaching oxygen consumption a basal level in less than 45 h (Fig. 2c and d – profile 5b). Manual counting (Fig. 3) showed significant loss of amoebae viability and trophozoite counts in these media at  $t = 7$  days ( $P < 0.005$ ). In 0.06X CERVA, a single type of profile was obtained: respiration was only slightly greater than in PBS at the beginning of the incubation period and decayed quite quickly (Fig. 2e – profile 6). Manual counting (Fig. 3) showed that in 0.06X CERVA there were no live trophozoites following 7 days of culture. Finally, cultures supplemented with synthetic foetal bovine serum (SFBS) returned respiration graphics that were similar to 1X CERVA for the first 12 h of incubation and then respiration was slightly enhanced after such period (Fig. 2f). In this case, manual counting (Fig. 3) revealed that there was no significant difference ( $P > 0.3$ ) in trophozoite viability or

cell counts between FBS and SFBS when growing the NF T3 isolate MYP 2004 (Fig. 3).

### Preparation of the new media (with emphasis in CF processing)

The procedure developed for CF of medium components was straightforward for diluted LFSM, diluted soy milk, Auchan<sup>®</sup> cocido broth, Aneto<sup>®</sup> chicken broth or laboratory-made chicken broth. Other broth preparations were more difficult to clean and the efficiency of CF was lower (the 0.22 µm syringe filter was quickly clogged). This was caused by their high content of tiny particles and fats (the latter remaining on the upper part of the supernatant after centrifugation, hampering the recuperation of clarified broth). Diluted egg yolk could not be totally clarified due to the existence of a large amount of very tiny particles. This fact did not preclude its use in cultivation, as egg yolk was obtained under sterile conditions, and then diluted with sterile saline solution and centrifuged, thus avoiding the sterilization by syringe filter. In spite of the presence of such suspended material, egg yolk at 1.5% (or less) in culture medium was clear enough



**Fig. 4.** Phase-contrast micrographs at 200X of diverse isolates of *Acanthamoeba* grown in the new alternative media for FLA (a) trophozoites of the F genotype T3 ISC-UAH66/14 after two days of culture, (b) trophozoites of the NF genotype T4 ATCC 30234 grown in medium 39 after three days of culture, (c) trophozoites of the NF genotype T4 ATCC 30234 grown in medium 80 after three days of culture in 24 well microtiter plate. Note that in spite of the presence of tiny egg yolk particles in medium, these are in suspension and do not interfere with viewing the amoeba or taking the micrograph. (d) Trophozoites of the NF *A. astronyxis* CCAP 1501/9 cultured in medium 80, (e) trophozoites of the NF genotype T2 (BYB2017) cultured in medium 39, and (f) trophozoites of the NF *Acanthamoeba* sp. (EV-UAH-P6) cultured in medium 39.

as to permit good microscopic observation of the amoebae (Fig. 4c).

#### Performance of the new media in the model system isolate (NF genotype T3 MYP 2014) based on OSM and viability data

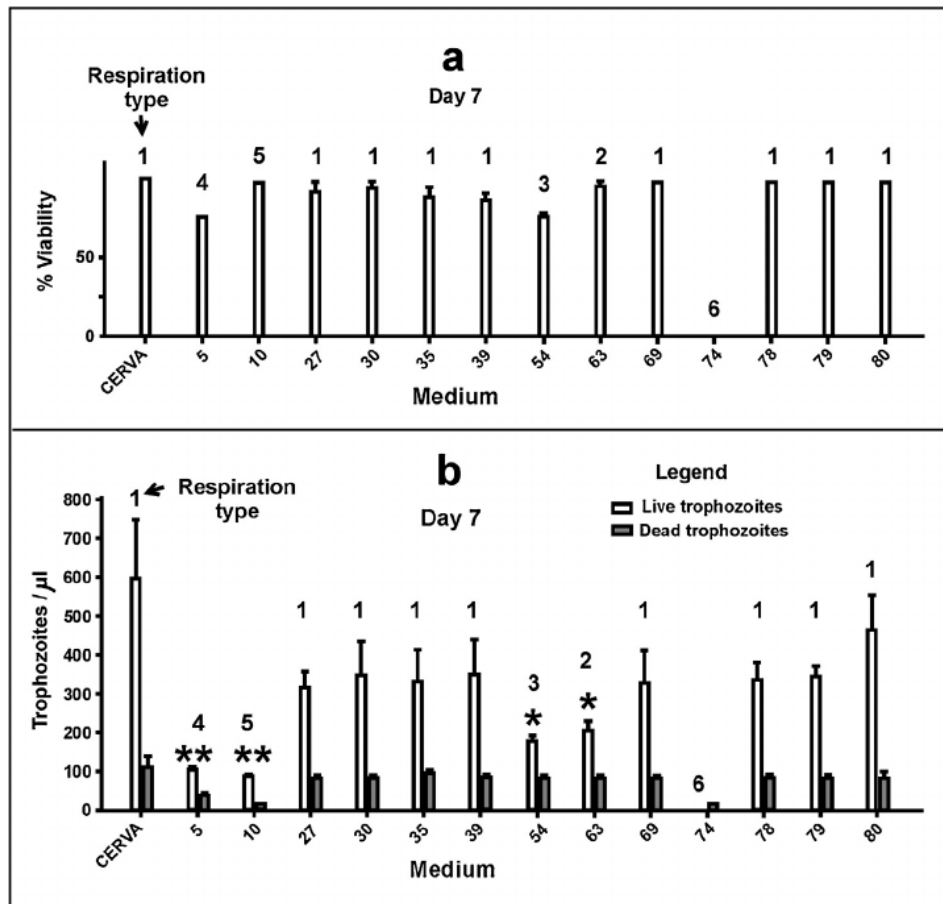
Respiration profiles of the NF T3 isolate (MYP2004) cultured in experimental media basically showed similar profiles than those found using 1X CERVA and its dilutions. For simplicity, culture performance for each medium is indicated (in Tables S1–S4) as type of respiration profile (according to graphs shown in Fig. 2). Based on a comparison of respiration profile with manual counting data at day 7 (Fig. 5) in the thirteen selected media, it was concluded that media yielding respiration profile type 1 (27, 30, 35, 39, 69, 78, 79, 80) showed similar viability (and trophozoite counts) than those grown in CERVA 1X ( $P > 0.1$ , difference non-significant), whereas types 2 and 3 (medium 54 and 63) showed reduced growth compared to control ( $P < 0.05$ ). Profiles 4–6 usually lead to a rapid loss of viability and cell counts (medium 5 and 10,  $P < 0.01$ ; medium 74 presented no live cells at day 7). Amoebae grown in several media containing diverse commercial broth preparations combined with LBM and LFSM, (numbers 26, 27, 29, 30, 35, 37, 38, 39, 40, 42, see Tables S2) showed respiration profiles type 1, the same as 1X CERVA. Therefore, most types of commercial broth at 17–30% were suitable for growing NFT3 isolate (MYP2004). Medium containing chicken broth prepared in the laboratory (e.g., 50,

51 or 52 – Table S3) showed equivalent performance than media containing commercial chicken broth (37–42, Table S2). In contrast, media containing lab-made mussel broth (media 53–58, Table S3) were less performant than other media made with meat/vegetable broth. On the other hand, media 69, 78, 79 and 80 (Table S4), made with combinations of egg yolk and spiruline/fucus extract instead of LFSM, were equally readable for growing the NF T3 isolate.

The use of commercial broth and LFSM from two different production batches did not result in any change in the performance of medium 39 (Fig. 6). On the other hand, medium 39 prepared without HEPES buffer showed only a limited respiration level, which suggests that this component is essential for a reliable amoebic growth (Fig. 6). Repeated freeze/thaw cycles (6X) of medium 39, containing broth, LBM and LFSM, caused no effect on their performance, whereas refrigeration decreased it (Fig. 6). In contrast, medium 80, containing diluted egg yolk and algal extracts, was best conserved when kept refrigerated at 4 °C for two weeks (Fig. 6).

#### Evaluation of the new media performance with the F *Acanthamoeba* T3 isolate (ISC-UAH66/14) and the NF isolates, as determined by microscopic observations

The F T3 isolate ISC-UAH66/14 showed no excystation or development whatsoever when maintained in classic culture media (CERVA or PYG) after one month of incubation at either 25, 32 or 37 °C. Media 39 and 80 supported growth



**Fig. 5.** Barplot charts showing analysis of viability (a) and trophozoite counts (b) in thirteen selected experimental media after 7 days in culture. The type of respiration profile for every medium is on top of the corresponding bar plot. Legend for statistically significant differences of the new medium with rapport to CERVA: \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ . Data shown are the results obtained in three experiments. Vertical error bars represent SD.

of the hard-to-grow isolate at 32 °C. When cysts of the F genotype T3 isolate were inoculated in any of these media, excystation was evident after one day of culture and noticeable growth was attained after 4–6 days (Fig. 4a). However, a strong tendency towards encystment was observed afterwards, especially if the medium was not replaced regularly every 2–3 days. Qualitative microscopic observations showed that trophozoites of the fourteen isolates assayed were able to grow both in medium 39 and 80 (Fig. 4). After 7 days of inoculation, amoebic cultures show tendency towards encystment if the medium is not renewed. When the media is changed every three days, almost no encystment was observed in the cultures (the same as for CERVA or PYG medium).

