



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS

*EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO INMUNOCONJUGADO DE ISETIONATO DE
PROPAMIDINA Y ANTICUERPOS POLICLONALES PARA QUERATITIS POR
ACANTHAMOEBA GRIFFINI EN HÁMSTERES DORADOS (MESOCRICETUS
AURATUS)*

PRESENTA

Sandra Lizbeth Aguilera Martínez

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TUTOR

Dr. en C. Luis Fernando Barba Gallardo

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. en C. Manuel Enrique Ávila Blanco

M. C. O. Elizabeth Casillas Casillas

Aguascalientes, Ags., junio de 2022

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO
DECANO (A) INTERINA DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **SANDRA LIZBETH AGUILERA MARTÍNEZ** con ID 140436 quien realizó la tesis titulado: **EFFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO INMUNOCONJUGADO DE ISETIONATO DE PROPAMIDINA Y ANTICUERPOS POLICLONALES PARA QUERATITIS POR ACANTHAMOEBA GRIFFINI EN HÁMSTERES DORADOS (MESOCRICETUS AURATUS)**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

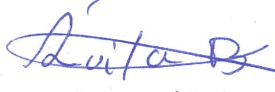
ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 01 de junio de 2022.


Dr. en C. Luis Fernando Barba Gallardo
Tutor de tesis


M. C. O. Elizabeth Casillas Casillas
Co-Tutor de tesis


Dr. en C. Manuel Enrique Ávila Blanco
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 01/06/2022

NOMBRE: SANDRA LIZBETH AGUILERA MARTÍNEZ ID 140436

PROGRAMA: MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA LGAC (del posgrado): BIOMEDICINA MOLECULAR Y CELULAR

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO INMUNOCONJUGADO DE ISETIONATO DE PROPAMIDINA Y ANTICUERPOS POLICLONALES PARA QUERATITIS POR ACANTHAMOEBA GRIFINI EN HÁMSTER DORADO (MESOCRICETUS AURATUS).

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Esta tesis genera conocimiento sobre el manejo de pacientes con keratitis por Acanthamoeba y la remisión de sus daños tisulares

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
No				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
N.A.				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.				El estudiante es el primer autor
N.A.				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí X
No

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

FIRMAS

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DRA. PAULINA ANDRÉS DE LOZANO

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.


Manuscript submitted - PIM-2022-0055

Pavikala Sunny <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Jun 02/06/2022 02:05 AM

Para: fernando.barba@edu.uaa.mx <fernando.barba@edu.uaa.mx>

CC: sandra_lizbeth_29@hotmail.com <sandra_lizbeth_29@hotmail.com>; meab21@gmail.com <meab21@gmail.com>; javier.ventura@edu.uaa.mx <javier.ventura@edu.uaa.mx>; jorge.perez@uah.es <jorge.perez@uah.es>; elizabeth.casillas@edu.uaa.mx <elizabeth.casillas@edu.uaa.mx>; fernando.barba@edu.uaa.mx <fernando.barba@edu.uaa.mx>

 1 archivos adjuntos (2 MB)

Attached standard file: * Authors-at-Wiley.pdf;

Dear Dr Barba-Gallardo

Your manuscript entitled "Effectiveness of antibody immunoconjugate treatment with propamidine isethionate for amoebic keratitis in hamsters" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Parasite Immunology. Your paper will now be checked by the Editorial Office to ensure it is ready to go to an Editor. If there are any changes required, your manuscript will be returned to you and you will receive instructions by email of what changes to make. If there are no changes required, your manuscript will be assigned to an Editor for initial assessment. If your submission passes these stages it will be sent for peer review.

Your manuscript ID is PIM-2022-0055.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence.

Our journal is currently transitioning to Wiley's Research Exchange submission portal. If you submitted this manuscript through our Research Exchange site, you can view the status of your manuscript by logging into the submission site at wiley.atyponrex.com/journal/PIM. If you submitted this manuscript through ScholarOne, you can view the status of your manuscript by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/pim>.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript. Otherwise, no further action is required on your part.

This journal offers a number of license options for published papers; information about this is available here: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>. The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Thank you for submitting your manuscript to Parasite Immunology.

Sincerely,
Pavikala Sunny
Editorial Assistant
Parasite Immunology - Editorial Office
PIMedoffice@wiley.com

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including sharing with the publisher (Wiley) and partners for production, publication and improvements to the authoring process. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at www.wiley.com/privacy. In case you don't want to be contacted by this publication again, please send an email to PIMedoffice@wiley.com.

On behalf of Professor Eleanor Riley and Professor Richard Grenis, Editors

Parasite Immunology now offers Free Format submission for a fast and simple submission process. See our author guidelines at <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13653024/homepage/forauthors.html>.

Get Content Alerts from Parasite Immunology:

1. Login or Register on Wiley Online Library: <http://dmmsclick.wileyurope.com/click.asp?p=20349283&m=85028&u=2247147>
2. Click on the 'Get New Content Alerts' in the top left corner of the Journal Homepage: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3024](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3024)
3. Wait to receive e-alerts direct to your inbox

Índice general

Resumen.....6

Abstract.....7

Introducción.....8

 Mecanismo fisiopatológico de daño..... 8

Planteamiento del problema.....11

Justificación.....13

Objetivos13

 Objetivo general 13

 Objetivos específicos..... 13

Hipótesis de trabajo14

Marco teórico14

 Morfología de la córnea 15

Sistema inmunológico 17

 Sistema inmunológico innato..... 17

 Sistema inmunológico adaptativo..... 19

 Sistema inmunológico de la córnea 20

 Queratitis ocular 21

 Queratitis amebiana..... 22

Acanthamoeba spp...... 23

 Fisiopatología de la queratitis infecciosa por *Acanthamoeba* 24

 Respuesta del sistema inmunológico contra la AK 26

Tratamientos actuales para AK 27

 Biguanidas 28

 Diamidinas..... 28

 Tratamientos con anticuerpos para AK..... 30

Metodología31

Tipo y diseño general de estudio.....	31
Universo de trabajo	32
Tipo de muestreo, selección y tamaño de muestra	32
Obtención de antígeno amebiano de <i>A. griffini</i>	33
Síntesis inmunoconjugado.....	34
Intervención propuesta	34
Criterios de inclusión	34
Criterios de exclusión	34
Criterios de eliminación	35
Variables, definiciones conceptuales y operacionales.....	36
Instrumentos de medición.....	38
Plan de tabulación y análisis de los resultados	38
Técnicas y procedimientos de recolección de datos	38
Estadística descriptiva.....	38
Programa y análisis estadístico	38
Presupuesto.....	39
Recursos humanos, materiales y financieros	39
Consideraciones éticas de estudio.....	39
Conflicto de intereses	39
Cronograma de actividades	40
Resultados	42
Análisis de anticuerpos policlonales	42
ELISA.....	42
Inmunofluorescencia para detección de <i>A. griffini</i>	42
ELISA para inmuconjugación	44
Estudio morfológico	45

Estudio histológico (Tinción Hematoxilina & Eosina)..... 48
Estudio histológico (Inmunofluorescencia) 50
Discusión66
Conclusión72
Referencias bibliográficas73
Anexos82



Índice de Tablas

Tabla 1 Variables de estudio. 37
Tabla 2 Cronograma de actividades. 41

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía general de la córnea 16
Figura 2. Córnea de hámster..... 16
Figura 3. Vías del complemento..... 19
Figura 4. Estructura química del Isetionato de propamidina 29
Figura 5. Gráfica de ELISA para la detección de anticuerpos policlonales de *A. griffini* 42
Figura 7. Gráfica de resultados ELISA 44
Figura 8. Gráfica de resultados ELISA 45
Figura 9. Estudio morfológico de córnea sana de hámster 45
Figura 10. Estudio morfológico de los grupos con intervenciones..... 47
Figura 11. Estudio histológico de la córnea de hámster..... 49
Figura 12. Inmunofluorescencias de córnea sana de hámster..... 50
Figura 13. Córnea de hámster a 1 semana de inyectar solución salina. 51
Figura 14. Córnea de hámster a 2 semanas de inyectar solución salina 52
Figura 15. Córnea de hámster a 3 semanas de inyectar solución salina 53
Figura 16. Córnea de hámster a 1 semana de inoculación de *A. griffini* 55
Figura 17. Córnea de hámster a 2 semanas de inoculación de *A. griffini* 56
Figura 18. Córnea de hámster a 3 semanas de inoculación de *A. griffini* 57
Figura 19. Córnea de hámster a 1 semana de tratamiento con isetionato de propamidina. 59
Figura 20. Córnea de hámster a 2 semanas de tratamiento con isetionato de propamidina 60
Figura 21. Córnea de hámster a 3 semanas de tratamiento con isetionato de propamidina 61

Figura 22. *Córnea de hámster a 1 semana de tratamiento inmunocjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales* 62

Figura 23. *Córnea de hámster a 2 semanas de tratamiento inmunocjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales* 63

Figura 24. *Córnea de hámster a 3 semanas de tratamiento inmunocjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales* 64

Figura 25. *Gráficas de cuantificación de células activas en inmunofluorescencia* 65



Resumen

La queratitis es un problema a nivel mundial que está presente en pacientes que han sufrido traumas en la superficie de la córnea o inmunodeficiencias, provocando afecciones corneales como: daño al tejido ocular, disminución de la agudeza visual, dolor de agudo a grave y en algunos casos crónico, formando úlceras y causando ceguera.