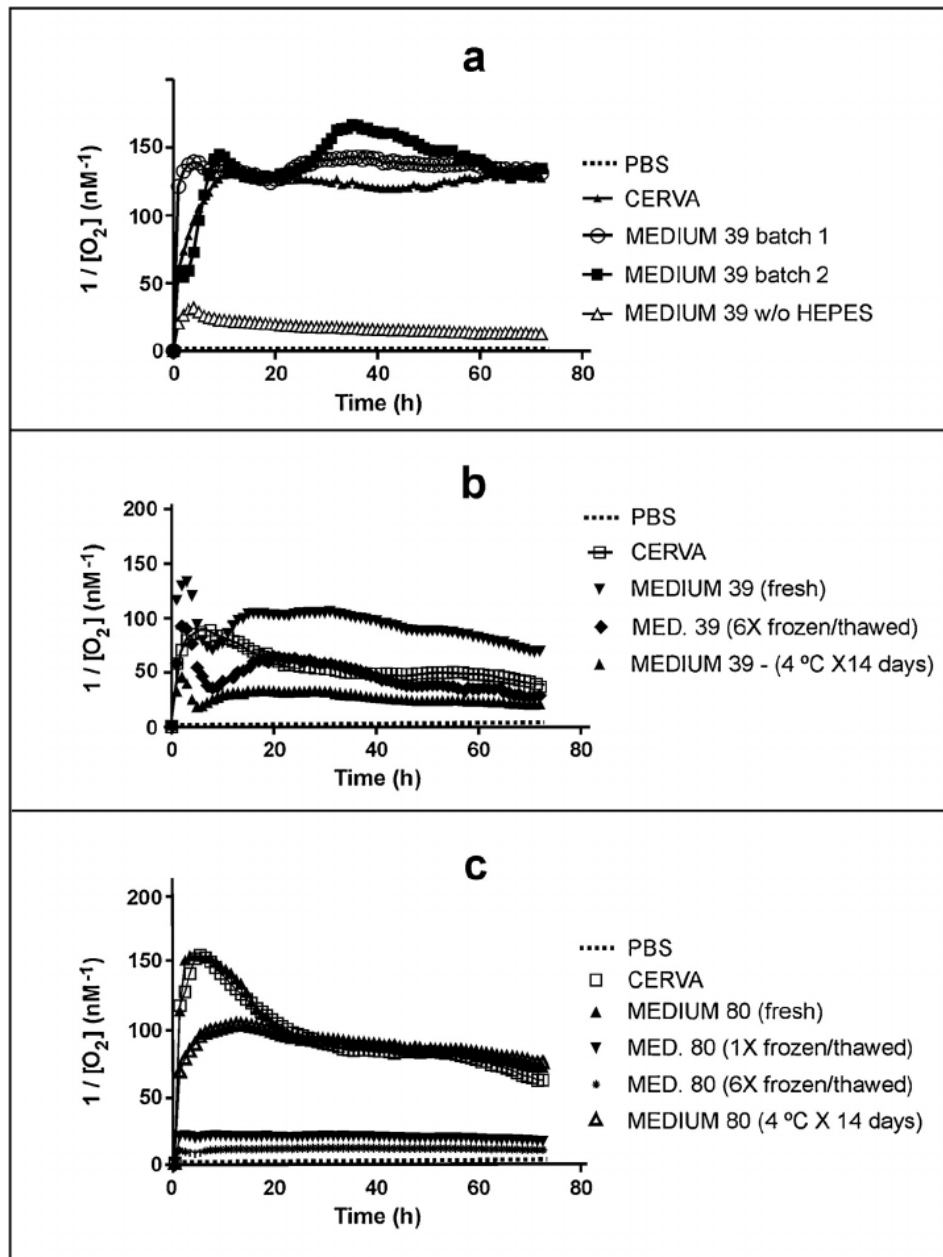
## Discussion

### CERVA medium and its variants as a primary model for evaluating culture status with OSM

In agreement with previous studies in other *Acanthamoeba* isolates (*A. castellanii* and *A. polyphaga* – Heredero-Bermejo

et al. 2015b), respiration curves of NF T3 isolate (MYP2044) grown in 1X CERVA (that is, under optimal conditions) yielded exponential graphs similar to growth curves obtained by manual counting. Amoebae at high inoculum were needed to avoid any problem with background fluorescence. The shape of the respiration graphs obtained suggests that the amoebae survived and multiplied (for a limited time) under such conditions. It is evident from our studies that anaerobiosis (caused by the use of the mineral oil overlay in microplate wells) does not impair amoebic growth. This is consistent with findings by Alves et al. (2017), who pointed out that anaerobic glycolysis and protein catabolism pathways are present in *A. castellanii*.

Amoebic growth monitored with OSM at suboptimal CERVA concentrations showed sometimes divergent results in different experiments. The reason for this might be that amoeba inocula were not exactly in the same growth moment. It is likely that amoebae respiratory response would be variable depending on if they were collected in the middle of the exponential growth phase, in the end of the exponential growth phase or in the stationary phase. On the other hand, cultures performed in suboptimal 0.75X CERVA sometimes



**Fig. 6.** Respiration plots of NF genotype T3 *Acanthamoeba* obtained in diverse media (see text for explanation). (a) Oxygen consumption plots for PBS, CERVA, medium 39 prepared with different batches of broth and LFSM or without HEPES buffer. (b) Oxygen consumption plots for PBS, CERVA, and medium 39 kept at diverse temperatures. (c) Oxygen consumption plots for PBS, CERVA, and medium 80 kept at diverse temperatures. Data shown are the results obtained in three experiments. Vertical error bars were omitted for clarity, but these can be found in the alternative graph provided in the Supplementary material.

showed higher oxygen consumption than the 1X CERVA control, but this did not correlate with higher viability or cell counts. Such a lack of correspondence between growth and respiration may be caused by oxidative stress, as previously observed in other protozoa (Mastronicola et al. 2011). Moreover, treatment with drugs may induce a similar respiratory burst effect (Martín-Pérez et al. 2017a). Despite the possible drawback of OSM (Criado-Fornelio et al. 2017), the respiratory profile type 1 unequivocally pointed to reliable media,

as demonstrated later by viability analysis and cell counts. If none of the assayed medium shows this optimum respiration profile, media showing profile 2 might be tested as well as an alternative. Such a pattern was observed in 0.75X CERVA and CERVA with SFBS, where cell counts was similar to 1X CERVA. Therefore, OSM microplates may serve as a valuable tool in future attempts to develop and optimize culture media for other protozoa or microorganisms. On the other hand, the synthetic alternative to real FBS (namely,

Panexin basic<sup>®</sup>) was reliable for culture of NF T3 *Acanthamoeba* isolate in CERVA medium, in spite of the fact that this component was designed for use in human cell culture (Mahboudi et al. 2013) rather than for protozoa maintenance. Since SFBS is 32% less expensive than the standard FBS, the present study implies the development of a more economical procedure for cultivation of *Acanthamoeba* in CERVA medium.

### Culture media for trophozoites: design, preparation and performance

The use of soil water extracts, skimmed milk and LBM medium in cultures of *Acanthamoeba* has been recently proposed for growing the vegetative stage of *A. griffini* and *A. castellanii* (Martín-Pérez et al. 2017a). However, such an approach was disregarded in the present contribution. Instead, medium design and formulation for NF genotype T3 *Acanthamoeba* culture was carried out on an empirical basis owing to the lack of fundamental knowledge on nutritional needs of this genotype. Since medium optimization using a one-factor-at-a-time approach is time-consuming, expensive, and often leads to misinterpretation of results (Batista and Fernandes, 2015), in the present study a strategy of empirical combination of several nutritional components was followed. Some classical culture components (peptone, yeast extract and milk protein-derived components) were combined with new nutritive ingredients (malt extract, skimmed milk, egg yolk, egg white and algae/meat/vegetable extracts). In fact, egg white has been already used (as egg albumin slope) in slanting cultures of *Entamoeba histolytica* (Moundipa et al. 2005). The use of undefined media for growing *Acanthamoeba* is common in many specialized laboratories (Schuster, 2002). However, low-priced components were used in the present medium screening assay, instead of testing media developed for other organisms, which is the usual strategy (De Jonckheere, 1980; Hiti et al. 2001; Nagyová et al. 2010; Martín-Pérez et al. 2017b). Such an approach has proven successful for growing both F+NF T3 and other. The fastidious T3 isolate ISC-UAH66/14 was finally grown at 32 °C, whereas monoxenic cultures in non-nutrient agar and *E. coli* grew better at 37 °C (Martín-Pérez et al. 2017b). The improved growth of pathogenic *Acanthamoeba* isolates at temperatures lower than 37 °C, was remarked on by Schuster (2002) also. There is still a strong tendency towards encystment of the fastidious isolate in the new medium, implying frequent passages are needed to keep the amoebae in the trophozoite stage.

It is important to underline that amoebae isolated from the new media do not contain contamination of foreign DNA, in contrast with previous contributions where xenic cultures with bacteria were developed (Wang and Ahearn, 1997; Pickup et al. 2007; De Moraes and Alfieri, 2008). Particles (<0.22 µm) derived from egg yolk (used for instance in medium 80) are composed of protein (Vadehra et al. 1977),

so that uncontaminated DNA may be successfully isolated from amoebic cultures.

One of the possible problems associated with the preparation of the new media reported in this study is the need for CF of some components. Ultracentrifugation is a relatively fast way to eliminate particles in milk and egg yolk (Downey and Andrews, 1969; Vadehra et al. 1977). Nevertheless, such an approach was disregarded in our experimental design, since ultra-centrifuges are expensive instruments, not available in every clinical/research laboratory. The techniques described here may be adapted to most research institutions, since only syringe filters and a mini-centrifuge (reaching 10,000 × g) are needed to get rid of particles found in some nutritive components. Although medium clarification is to some extent time-consuming, it should not be forgotten that the alternative media were developed as a last resort solution, destined to maintain slow-growing or fastidious isolates. Furthermore, the reagents needed are generally inexpensive compared to FBS, for instance. The components of the laboratory-made chicken/vegetable broth are available in most parts of the world and are not fraught with any cultural or religious taboos. Hence, cultivation of *Acanthamoeba* isolates may be done almost everywhere, even if the broth brands employed by us in Spain are unavailable. Evidently, local broth brands in other geographic locations may be tested as well for commodity. Batch to batch variations in broth seem not to be a problem, as demonstrated here. Conservation of the new media in the freezer is possible for egg yolk-free medium, whereas refrigeration is recommended for medium containing egg yolk. Such a long-term conservation feature is an advantage compared to media based on soil extracts, which are relatively short-lived (Martín-Pérez et al. 2017a). Although it is unsure which ingredients contribute to the success of the new culture media for FLA, the fact that milk and egg yolk are rich in vitamins A and D (Imaeda et al. 1999; Semba, 2012; Schmid and Walther, 2013), suggests that these may be important to promote *Acanthamoeba* growth. In fact, vitamin supplements have been previously used to grow fastidious and non-fastidious *Acanthamoeba* isolates (Byers et al. 1980; Shukla et al. 1990; Schuster and Visvesvara, 1998). However, further studies using vitamin mixes would be necessary to address such a hypothesis.

### Conclusions

The present study has shown that OSM microplates are suitable tools in culture media screening. Some new media are reliable for growing both F and NF T3 isolates along with NF isolates of other genotypes, while these *Acanthamoeba* isolates had to be formerly cultured in different media. The procedures described here are promising, as they can facilitate the task of in vitro drug screening, since a single medium might be used for cultivation of many isolates. Further attempts to grow other *Acanthamoeba* spp. isolates in new media in cooperation with other laboratories are under-

way to address such a hypothesis. Likewise, simplification of the CF procedure for culture medium would be desirable if the method is routinely used.

## Acknowledgements

This work received financial support from the UAH project CCG2016/BIO-023. Dr. Manuel Ávila wishes to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) for the fellowship award (ref. CONACyT 1291121) for his postdoctoral arrangement at the Universidad de Alcalá, Spain. We are grateful to Mr. Juan Pulido and Mr. Guillermo Sastre (Unidad de isótopos radioactivos – CAI Medicina y Biología de la Universidad de Alcalá), for their technical assistance with the VICTOR BD instrument. We are indebted also to J.A. Diaz-Martín, J. Matilla-Fuentes and J.A. Sánchez-Arias (Oxoprobs Biosciences SL, Madrid, Spain) for their invaluable technical advice on OCR microplates.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2018.04.002>.

## References

- Adam, K.M.G., Blewett, D.A., 1967. Carbohydrate utilization by the soil amoeba *Hartmannella castellanii*. *J. Protozool.* 14, 227–282. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb01998.x>.
- Adam, K.M.G., 1959. The growth of *Acanthamoeba* sp. in a chemically defined medium. *J. Gen. Microbiol.* 21, 519–529.
- Alves, D.S., Alves, L.M., da Costa, T.L., de Castro, A.M., Vinaud, M.C., 2017. Anaerobic metabolism in T4 *Acanthamoeba* genotype. *Curr. Microbiol.* 74, 685–690.
- Batista, K.A., Fernandes, K.F., 2015. Development and optimization of a new culture media using extruded bean as nitrogen source. *MethodsX* 2, 154–158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2015.03.001>.
- Byers, T.J., Akins, R.A., Maynard, B.J., Lefken, R.A., Martin, S.M., 1980. Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation. *J. Protozool.* 27, 216–219.
- Cerva, L., 1969. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science* 163, 576.
- Criado-Fornelio, A., Verdú-Expósito, C., Martín-Pérez, T., Moracho-Vilrriales, C., Heredero-Bermejo, I., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., Pérez-Serrano, J., 2017. Laboratory analysis of soil respiration using oxygen-sensitive microplates. *Geoderma* 305, 12–20.
- De Jonckheere, J.F., 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (4), 681–685.
- De-Moraes, J., Alfieri, S.C., 2008. Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66 (2), 221–229. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00594.x>.
- Downey, W.K., Andrews, P., 1969. Evidence for the presence of several lipases in cow's milk. *Biochem. J.* 112 (5), 559–562.
- Heredero-Bermejo, I., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., Gómez, R., De La Mata, F.J., Pérez-Serrano, J., 2013. *In vitro* comparative assessment of different viability assays in *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Parasitol. Res.* 112, 4087–4095.
- Heredero-Bermejo, I., Criado-Fornelio, A., De Fuentes, I., Soliveri, J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., 2015a. Characterization of a human-pathogenic *Acanthamoeba griffini* isolated from a contact lens-wearing keratitis patient in Spain. *Parasitology* 142, 363–373.
- Heredero-Bermejo, I., Criado-Fornelio, A., Soliveri, J., Díaz-Martín, J.A., Matilla-Fuentes, J., Sánchez-Arias, J.A., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., 2015b. Development of a new oxygen consumption rate assay in cultures of *Acanthamoeba* (Protozoa: Lobosea) and its application to evaluate viability and amoebicidal activity *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 155, 35–39.
- Hiti, K., Walochnik, J., Faschinger, C., Haller-Schober, E.M., Aspöck, H., 2001. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea* 20 (5), 467–470.
- Imaeda, N., Tokudome, Y., Ikeda, M., Kitagawa, I., Fujiwara, N., Tokudome, S., 1999. Foods contributing to absolute intake and variance in intake of selected vitamins, minerals and dietary fiber in middle-aged Japanese. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 45 (5), 519–532.
- Khan, N.A., 2009. *Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press Norfolk, UK, pp. 1–209.
- Mahboudi, F., Reza-Abolhassan, M., Azarpanah, A., Aghajani-Lazarjani, H., Sadeghi-Haskoo, M.A., Maleknia, S., Vaziri, B., 2013. The role of different supplements in expression level of monoclonal antibody against human CD20. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 5 (3), 140–147.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 273–307.
- Martín-Pérez, T., Criado-Fornelio, A., Ávila-Blanco, M., Pérez-Serrano, J., 2017a. Chapter 1: new advances in the biology of *Acanthamoeba* spp. (Protozoa: Amoebozoa): an opportunistic pathogen found in contact lenses. In: Arno, F., Rein, E. (Eds.), *Recent Progress in Eye Research*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA, pp. 1–89.
- Martín-Pérez, T., Criado-Fornelio, A., Martínez, J., Blanco, M.A., Fuentes, I., Pérez-Serrano, J., 2017b. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in Spain. *Eur. J. Protistol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2017.06.009>.
- Mastronicola, D., Giuffrè, A., Testa, F., Mura, A., Forte, E., Bordi, E., Pucillo, L.P., Fiori, P.L., Sarti, P., 2011. *Giardia intestinalis* escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: a molecular hypothesis. *Life* 63, 21–25.
- Moundipa, P.F., Melanie-Flore, K.G., Bilong-Bilong, C.F., Bruchhaus, I., 2005. *In vitro* amoebicidal activity of some medicinal plants of the Bamun region (Cameroon). *Afr. J. Trad. CAM* 2 (2), 113–121.
- Nagyová, V., Nagy, A., Timko, J., 2010. Morphological, physiological and molecular biological characterization of isolates from



- first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. *Parasitol. Res.* 106 (4), 861–872.
- Pickup, Z.L., Pickup, R., Parry, J.D., 2007. Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (8), 2631–2634.
- Schmid, A., Walther, B., 2013. Natural vitamin D content in animal products. *Adv. Nutr.* 4 (4), 453–462, <http://dx.doi.org/10.3945/an.113.003780>.
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 1998. Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 612–618.
- Schuster, F.L., 2002. Cultivation of opportunistic and free-living amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 342–354.
- Semba, R.D., 2012. On the ‘discovery’ of vitamin A. *Ann. Nutr. Metab.* 61 (3), 192–198, <http://dx.doi.org/10.1159/000343124>.
- Shukla, O.P., Kaul, S.M., Mehlotra, R.K., 1990. Nutritional studies on *Acanthamoeba culbertsoni* and development of chemically defined medium. *J. Protozool.* 37 (3), 237–242.
- Vadehra, D.V., Bain, J.M., Burley, R.W., 1977. Lipid-protein globules of avian egg yolk: isolation and properties of globules stable in concentrated sodium chloride solution. *Biochem. J.* 166, 619–624.
- Visvesvara, G.S., Balamuth, W., 1975. Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J. Protozool. Res.* 22 (2), 245–256.
- Wang, X., Ahearn, D.G., 1997. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* 34 (4), 212–215.



# Synthesis and in vitro activity of new biguanide-containing dendrimers on pathogenic isolates of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba griffini*

T. Martín-Pérez<sup>1</sup> · T. Lozano-Cruz<sup>2,3,4</sup> · A. Criado-Fornelio<sup>1</sup> · P. Ortega<sup>2,3,4</sup> · R. Gómez<sup>2,3,4</sup> · F. J. de la Mata<sup>2,3,4</sup> · J. Pérez-Serrano<sup>1</sup>

Received: 3 December 2018 / Accepted: 29 April 2019 / Published online: 8 May 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

The genus *Acanthamoeba* can cause *Acanthamoeba* keratitis (AK) and granulomatous amoebic encephalitis (GAE). The treatment of these illnesses is hampered by the existence of a resistance stage that many times causes infection relapses. In an attempt to add new agents to our chemotherapeutic arsenal against acanthamebiasis, two *Acanthamoeba* isolates were treated in vitro with newly synthesized biguanide dendrimers. Trophozoite viability analysis and ultrastructural studies showed that dendrimers prevent encystment by lysing the cellular membrane of the amoeba. Moreover, one of the dendrimers showed low toxicity when tested on mammalian cell cultures, which suggest that it might be eventually used as an amoebicidal drug or as a disinfection compound in contact lens solutions.