Actualmente no existe ningún tratamiento aprobado para esta afección, sin embargo, se han propuesto varios tratamientos, entre los cuales se encuentran las diamidinas en combinación con biguanidas.

Un ejemplo de una diamina es el isetionato de propamidina, de la cual, existe evidencia de ser un agente desnaturizador de proteínas del citoplasma, inhibe la síntesis de ADN y ARN y elimina los quistes de la *Acanthamoeba*; sin embargo, es un tratamiento tóxico, dando como resultado que aumenten los niveles de expresión de IL-1 β y el enquistamiento de *A. griffini*, aunque no se tiene una resolución total de la patología.

En cambio, al aplicar el tratamiento inmunoconjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales, disminuyó considerablemente la expresión de IL-1 β desde la primera semana y sólo se identificaron trofozoítos presentes en tejido, proporcionando una alternativa de tratamiento que disminuye considerablemente el enquistamiento y la concentración de isetionato de propamidina, teniendo un efecto terapéutico y baja toxicidad en córnea.

Palabras clave:

Queratitis, Isetionato de propamidina, Inmunoconjugado, Córnea, IL-10, A. griffini, Caspasa 3, IL-1 β , H&E, inmunofluorescencia.

Abstract

Keratitis is a worldwide problem that is present in patients who have suffered trauma to the corneal surface or immunodeficiencies, causing corneal conditions such as: damage to the ocular tissue, decreased visual acuity, acute to severe pain and in some cases chronic pain, forming ulcers and causing blindness.

There is currently no approved treatment for this condition, however, several treatments have been proposed, including diamidines in combination with biguanides.

An example of a diamidine is propamidine isethionate, for which there is evidence that it is a cytoplasmic protein denaturing agent, inhibits DNA and RNA synthesis and eliminates *Acanthamoeba* cysts; however, it is a toxic treatment, resulting in increased levels of IL-1 β expression and *A. griffini* encystation, although it does not result in complete resolution of the pathology.

On the other hand, when applying the immunoconjugate treatment of propamidine isethionate and polyclonal antibodies, IL-1 β expression decreased considerably from the first week and only trophozoites present in tissue were identified, providing a treatment alternative that considerably decreases encystation and the concentration of propamidine isethionate, having a therapeutic effect and low toxicity in cornea.

Introducción

La queratitis amebiana (AK) es una infección en córnea causada por el género *Acanthamoeba*, que proviene del griego “*akantha*” que significa “espina” y “*amoeba*”, el cual se refiere a su superficie “que cambia” (1); pertenece al phylum *Amoebozoa* (2) y a la familia de *Acanthamoebidae* (3), son protozoos de vida libre (1). Entre las especies patógenas se encuentran *A. griffini*, *A. Castellani* y *A. culbertsoni*; no obstante, el primer reporte de AK fue en 1974 por Nagington, J., causado por *A. polyphaga* (4).

A. griffini puede provocar AK, sus causas principales son falta de higiene al manipular los lentes de contacto y/o su uso prologado durante las noches, así como, utilizar los lentes de contacto durante actividades acuáticas (5–7); también se han detectado en pacientes con bajas cantidades de IgA en lágrima (8). Nunes et al. (2021) menciona que esta patología han sido reportados e identificados 675 casos del 2002 al 2020, de los cuales 253 corresponden a Asia, 150 de América, 233 de Europa y 40 de África, siendo el genotipo más frecuente el T4 (85.92%), seguido del T3 (5.92%), a este último pertenece *A. griffini* (9).

Clínicamente, en AK hay dolor agudo, ojos rojos, limbitis, infiltrados perineurales, queratitis punteadas, continuando con infiltrados en forma de anillo, defectos epiteliales and uveítis (10,11).

A. griffini se encuentra en forma de trofozoíto, así se puede reproducir por medio de fisión binaria (12,13) y se alimenta de bacterias, levaduras y restos celulares por medio de pinocitosis, trogocitosis y fagocitosis (14–16).