**Keywords** *Acanthamoeba* · Genotype T3 · Genotype T4 · Trophozoites · Biguanide · Dendrimers

## Introduction

The genus *Acanthamoeba* belongs to the group named free-living amoeba (FLA), which includes also other important gen-

era, such as *Balamuthia* and *Naegleria*. These organisms are environmentally widespread (Maycock and Jayaswal 2016). Some *Acanthamoeba* sp. isolates are pathogens, occasionally causing *Acanthamoeba* keratitis (AK), a rare disease which presents as a corneal inflammation and granulomatous amoebic encephalitis (GAE), an infection of the central nervous system. The incidence of the former illness (AK) is increasing due to the growing numbers of contact lens wearers and to improvements in diagnostic methods (Heredero-Bermejo et al. 2013). In contrast to GAE, AK occurs in immunocompetent individuals. The treatment of these infections is still problematic due to its resistant form (cysts), the capacity of adapting to nutrient starvation, heat, cold, desiccation, and the presence of different chemical compounds which make some drugs ineffective (Marciano-Cabral and Cabral 2003; Coulon et al. 2010). *Acanthamoeba* keratitis (AK) treatment consists of a combination of cationic antiseptics like chlorhexidine with aromatic diamidines such as propamidine isethionate during prolonged periods (Walochnik et al. 2009). Apart from the long period of chemotherapy needed for healing, resistance to propamidine seems to be present in *Acanthamoeba* spp. (Bang et al. 2010). This underlines the need for new and effective drugs for treating AK.

Recent works suggest that a new family of chemicals called dendrimers may be a good chemotherapeutic alternative to classical drugs due to some remarkable pharmacological properties,

---

T. Martín-Pérez and T. Lozano-Cruz contributed equally to this work.

Handling Editor: Julia Walochnik

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06341-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ T. Martín-Pérez  
tania.martinp@edu.uah.es

<sup>1</sup> Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Laboratorio de Parasitología, Grupo ECOMYP, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28805, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Química “Andrés M. del Río” (IQAR), Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, 28805, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Málaga, Spain

<sup>4</sup> Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Ctra. Colmenar Viejo, Km. 9100, 28034 Madrid, Spain

with applications in medical and pharmaceutical fields. Dendrimers are highly branched spherical macromolecules with well-defined structure and high density of active surface groups. The plethora of modification that can be performed in their structures makes dendrimers perfect molecules for any specific application (Mlynarczyk et al. 2017). Specifically, cationic carbosilane dendrimers have shown microbicidal activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as antiprotozoal effects against *Acanthamoeba* trophozoites (Hereadero-Bermejo et al. 2018), using low-generation molecules. In both cases, the mechanism of action of the drug is related to their cationic nature, which facilitates possible interactions between the dendrimer and membranes. On the other hand, polydisperse polymers have also been studied obtaining clearly worse results, showing the important role of the chemical structure in the biomedical area (Ortega et al. 2011; Moreno et al. 2014; Fuentes-Paniagua et al. 2017).

The significant value of dendrimers as amoebicide drugs has been highlighted in some of our previous works. In the last years, we have reported either synergistic effects chlorhexidine gluconate-cationic dendrimers in combination therapy (Hereadero-Bermejo et al. 2016) or low  $IC_{50}$  values in some in vitro treatment assays against *A. polyphaga* with guanidine dendrimers (GU-dendrimers) (Hereadero-Bermejo et al. 2018). It is worth to point out that biguanide moieties (organic groups derived from guanidine) are considered the active groups in chlorhexidine. However, these organic fragments show higher toxicity than guanidine unit. For that reason, in a first attempt, GU-dendrimers were designed to simulate, as far as possible, the properties of chlorhexidine. Interestingly, some quaternary ammonium dendrimers have shown higher antimicrobial activity than do the terminal groups individually considered (multivalency effect) (Chen and Cooper 2000; Ortega et al. 2008; Rasines et al. 2009). Thus, in our opinion biguanide-containing dendrimers should also be studied.

The main purpose of this work was to synthesize and test (both in vitro and ex vivo) new biguanide-containing dendrimers (biGU-dendrimers) as novel drugs against *A. polyphaga* and *A. griffini* trophozoites. Looking for an adequate balance between hydrophilic and hydrophobic parts of the skeleton, the macromolecules selected were first- and second-generation carbosilane dendrimers with four and eight biguanide surface moieties respectively. Moreover, a non-dendritic system called “zero generation” was used only to optimize the reaction conditions employed in biGU-dendrimer synthetic route, albeit no biological assays were carried out with it.

## Materials and methods

### General considerations

Reagents and solvents were used as received without further purification. Reactions were carried out under microwave

irradiation using single-mode Initiator 2.5 equipment from Biotage AB. The instrument consisted of a continuous focused microwave power delivery system that reaches and maintains a preselected temperature. Reactions were performed with stirring in crimped, standard Pyrex septum-sealed vessels (5 ml). Measured reaction times start when the solution reaches the selected temperature. NMR spectra were recorded on a Varian Unity VXR-300 (300.13 ( $^1\text{H}$ ), 75.47 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz), or on a Bruker AV400 (400.13 ( $^1\text{H}$ ), 100.60 ( $^{13}\text{C}$ ), and 79.49 ( $^{29}\text{Si}$ ) MHz). Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  resonances were measured relative to solvent peaks considering TMS = 0 ppm. When necessary, assignment of resonances was done from HSQC to HMBC NMR experiments. Elemental analyses were performed on a LECO CHNS-932. Compounds dicyandiamide, trimethylsilyl chloride (TMSCl), and chlorhexidine digluconate (CLX) were obtained from commercial sources. Compounds  $G_n\text{Si}(\text{NH}_2)_m$  ( $n = 0, m = 1$  (I);  $n = 1, m = 4$  (II), and  $n = 2, m = 8$  (III)) were synthesized as published (Bermejo et al. 2007; Maroto-Díaz et al. 2016).

### Dendrimers: nomenclature and synthesis

The nomenclature  $G_n\text{Si}(X)_m$  used in this work describes the structure of macromolecules as follows:  $G_n$  corresponds with skeleton generation ( $n$ ),  $Si$  indicates core nature,  $X$  refers to the type of peripheral groups (amine or biguanide fragments), and  $m$  indicates number of surface moieties.

Microwave-assisted synthesis was employed to prepare all desired dendrimers using reported amine microwave conditions (Mayer et al. 2004). Into a 5-ml microwave vial, the amino-terminated dendrimer (I–III) (1.0 equiv.) and dicyandiamide (1.0 equiv. per amine group) were added. After the vial was sealed and crimped,  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2 ml) was added and this was followed by the addition of a 2 N solution of TMSCl (1.1 equiv. per amine group) dropwise. The reaction mixture was stirred for 10 s and subsequently, it was irradiated at 150 °C for 10 min. After the mixture was cooled to approximately 50 °C,  $^i\text{PrOH}$  (3.0 equiv. per amine group) was added dropwise. The mixture was stirred for 10 s and then irradiated a second time at 125 °C for 30 s. Upon cooling, the obtained biguanide hydrochloride solid salt was collected, washed with  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $2 \times 1$  ml), and dried in vacuum.

### Chlorhexidine digluconate

Chlorhexidine digluconate (CLX–Sigma-Aldrich Ltd., St Louis, MO, USA), a cationic product, was used in in vitro assays as standard drug in controls (due to its remarkable amoebicidal activity against *Acanthamoeba* trophozoites).

## Acanthamoeba strains

The strains used were *A. polyphaga* 2961, identified as genotype T4 (a clinical isolate kindly supplied by Dr. E. Hadas, Poznan University of Medical Sciences, Poland) and *A. griffini* MYP2004, which was isolated from a contact lens from a patient with AK in Spain and belongs to genotype T3 (Herederó-Bermejo et al. 2015a). *A. polyphaga* is cultured axenically in PYG medium supplement with 2% bactocastone and maintained at 32 °C, while *A. griffini* is cultured axenically in CERVA and maintained at 37 °C.

## In vitro amoebicide assays

The amoebicidal activity of the two dendrimers named 2 and 3 and CLX was assayed in sterile 24-well microtiter plates.

Amoeba from log-phase cultures ( $100 \cdot 10^3$  trophozoites) were inoculated in microplates. Drugs assays contained 300  $\mu$ l of PBS 1x and 300  $\mu$ l of the drug solution per well. There was a control for growth (positive control), including only medium, amoeba, and PBS 1x (instead of drug solution). Finally, the negative control was composed of medium and water but contained no amoeba. Each drug concentration and control were done in triplicate and each experiment was done at least twice. The plates were incubated at 32 or 37 °C during 4 and 24 h.

## Trophocidal properties of the dendrimers and chlorhexidine digluconate

Trophozoite viability was assessed by direct counting, using the 0.2% Congo red exclusion assay (Herederó-Bermejo et al. 2015b). Samples were placed in a Fuchs–Rosenthal manual counting chamber and trophozoites counted using an optical microscope (Carl Zeiss).

In addition, the cytotoxic effects of drugs were studied by scanning electron microscopy (SEM). Biological samples were prepared for observation as previously described by Herederó-Bermejo et al. (2015a).

## Cytotoxicity test on human corneal epithelial cells and HeLa cells

The non-cytotoxic dose of the dendrimers and chlorhexidine digluconate was determined by Microculture Tetrazolium Assay (MTT, Sigma-Aldrich Ltd.) using human corneal epithelial cells (HCEC) and HeLa cells as previously reported elsewhere (Herederó-Bermejo et al. 2015b), but with some slight modifications. These consisted in the following: in the case of HCEC, wells were coated with collagen and then seeded with two  $\cdot 10^4$  cells instead of five  $\cdot 10^4$ ; in addition, IM-Corneal Epithelial Cell medium (Innoprot) was used for such cell line. Changes in HeLa cell cultures consisted in the

absence of the collagen coating in wells and lower cell inoculum (one  $\cdot 10^4$  cells instead of five  $\cdot 10^4$ ).

## Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Results are given as means  $\pm$  SD of values obtained from two independent experiments. The percent cell survival was obtained for each concentration of drug at 4 and 24 h (as stated above). The IC<sub>50</sub> values were calculated by linear regression analysis using GraphPad Prism 5® (with a 95% confidence limit). The significance of differences to control was determined using two-way ANOVA test for independent samples and two-tailed Student's *t* test. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5®.

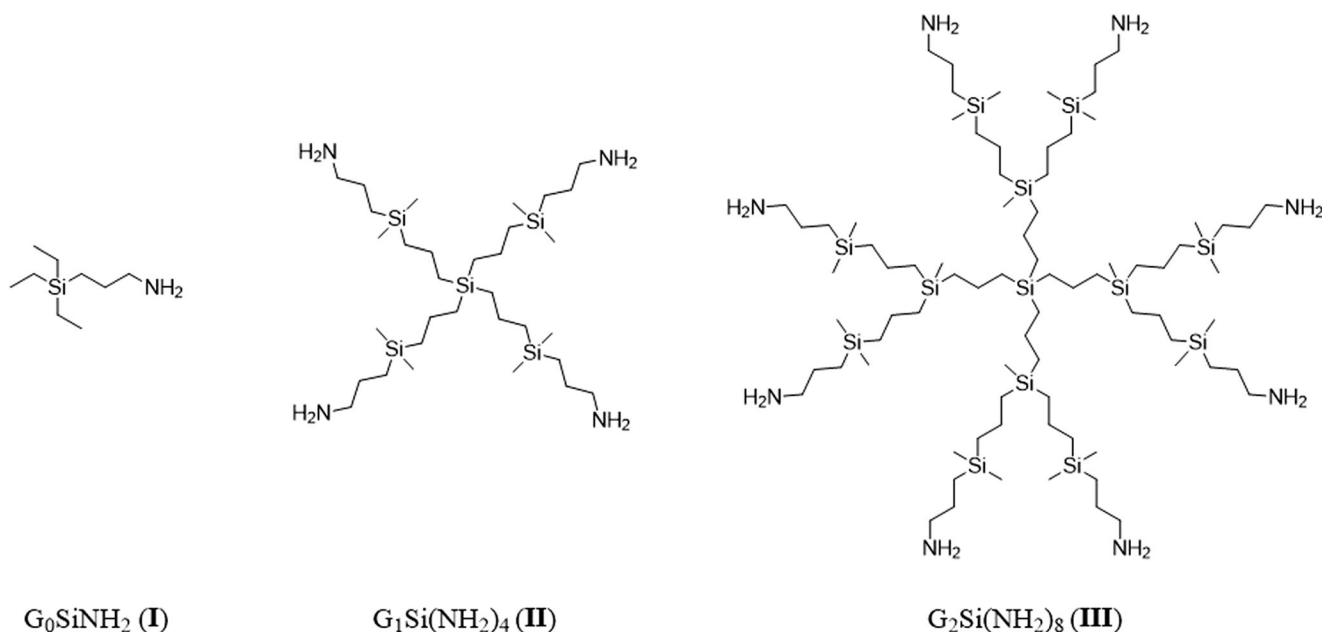
## Results

### Synthesis and characterization

Different generations of amine-terminated carbosilane dendrimers  $G_nSi(NH_2)_m$  ( $n = 0, m = 1$  (I);  $n = 1, m = 4$  (II), and  $n = 2, m = 8$  (III)) (Maroto-Díaz et al. 2016; Bermejo et al. 2007) (Fig. 1) were selected as starting materials to prepare the corresponding biguanide-functionalized dendrimers (biGU-dendrimers) by microwave chemistry. Microwave heating can accelerate reaction time reducing it from days or hours to minutes. Moreover, this technique offers several advantages over conventional heating such as higher yields, simplest purification methods, and less by-products formation.

The Scheme 1 represents the two-step synthetic route employed, which lasts approximately 10 min. Microwave irradiation of neutral dendrimers I–III in the presence of dicyandiamide, TMSCl and <sup>1</sup>PrOH, yielded water-soluble cationic macromolecules  $G_nSi(biGU)_m$  ( $n = 0, m = 1$  (1);  $n = 1, m = 4$  (2), and  $n = 2, m = 8$  (3)) with different number of biguanide moieties on the surface (Fig. 2), using CH<sub>3</sub>CN as solvent.

Compounds 1–3 were characterized by NMR spectroscopy and elemental analysis. One-dimensional TOCSY experiment was necessary to confirm the inclusion of the biguanide unit, due to the fact that the selected deuterated solvent (CD<sub>3</sub>OD) presents resonances in the same range than the studied dendrimers (3.34 ppm). Moreover, two-dimensional HSQC and HMBC experiments were used to support the proposed structure (Fig. 3). The <sup>1</sup>H-NMR spectrum for compound 1–3, compared to the amine precursors I–III, shows the shifting to higher frequency of the signals corresponding to the terminal -CH<sub>2</sub>N group (c) (from  $\delta$  2.60 ppm in I–III to  $\delta$  3.32 ppm in 1–3). It is important to underline that <sup>1</sup>H-NMR spectrum from non-dendritic compound (1) presents the characteristic resonances corresponding to ethyl fragment at  $\delta$  0.59 ppm (-CH<sub>2</sub>-)



**Fig. 1** Carbosilane precursors employed in biGU-dendrimers synthesis

(f) and  $\delta$  0.97 ppm ( $-\text{CH}_3$ ) (g) while dendritic systems present classical signals for carbosilane skeleton (Krupková and Čermák 2010).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR spectra exhibit resonances for each previously mentioned group highlighting the methylene group attached to the biguanide group  $-\text{CH}_2\text{N}$  (c) at  $\delta$  47.5 ppm. The biguanide carbon atoms were observed at  $\delta$  153.3 ppm (b) for  $\text{HN}=\text{C}=\text{NH}$  and  $\delta$  153.6 ppm (a)  $\text{HN}=\text{C}-\text{NH}_2$  for zero-generation molecule but not in the case of dendrimers. This phenomenon has been also detected in the literature for some biguanide mononuclear compounds (Mayer et al. 2004).

### Trophocidal properties of the dendrimers and chlorhexidine digluconate

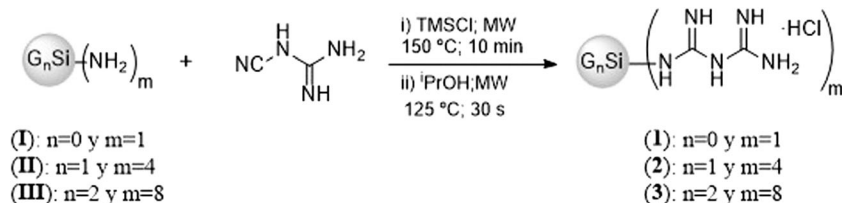
The amoebicidal activity of the dendrimers 2 and 3 (Fig. 2) was evaluated in vitro. Figure 4 shows the viability percentages of amoebic cultures (obtained after 4 h and 24 h of drug treatment). CLX is more effective at 4-h treatment than the two dendrimers at all concentrations tested. Moreover, it can be observed that CLX is able to kill 100% of the amoeba at concentrations of 16 mg/ml after 24-h treatment, while at that concentration both dendrimers do not eliminate all the trophozoites ( $\sim 10\%$  remaining alive) (Fig. 4a). Apparently, CLX

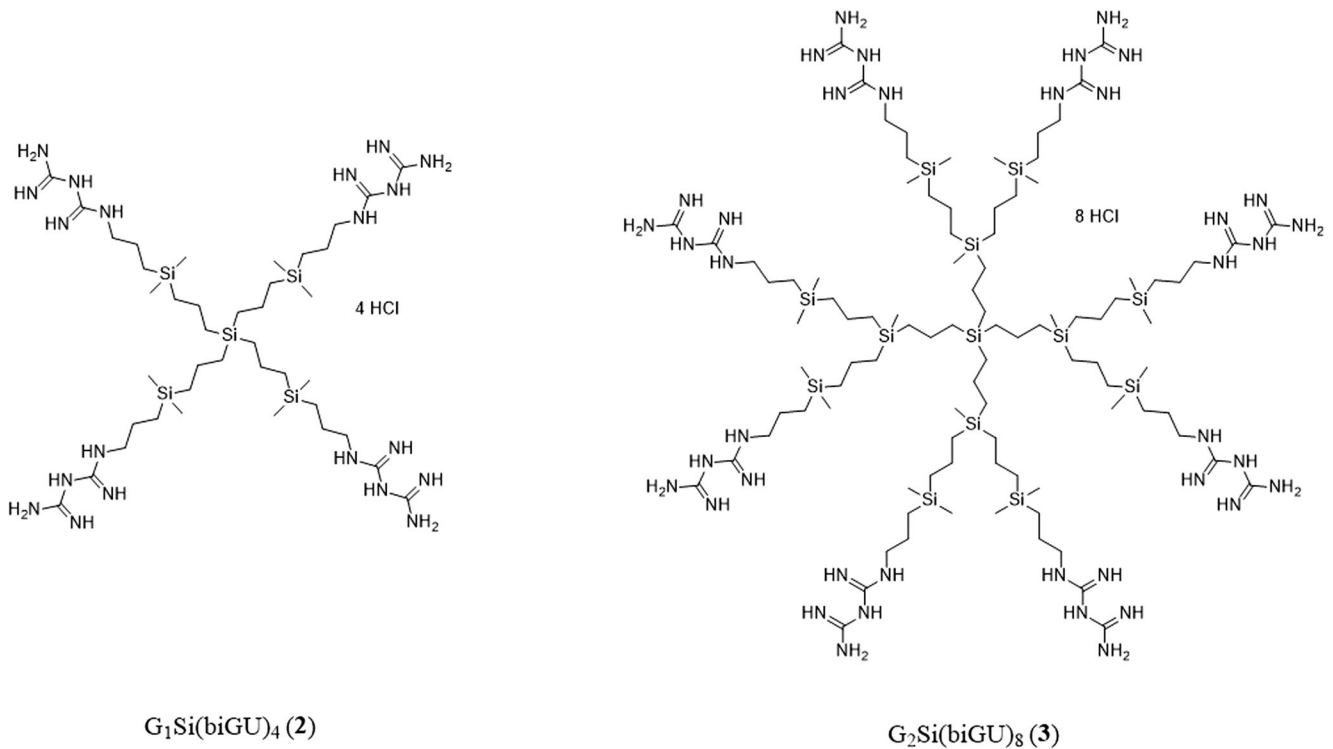
exhibits more efficacy, but if the molecular mass is considered as variable for concentration (Fig. 4b), after 24 h treatment the dendrimer 3 is more or less as effective as the CLX ( $\sim 6 \mu\text{M}$  is 100% lethal for the amoeba).

The corresponding  $\text{IC}_{50}$  after 24-h treatment values are shown in Tables 1 and 2. There were no statistically significant differences between treatments after 4 or 24 h, albeit amoebicidal effect was higher at 24 h. The differences in effectivity among both dendrimers and CLX were non-significant ( $p > 0.05$ ). The effect of the biguanide dendrimers on the *Acanthamoeba* trophozoites was dependent on the dendrimer generation and its concentration, being the most effective, the second-generation dendrimer 3 which shows similar activity than CLX (non-significant differences), while first-generation dendrimer 2 is about 50% less active (see Fig. 4 and Tables 1 and 2). The higher number of biguanide residues present in dendrimer 3 (eight groups) compared to dendrimer 2 (four groups) could explain the higher effectiveness shown by the second-generation dendrimer. Furthermore, it can be noticed that *A. griffini* MYP2004 (genotype T3) is more resistant to amoebicides than *A. polyphaga* 2961 (genotype T4).

In SEM images (Fig. 5), some structural alterations were found in treated amoeba and consisted in reduction on size, loss of acanthopodia, and roundness, along with

**Scheme 1** Synthetic route for  $G_n\text{Si}(\text{biGU})_m$  ( $n=0, m=1$  (1);  $n=1, m=4$  (2), and  $n=2, m=8$  (3)) preparation.



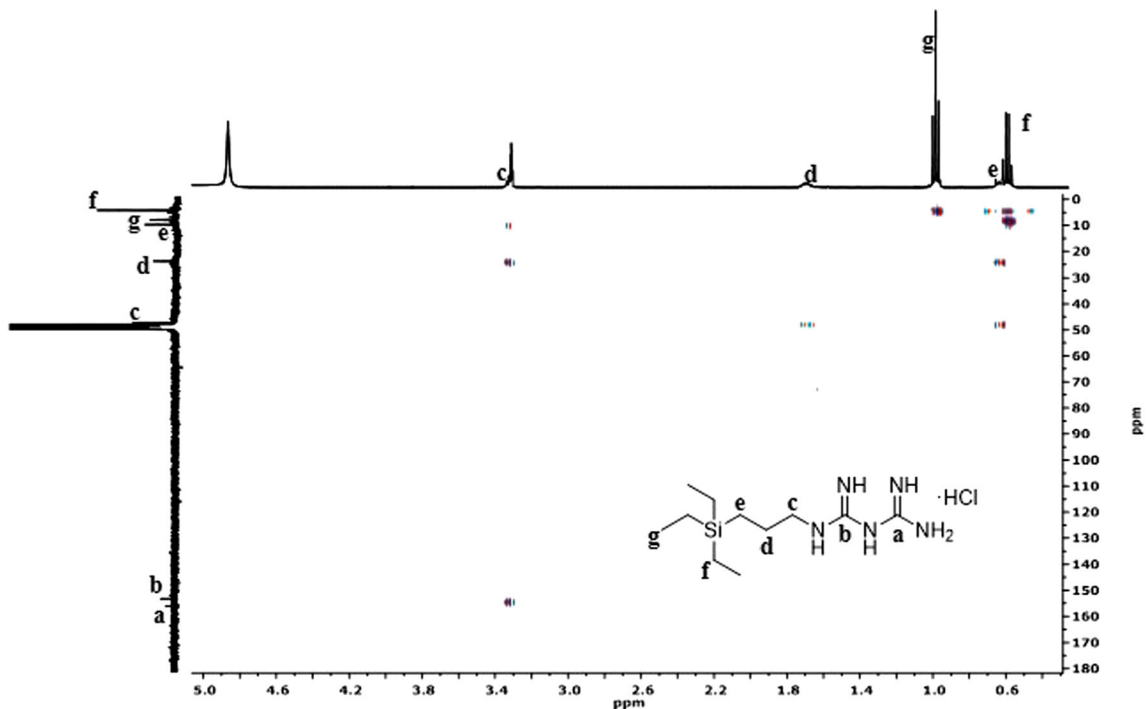


**Fig. 2** Drawing of biGU-terminated carboxilane dendrimers 2 and 3

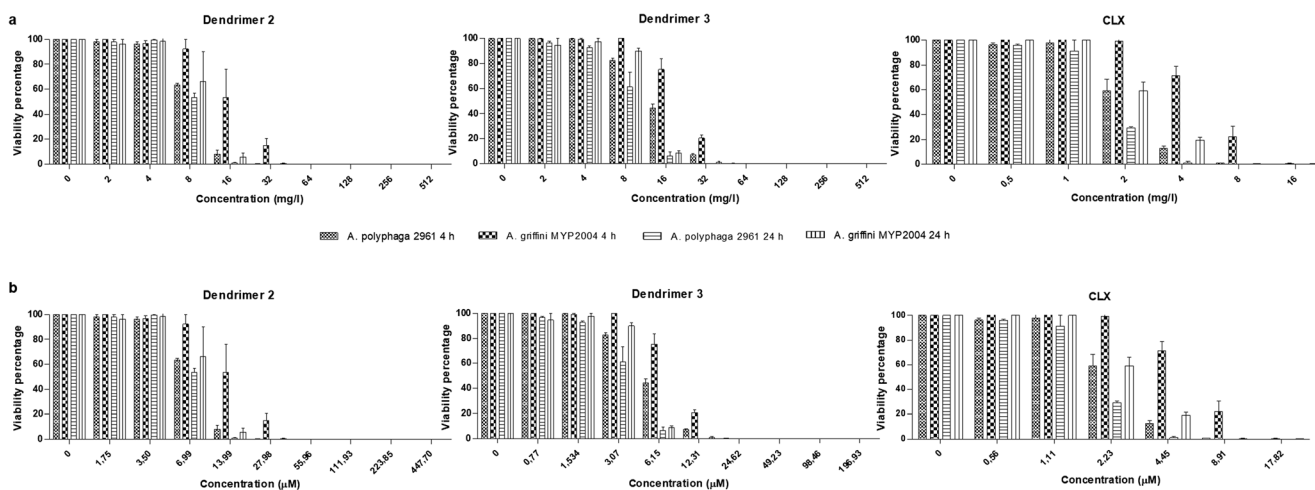
the presence of organic residues. In contrast, trophozoites treated with chlorhexidine digluconate showed no accompanying organic residues. Trophozoites in controls always showed their standard size and shape (with numerous acanthopodia).

### Cytotoxicity test on human corneal epithelial cells and HeLa cells

Cytotoxicity assays on mammalian cells were carried out in HCEC and HeLa cell lines (Tables 1 and 2). Those compounds



**Fig. 3** HMBC spectrum of compound 1 ( $CD_3OD$ )



**Fig. 4** Viability percentages of *A. polyphaga* 2961 and *A. griffini* MYP2004 after 4-h and 24-h treatment with dendrimers and CLX. **a** Concentrations expressed in mg/L and **b** concentrations expressed in  $\mu\text{M}$

showing  $\text{IC}_{50}$  values lower for trophozoites than for mammalian cells after 24 h of incubation ( $p$  value < 1) were considered as non-cytotoxic. Thus, dendrimers and CLX were less toxic for *A. polyphaga* than for *A. griffini*. In the case of the dendritic systems, differences between  $\text{IC}_{50}$  values in trophozoites and mammalian cells were higher than for the commercial drug. Specifically, the  $\text{IC}_{50}$  data for second generation-dendrimer 3 could not be calculated due to the fact that a 50% reduction of viability in the studied concentration range could not be obtained (Fig. 6). Moreover, CLX exhibits cytotoxicity in HCEC cells. The differences between the  $\text{IC}_{50}$  of dendrimers in *Acanthamoeba* and mammalian cells are higher so that the therapeutic window is wider. This means that if these drugs are used against resistant amoebic isolates, their concentrations can be raised without causing mammalian cytotoxicity complications.

Consequently, the most promising macromolecule was the dendrimer 3, which showed noticeable negative effects on amoebae survival, but being harmless to mammalian cells, unlike CLX that is a good amoebicide, but quite toxic for host cells.