Mecanismo fisiopatológico de daño

La patogenicidad de *Acanthamoeba spp.* está relacionado con varias características, las más importantes son que las especies patógenas poseen un mayor tamaño y número de acantopodios y la formación de amoebastomas. La liberación de gran cantidad de proteasas, como la proteína de inducción a manosa

(136kD) (MIP-136), que en el caso de las cepas no patógenas está presente en bajas cantidades (17–19).

El primer paso es la adhesión de la ameba por medio de la proteína de unión a manosa (Mannose Protein Binding) de 133kDa (MPB-133) a las glucoproteínas membranales de las células epiteliales corneales (17,20–22), provocando la liberación de proteasas como la Proteína de unión a Manosa (MIP 136 kDa), e inducir muerte celular por activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), (23), activando la vía de señalización de Bak y Bax, perdiendo el potencial de membrana de la mitocondria, liberando el citocromo c, activando la caspasa 3 y mediadores de la apoptosis (1)

El tratamiento de AK más utilizado es la combinación de isetionato de propamidina junto con polihexametilen-biguadina que rompen la membrana citoplasmática, daño en los componentes celulares y enzimas respiratorias (24,25), en cambio, las diaminas como el isetionato de propamidina 0.1% alteran las estructuras de la membrana celular y su permeabilidad, desnaturalizando proteínas y enzimas citoplasmáticas (24).

Los tratamientos inmunoconjugados, son utilizados principalmente para tratar patologías como el cáncer (26), siendo utilizados comúnmente los anticuerpos monoclonales con altos niveles de especificidad para poder diferenciar una célula sana y otra dañada utilizando métodos de ingeniería genética, disminuyendo la concentración y por ende la toxicidad del tratamiento en el tejido (27). Otros utilizan métodos tradicionales como lo son el uso de químicos que funcionan como unión entre el tratamiento y el anticuerpo, siendo inespecíficos y de forma aleatoria; sin embargo, también poseen reconocimiento hacia el antígeno aunque en menor cantidad pero con un costo menor para su síntesis (28,29).

En este trabajo se utilizará este principio de tratamiento para ser utilizado para la AK, teniendo costos menores al de la obtención de un anticuerpo monoclonal, utilizando una menor cantidad de isetionato de propamidina y, por

ende, disminuyendo la toxicidad de éste en tejido; obteniendo un efecto terapéutico deseado y la eliminación de la ameba de los tejidos corneales.



Planteamiento del problema

La queratitis infecciosa es una afección dolorosa que causa severos daños al tejido corneal, originando úlceras. Puede tener cuatro orígenes: viral, bacteriano, fúngico o por protozoarios (30). Si no se recibe tratamiento efectivo en las etapas tempranas de la queratitis, puede progresar hasta provocar ceguera (31–33). A nivel mundial, la queratitis (AK, del inglés *Acanthamoeba Keratitis*) ocupa el cuarto lugar a nivel mundial de ceguera monocular o unilateral (34).

La AK es causada por protozoarios (35) del género *Acanthamoeba*; caracterizados por ser de vida libre, existiendo especies anfitrónicas, que significa que aunque son de vida libre, tienen el potencial de ser patógenas para los animales o el ser humano; *A. griffini* MYP2004, por ejemplo, es una cepa patógena de la especie *A. griffini* (36).

En etapas tempranas, la AK suele ser confundida por la queratitis causada por el virus del herpes simple del tipo 1 (VHS-1), esto es a causa de la aparición de dendritas epiteliales o geográficas en etapas avanzadas por la queratitis del tipo fúngico o bacteriano, además de la aparición de pseudodendritas epiteliales e infiltrados en forma de anillo (30,37–40), por lo que muchos pacientes no reciben un tratamiento conveniente, causando el progreso de la enfermedad y agravando el daño en la córnea (31).

Existen varias causas por las cuales puede desarrollarse la AK, entre ellas se tiene: inmunosupresión, trauma en la córnea, cirugía corneal invasiva, queratoplastia y la más común, la incorrecta manipulación de lentes de contacto (aproximadamente más del 80% de los casos), que incluye el uso de soluciones caseras, no realizar el cambio del estuche cada 3 meses y realizar actividades acuáticas con los lentes de contacto puestos (30,41,42).