## Discussion

There is no reference treatment for AK and GAE in any country. The diamidines and biguanides are the most used drugs in AK

**Table 1**  $\text{IC}_{50}$  values for the dendrimers studied and CLX against *A. polyphaga* 2961 trophozoites and HCEC and HeLa cells after 24 h of treatment. Drug concentrations are in  $\mu\text{M}$  unit. The statistical analysis employed for the comparison of data in the first row (amoeba  $\text{IC}_{50}$ ) and

	$\text{IC}_{50}$ <i>A. polyphaga</i> 2961	$\text{IC}_{50}$ HCEC cells/ $p$ value	$\text{IC}_{50}$ HeLa cells/ $p$ value
Dendrimer 2	$4.61 \pm 1.35$	$10.77 \pm 2.03/0.83$	$23.72 \pm 1.49/0.79$
Dendrimer 3	$1.61 \pm 1.57$	NA/0.01	NA/0.05
CLX	$0.72 \pm 1.90$	$1.59 \pm 1.33/0.75$	$9.13 \pm 1.60/0.86$

treatment, while for GAE, a combination of ketoconazole, fluconazole, sulfadiazine, pentamidine, isethionate, amphotericin B, voriconazole, and miltefosine have been successfully used in some instances (Baig et al. 2013). Many times, cystic stage forms are responsible for ineffective results in chemotherapy. In addition, the effectiveness of contact lens solutions must be taken into account since most cases of AK are contact lens wearers (Pacella et al. 2013). Most commercial solutions for contact lens cleaning containing polyhexamethylene biguanide (PHMB) showed little efficacy against *Acanthamoeba* cysts (Ibrahim et al. 2009; Costa de Aguiar et al. 2013; Moon et al. 2016). There are, however, examples of drugs causing lethal effects both on trophozoites and cysts (Baig et al. 2013; Shoff et al. 2008), including some new cationic dendrimers (Heredero-Bermejo et al. 2018). A possible drawback of the aforementioned studies is that only *Acanthamoeba* genotype T4 isolates were studied. This is the most common genotype in clinical cases, but it is the most sensitive to antiprotozoal drugs. It is important to underline that other genotypes (e.g., T3 and T5) are considered more resistant to amoebicides (Iovieno et al. 2010; Amalich-Montiel et al. 2014). This fact was confirmed by the present study, where the genotype T3 isolate was more resistant to biguanide dendrimers and chlorhexidine digluconate than the T4 isolate. Regarding cytotoxicity of the compounds tested in mammalian cells, it was evident that CLX is the most

those in mammalian cells was a paired Student's  $t$  test. Statistically significant differences were found in all cases ( $P < 0.05$ ). NA: not applicable (toxicity was too low as to obtain an  $\text{IC}_{50}$  value)

**Table 2** IC<sub>50</sub> values for the dendrimers studied and CLX against *A. griffini* MYP2004 trophozoites and HCEC and HeLa cells after 24 h of treatment. Drug concentrations are in  $\mu$ M unit. The statistical analysis employed for the comparison of data in the first row (amoeba IC<sub>50</sub>) and

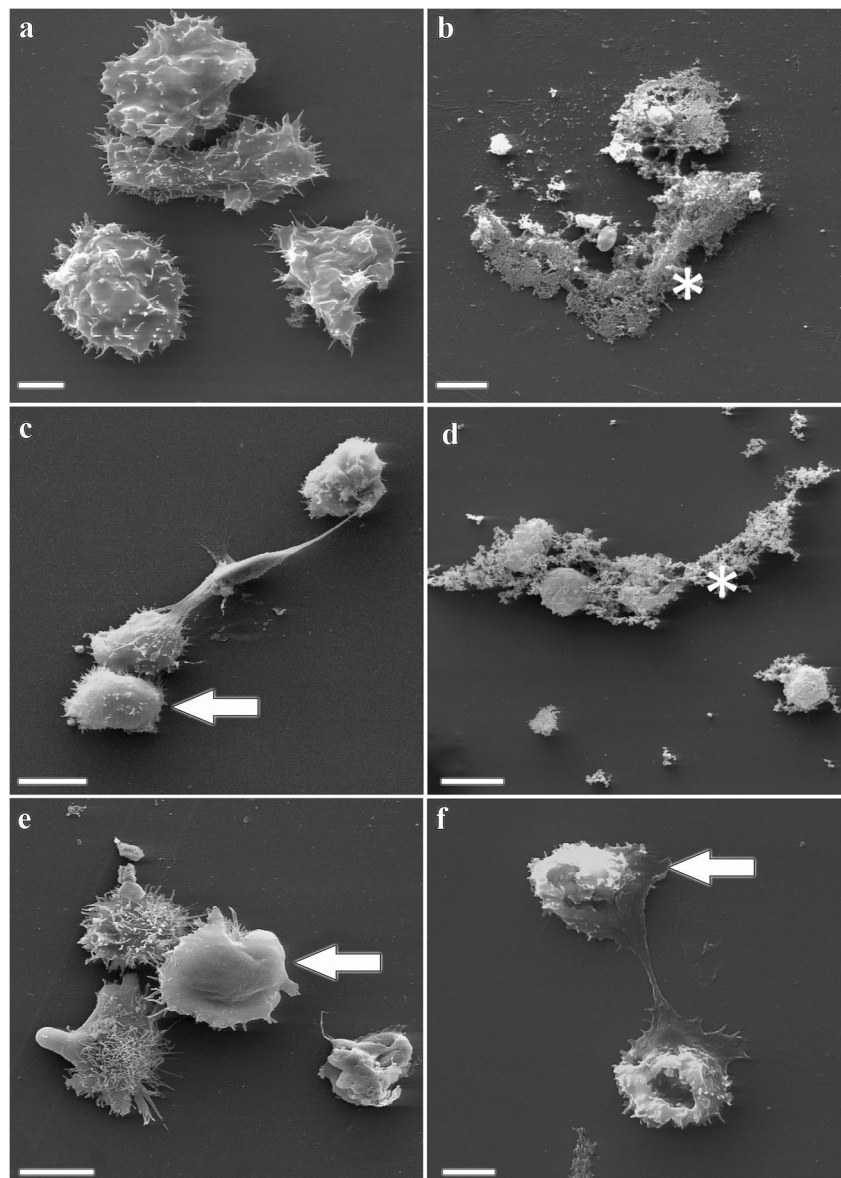
those in mammalian cells was a paired Student's *t* test. Statistically significant differences were found in all cases ( $P < 0.05$ ). NA: not applicable (toxicity was too low as to obtain an IC<sub>50</sub> value)

	IC <sub>50</sub> <i>A. griffini</i> MYP2004	IC <sub>50</sub> HCEC cells/ <i>p</i> value	IC <sub>50</sub> HeLa cells/ <i>p</i> value
Dendrimer 2	5.58 ± 1.45	10.77 ± 2.03/0.89	23.72 ± 1.49/0.85
Dendrimer 3	2.62 ± 1.70	NA/0.02	NA/0.09
CLX	1.67 ± 1.47	1.59 ± 1.33/0.99	9.13 ± 1.60/0.84

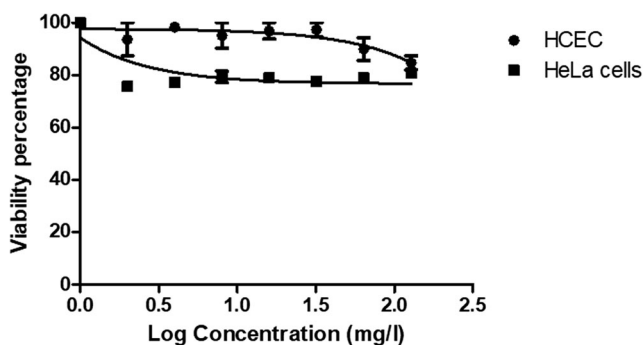
cytotoxic drug, followed by dendrimers 2 and 3, the latter (3) being not cytotoxic at all in the assayed concentration range. Drug cytotoxicity is not always evaluated in vitro and many times these assays are performed in non-human and non-corneal cells (Martín-Navarro et al. 2013; Cabello-Vilchez

et al. 2014; Kuźma et al. 2015). Hence, it is difficult to ascertain if a compound that is effective in killing the amoeba in vitro will be toxic in future in vivo treatments in the cornea. Furthermore, it is hard to compare the results of different in vitro treatments due to the lack of standardized procedures for determining drug

**Fig. 5** Effects of dendrimer treatment (24 h) on trophozoite morphology as observed by scanning electron microscopy (SEM). **a** *A. polyphaga* 2961 control, **b** *A. polyphaga* 2961 treated with 4 mg/L (3.50  $\mu$ M) of the dendrimer 2, **c** *A. griffini* MYP2004 treated with 4 mg/L (3.50  $\mu$ M) of the dendrimer 2, **d** *A. polyphaga* 2961 treated with 4 mg/L (1.53  $\mu$ M) of the dendrimer 3, **e** *A. griffini* MYP2004 treated with 4 mg/L (1.53  $\mu$ M) of the dendrimer 3, **f** *A. polyphaga* 2961 treated with 2 mg/L (1.11  $\mu$ M) of CLX. The scale bar is 5  $\mu$ m in all the images, except in **a** and **f**, where it is 10  $\mu$ m. At some concentrations, the trophozoites are lysed (marked with an asterisk). The loss of acanthopodia in trophozoites is marked with arrows







**Fig. 6** Cytotoxic effect of the dendrimer 3 in HCEC and HeLa cells

efficacy, as pointed out by Johnston et al. (2009). Nevertheless, previous studies in our laboratory showed that other ammonium salts terminated-dendrimers (also with silica or polyphenoxo core) are less effective against *Acanthamoeba* sp. than those evaluated in the present work, needing higher concentrations to reach similar IC<sub>50</sub> values (Heredero-Bermejo et al. 2015b).

In conclusion, this study highlights that dendrimers are promising as amoebicides, taking into account the abundance of modifications that can be introduced in their structures (Młynarczyk et al. 2017). Specifically, introduction of biguanides moieties at the periphery provides toxic effects on amoeba but not on mammalian cells, being the second-generation dendrimer 3 with eight biguanide fragments, the most effective anti-amoebic agent. The activity of this new dendritic molecule is not only remarkable respect to the commercial CLX drug, but also in comparison with other similar dendrimers previously analyzed.