Actualmente no existen tratamientos aprobados por la FDA para la queratitis causada por *Acanthamoeba spp.* El problema reside en que el género *Acanthamoeba* puede existir en un estadio de trofozoíto o de quiste; en este último, la ameba se protege por una doble pared celular (formando el endoquiste y

ectoquiste). El enquistamiento ocurre cuando la ameba es sometida a condiciones extremas, como cambios en el pH, falta de nutrientes, cambios en la presión osmótica o la presencia de tratamientos terapéuticos, proveyéndolo con una barrera física que origina una resistencia a los tratamientos actuales (43).

El tratamiento más usado consiste en una combinación de biguanidas y diamidinas; al inicio de forma intensiva, es decir, una aplicación durante cada hora por 2 o 3 días, posteriormente su aplicación se disminuye, adaptando la dosis en cada paciente según su progresión debido a los efectos tóxicos en la córnea (33,44).

Una de las diamidinas más usadas como tratamiento de la AK es el isetionato de propamidina, el cual altera la estructura de la membrana de *Acanthamoeba spp.*, penetrando el citoplasma, causando desnaturalización de proteínas citoplasmáticas e inhibición de la síntesis de ADN y ARN (45,46).

Actualmente no existe información sobre tratamientos con inmunoconjugados para la resolución de la AK, ya que la aplicación de anticuerpos policlonales y monoclonales contra la *Acanthamoeba* se utiliza principalmente con fines de diagnóstico (29,47). Por otro lado, se ha reportado el uso de anticuerpos policlonales para la resolución de la queratitis de origen viral (producido por VHS-1) (48,49). Se espera que con el tratamiento inmunoconjugado, llegue ser específico contra *Acanthamoeba griffini* en los estadios de quiste como trofozoíto, aumentando la eficacia del medicamento y al mismo tiempo disminuyendo su toxicidad en la córnea (27).

Lo anterior, genera la siguiente pregunta de investigación:

¿El tratamiento inmunoconjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales tiene un efecto sobre la AK en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*)?

Justificación

Actualmente, no existen tratamientos aprobados por la FDA ni por la COFEPRIS para combatir la infección de *Acanthamoeba*; pese a esto, el más utilizado consta de un tratamiento constituido comúnmente por la combinación de una diamidina y biguanida. La duración del tratamiento para AK varía según el progreso de la enfermedad y en caso de resistencia, puede prologarse por más de un año; además, con frecuencia se suspende el tratamiento, debido a la toxicidad que pueden causar al tejido corneal (37,50).

Se han obtenido anticuerpos contra *Acanthamoeba*, ya sea monoclonales o policlonales, con el fin de obtener diferentes métodos de diagnóstico y en investigación para la identificación de factores de virulencia *tanto in vitro* como *in vivo* (29,47). Además, se han obtenido anticuerpos para realizar tratamientos contra la queratitis de origen viral, provocada por el VHS-1 (48,49). Por lo tanto, los fármacos inmunoconjugados (anticuerpos unidos a un fármaco) podrían ser un tratamiento novedoso, ya que tienen gran potencial para dirigir la sustancia terapéutica directo a la célula blanco, disminuyendo la toxicidad provocada por el isetionato en el tejido corneal y la progresión de la queratitis (45,46,51).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento inmunoconjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales sobre la AK en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*).

Objetivos específicos

- Inducir con *Acanthamoeba griffini* una queratitis amebiana, en un modelo de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).

- Medir el daño causado por la AK en las córneas de los hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) mediante técnicas histológicas.
- Obtener anticuerpos policlonales contra *Acanthamoeba griffini* en conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus* Linnæus).
- Establecer la dosis terapéutica del tratamiento inmunoconjugado para inducir una respuesta farmacológica para AK en hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).
- Identificar mediante técnicas de inmunofluorescencia, la progresión de la AK en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) ante el tratamiento con anticuerpos conjugados.

Hipótesis de trabajo

H₁: El tratamiento inmunoconjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales tiene un efecto sobre la AK en hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).

H₀: El tratamiento inmunoconjugado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales no tiene un efecto sobre la AK en hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).

Marco teórico

Es bien sabido que no se puede realizar experimentos con humanos debido a los tratados de Helsinki y la fisiopatología de la AK, por lo que se decidió realizar un modelo experimental en hámster dorado, el cual ya ha sido reportado en la literatura por Akin Polat et al. (52), simulando la progresión de la queratitis en humanos, obteniendo información valiosa sobre la fisiopatología de este padecimiento, con la finalidad de obtener nuevos fármacos para ser probados *in*

vivo. Este tipo de modelo nace de la necesidad de conocer la fisiopatología de la infección y el desarrollo de nuevos tratamientos para su resolución.