Further studies in this field should evaluate the possible synergy dendrimer-CLX, as previously pointed out by Heredero-Bermejo et al. (2016) in order to ensure that amoebicidal effects occur both on trophozoites and cysts. This should lead to improvements in our current chemotherapeutic arsenal against AK.

**Acknowledgments** We wish to thank Antonio Priego and Mr. José Antonio Pérez (Microscopy Unit–CAI Medicina y Biología de la Universidad de Alcalá) for assistance with scanning electron microscopy and Ángel Pueblas (Photography Unit–CAI Medicina y Biología de la Universidad de Alcalá) for expert help with photographic work.

**Funding information** This work was supported by grants CTQ2017-86224-P (from MINECO), Consortium NANODENDMED-II-CM (B2017/BMD-3703), IMMUNOTHERCAN-CM (B2017/BMD3733), and Universidad de Alcalá CCG2016/BIO-023. CIBER-BBN as an initiative funded by the VI National R&D&i Plan 2008–2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions, and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund.

## References

Amalich-Montiel F, Lumbreras-Fernández B, Martín-Navarro CM, Valladares B, Lopez-Velez R, Morcillo-Laiz R, Lorenzo-Morales J (2014) Influence of *Acanthamoeba* genotype on clinical course and

outcomes of patients with *Acanthamoeba* keratitis in Spain. *J Clin Microbiol* 52:1213–1216. <https://doi.org/10.1128/JCM.00031-14>

Baig AM, Iqbal J, Khan NA (2013) In vitro efficacy of clinically available drugs against growth and viability of *Acanthamoeba castellanii* keratitis isolate belonging to the T4 genotype. *Antimicrob Agents Chemother* 57(8):3561–3567. <https://doi.org/10.1128/AAC.00299-13>

Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD (2010) Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 149(1):66–69. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2009.08.004>

Bermejo JF, Ortega P, Chonco L, Eritja R, Samaniego R, Müllner M, de Jesus E, de la Mata FJ, Flores JC, Gómez R, Muñoz-Fernández MA (2007) Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chem Eur J* 13(2):483–495. <https://doi.org/10.1002/chem.200600594>

Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Reyes-Battle M, Sifaoui I, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2014) Voriconazole as a first-line treatment against potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from Peru. *Parasitol Res* 113(2):755–759. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3705-8>

Chen CZ, Cooper SL (2000) Recent advances in antimicrobial dendrimers. *Adv Mater* 12(11):843–846. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(200006\)12:11<843::AID-ADMA843>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(200006)12:11<843::AID-ADMA843>3.0.CO;2-T)

Costa de Aguiar AP, Oliveira-Silveira C, Toderó-Winck MA, Brittes-Rott M (2013) Susceptibility of *Acanthamoeba* to multipurpose lens-cleaning solutions. *Acta Parasitol* 58:304–308

Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V (2010) Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol* 48(8):2689–2697. <https://doi.org/10.1128/JCM.00309-10>

Fuentes-Paniagua E, Hernández-Ros JM, Soliveri J, Copa-Patiño JL, Gómez R, Sánchez-Nieves J, de la Mata FJ (2017) Strategies for penicillin V dendronization with cationic carbosilane dendrons and study of antibacterial properties. *Can J Chem* 95(9):927–934. <https://doi.org/10.1139/cjc-2017-0059>

Heredero-Bermejo I, Copa-Patiño JL, Soliveri J, García-Gallego S, Rasines B, Gómez R, Pérez-Serrano J (2013) In vitro evaluation of the effectiveness of new water-stable cationic carbosilane dendrimers against *Acanthamoeba castellanii* UAH-T17c3 trophozoites. *Parasitol Res* 112(3):961–969. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3216-z>

Heredero-Bermejo I, Criado-Fornelio A, De Fuentes I, Soliveri J, Copa-Patiño JL, Pérez-Serrano J (2015a) Characterization of a human-pathogenic *Acanthamoeba griffini* isolated from a contact lens-wearing keratitis patient in Spain. *Parasitology* 142(2):363–373

Heredero-Bermejo I, Copa-Patiño JL, Soliveri J, Fuentes-Paniagua E, de la Mata FJ, Gomez R, Perez-Serrano J (2015b) Evaluation of the activity of new cationic carbosilane dendrimers on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba polyphaga*. *Parasitol Res* 114(2):473–486

Heredero-Bermejo I, Sanchez-Nieves J, Soliveri J, Gomez R, de la Mata FJ, Copa-Patino JL, Perez-Serrano J (2016) In vitro anti-*Acanthamoeba* synergistic effect of chlorhexidine and cationic carbosilane dendrimers against both trophozoite and cyst forms. *Int J Pharm* 509(1–2):1–7

Heredero-Bermejo I, Hernández-Ros JM, Sánchez-García L, Maly M, Verdú-Expósito C, Soliveri J, de la Mata FJ, Copa-Patiño JL, Pérez-Serrano J, Sánchez-Nieves J, Gómez R (2018) Ammonium and guanidine carbosilane dendrimers and dendrons as microbicides. *Eur Polym J* 101:159–168. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.025>

Ibrahim YW, Boase DL, Cree IA (2009) How could contact Lens wearers be at risk of *Acanthamoeba* infection? A review. *J Optom* 2:60–66. <https://doi.org/10.3921/joptom.2009.60>

Iovieno A, Oechsler RA, Ledee DR, Miller D, Alfonso EC (2010) Drug-resistant severe *Acanthamoeba* keratitis caused by rare T5 *Acanthamoeba* genotype. *Eye Contact Lens* 36(3):183–184. <https://doi.org/10.1097/ICL.0b013e3181da2350>

- Johnston SP, Sriram R, Qvamstrom Y, Roy S, Verani J, Yoder J, Lorick S, Roberts J, Beach MJ, Visvesvara G (2009) Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *J Clin Microbiol* 47:2040–2045. <https://doi.org/10.1128/JCM.00575-09>
- Krupková A, Čermák J (2010) Structural defects in polyallylcarbosilane dendrimers and their polyol derivatives characterized by NMR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Macromolecules* 43:4511–4519. <https://doi.org/10.1021/ma100315w>
- Kuźma Ł, Derda M, Hadaś E, Wysokińska H (2015) Abietane diterpenoids from *Salvia sclarea* transformed roots as growth inhibitors of pathogenic *Acanthamoeba* spp. *Parasitol Res* 114(1):323–327. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4211-3>
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* sp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16:273–307. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>
- Maroto-Díaz M, Elie BT, Gómez-Sal P, Pérez-Serrano J, Gómez R, Contel M, de la Mata FJ (2016) Synthesis and anticancer activity of carbosilane metalodendrimers based on arene ruthenium (ii) complexes. *Dalton Trans* 45(16):7049–7066. <https://doi.org/10.1039/C6DT00465B>
- Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Amalich-Montiel F, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2013) Evaluation of the *in vitro* activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251(9):2111–2117
- Maycock NJ, Jayaswal R (2016) Update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, treatment, and outcomes. *Cornea* 35(5):713–720. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000804>
- Mayer S, Daigle DM, Brown ED, Khatri J, Organ MG (2004) An expedient and facile one-step synthesis of a biguanide library by microwave irradiation coupled with simple product filtration. Inhibitors of dihydrofolate reductase. *J Comb Chem* 6(5):776–782. <https://doi.org/10.1021/cc049953+>
- Młynarczyk DT, Kocki T, Goslinski T (2017) Dendrimer structure diversity and tailorability as a way to fight infectious diseases. In *Nanostructured Materials-Fabrication to Applications*. (ed) InTech, pp 111–134
- Moon EK, Park HR, Quan FS, Kong HH (2016) Efficacy of Korean multipurpose contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol* 54:697–702. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.6.697>
- Moreno S, Lozano-Cruz T, Ortega P, Tarazona MP, de la Mata FJ, Gómez R (2014) Synthesis of new amphiphilic water-stable hyperbranched polycarbosilane polymers. *Polym Int* 63(7):1311–1323. <https://doi.org/10.1002/pi.4679>
- Ortega P, Copa-Patiño JL, Muñoz-Fernández MA, Soliveri J, Gómez R, de la Mata FJ (2008) Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies. *Org Biomol Chem* 6:3264–3269. <https://doi.org/10.1039/b809569h>
- Ortega P, Cobaleda BM, Hernández-Ros JM, Fuentes-Paniagua E, Sánchez-Nieves J, Tarazona MP, Copa-Patiño JL, Soliveri J, de la Mata FJ, Gómez R (2011) Hyperbranched polymers versus dendrimers containing a carbosilane framework and terminal ammonium groups as antimicrobial agents. *Org Biomol Chem* 9(14):5238–5248. <https://doi.org/10.1039/c1ob05321c>
- Pacella E, La Torre G, De Giusti M, Brillante C, Lombardi AM, Smaldone G, Pacella F (2013) Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Ophthalmol* 7:991. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S43471>
- Rasines B, Hernández-Ros JM, de las Cuevas N, Copa-Patiño JL, Soliveri J, Muñoz-Fernández MA, Gómez R, de la Mata FJ (2009) Water-stable ammonium-terminated carbosilane dendrimers as efficient antibacterial agents. *Dalton Trans*:8704–8713. <https://doi.org/10.1039/b909955g>
- Shoff ME, Joslin CE, Tu EY, Kubatko L, Fuerst PA (2008) Efficacy of contact lens systems against recent clinical and tap water *Acanthamoeba* isolates. *Cornea* 27:713–719. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31815e7251>
- Walochnik J, Obwaller A, Gruber F, Mildner M, Tschachler E, Suchomel M, Auer H (2009) Anti-*Acanthamoeba* efficacy and toxicity of miltefosine in an organotypic skin equivalent. *J Antimicrob Chemother* 64(3):539–545. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp215>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