El factor clave de la virulencia de *Acanthamoeba spp.* es su adhesión a las células epiteliales del huésped, No obstante, la ameba es selectiva ya que no puede causar queratitis en todos los animales, esto puede ser atribuidos a las diferencias de los residuos de manosa en las células epiteliales del huésped según la especie; sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo específico (53).

La inyección intraestromal es un método directo y rápido para desarrollar queratitis ocular; entre las especies en las que *Acanthamoeba* puede causar AK, se tienen a cerdos, ratas, ratones, conejos y hámsteres (54,55).

El modelo de queratitis en hámster puede resultar en una infección intraestromal; algunas amebas pueden depositarse cerca de la superficie y otras en regiones más profundas del estroma, teniendo una respuesta clínica variable con diferentes grados de queratitis (56).

Para este modelo experimental, se eligió al hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) debido a su fácil manejo en laboratorio y su susceptibilidad a la enfermedad.

Morfología de la córnea

La córnea es una región redondeada y transparente, el cual es un medio de difracción importante y su poder de refracción es mayor que la del cristalino. La córnea está compuesta por varias capas (**Fig. 1**): epitelio anterior de la córnea (epitelio estratificado plano), estroma del tejido conjuntivo avascular (sustancia propia de la córnea) y epitelio posterior de la córnea (endotelio), siendo este último tejido epitelial simple plano (57).

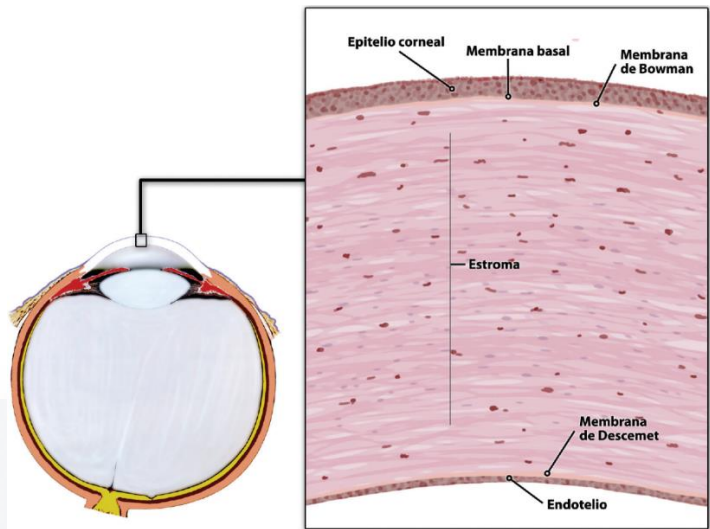


Figura 1. Anatomía general de la córnea. Conformada por el epitelio corneal, membrana basal, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (58).

En diferentes especies, el número de capas del epitelio corneal varía (en el caso de la rata es de 5 a 6 capas, aunque la diferencia es mínima, sin embargo, se tiene que tomar en cuenta el tamaño de la especie (**Fig. 2**) (59).

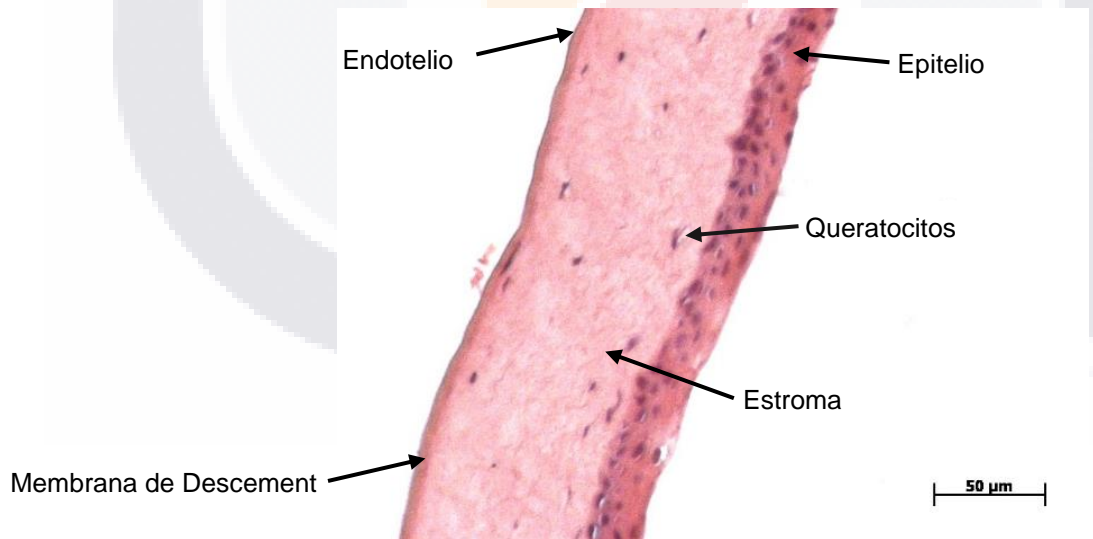


Figura 2. Córnea de hámster. Tinción con hematoxilina y Eosina. Imagen tomada a 20x.

El epitelio anterior de la córnea se encuentra apoyado sobre una lámina basal y una capa del tejido conjuntivo, llamada membrana de Bowman, compuesta por finas fibrillas de colágena de distribución irregular (57).

El estroma está constituido por tejido conectivo y colágeno denso, en su mayoría del tipo I, pero también contiene en menor cantidad colágeno del tipo III, V y VI, las cuales se disponen de forma paralela unas con otras, construyendo láminas. Asimismo, se encuentran fibrocitos modificados, llamados queratocitos, encargados de regenerar el colágeno (60).

Seguido del estroma, se localiza el epitelio posterior o endotelio corneal, el cual está apoyado sobre una membrana basal de estructura especial, llamada membrana de Descemet, ambos desempeñan un papel fundamental en la regulación del contenido acuoso del estroma corneal, teniendo una gran importancia en la transparencia de la córnea (57).

Sobre la superficie externa de la córnea se deposita una película de lágrima compuesta por: mucinas y glucoproteínas (cerca de las células epiteliales), agua (en el centro) y lípidos (en el exterior). Además, tiene una función defensiva, lo que refleja la existencia de lisozimas e Inmunoglobulinas A (IgA) secretadas (57).

Sistema inmunológico

Los mamíferos poseen barreras externas inespecíficas; como por ejemplo, la piel y el moco, las cuales evitan que los microorganismos patógenos ingresen al organismo (61); cuando esta barrera falla, el sistema inmunológico se encarga de controlar la afección, mediada por respuestas secuenciadas y coordinadas (62).

Sistema inmunológico innato

La respuesta inmunitaria innata es la primera en activarse y es esencial en el combate contra patógenos de manera inmediata o en días posteriores; este mecanismo es mediado por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos que distinguen patrones moleculares asociados a diferentes tipos de patógenos de manera innata, pero por sí solos, no generan memoria inmunitaria. Los principales componentes de este sistema son: las barreras físicas o químicas, como el epitelio

y secreciones (moco y lágrima), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, linfocitos NK o *Natural Killer*) y proteínas sanguíneas (sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación) (62).

Las vías del complemento (**Fig. 3**) constan de diferentes clases de proteínas plasmáticas que actúan para la opsonización del patógeno, incitando el reclutamiento de fagocitos en la zona afectada. Para que estas vías sean activadas, se requiere el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, por sus siglas en inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*).

Existen tres diferentes vías del complemento: La primera es la vía clásica, que emplea una proteína llamada C1q para detectar anticuerpos unidos a la superficie del patógeno; una vez unido a los anticuerpos, dos enzimas proteasas llamadas C1r y C1s, se activan e inician una cascada proteolítica. En segunda, se tiene a la vía alterna que es activada cuando la proteína C3 reconoce ciertas estructuras de la superficie del patógeno. Por último, la vía de la lectina es desencadenada por una proteína plasmática llamada lectina ligada a manosa (MBL, del inglés, *Mannose-Binding Lectin*) que reconoce las estructuras de manosas terminales en glucoproteínas y glucolípidos localizados en la superficie del patógeno; que a su vez, se une con una estructura hexamérica similar al componente C1q, provocando su unión a los zimógenos MASP1 y MASP2, que son serinas proteasas del tipo 1 y 2 asociadas a manosa con funciones similares a C1r y C1s, desencadenando una cascada proteolítica idéntica a la vía clásica (62).

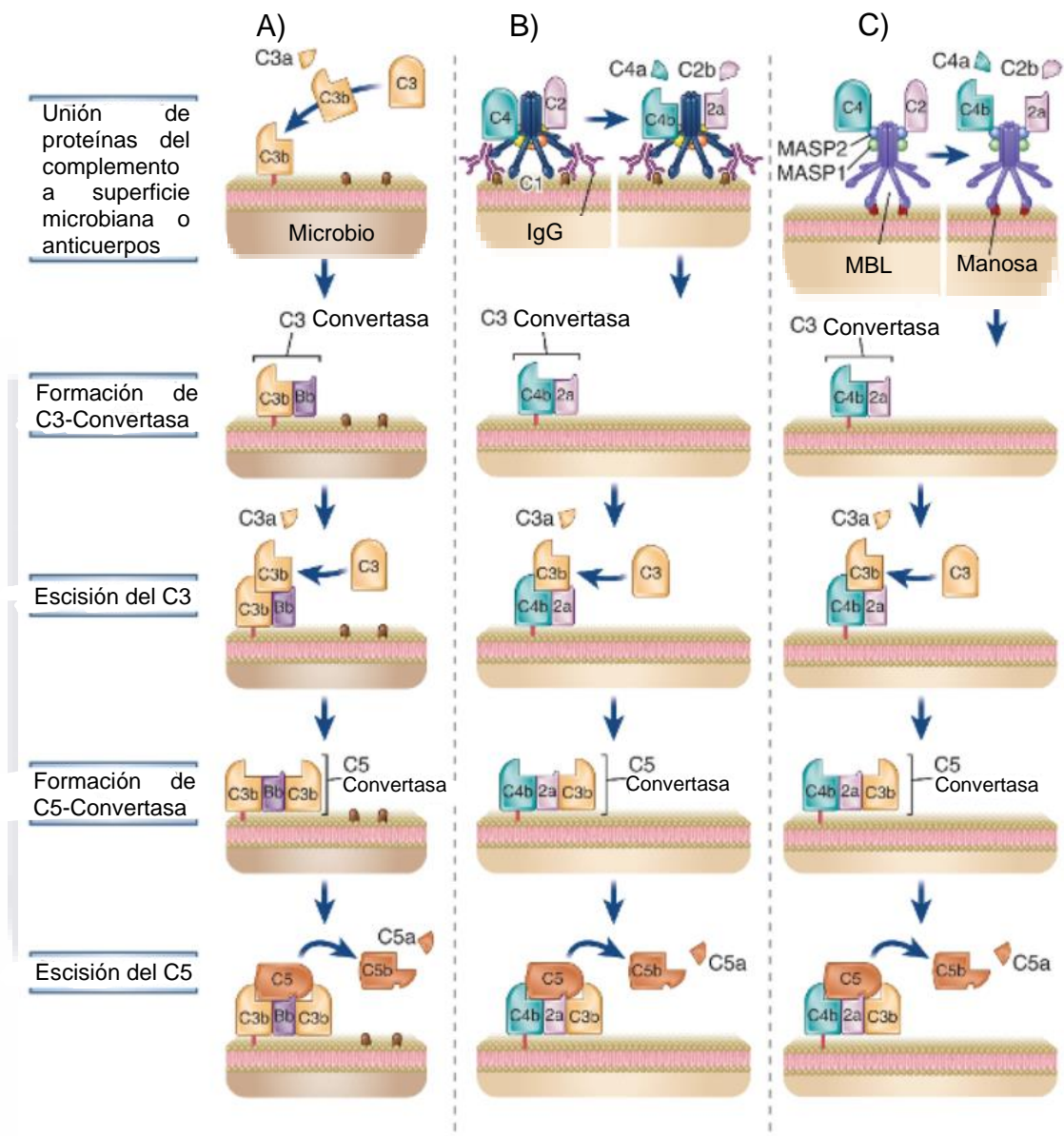


Figura 3. Vías del complemento. La vía del complemento está constituida por 3 tipos de vías: A) Alternativa B) Clásica C) Lectina (62).

Sistema inmunológico adaptativo

La respuesta inmunitaria adaptativa está mediada por linfocitos de clase B y T y sus productos llamados anticuerpos (62).

Las características principales del sistema inmunológico adaptativo son:

1. *Especificidad y diversidad.* Se calcula que el sistema inmunológico de cada individuo es capaz de distinguir entre 10^7 y 10^9 determinantes antígenos (62).
2. *Memoria:* es la capacidad de respuesta aumentada ante una segunda exposición del antígeno (62).
3. *Falta de reactividad frente a autoantígenos:* es la capacidad de responder ante antígenos pero no a células propias (62).

Sistema inmunológico de la córnea

El cuerpo de los mamíferos superiores (placentarios) posee sitios que, a través de una serie de mecanismos, controlan la inflamación mediante la regulación de células del sistema innato y adaptativo, para evitar algún tipo de daño en algunos tejidos; tales como testículos, cerebro y ojo. En el ojo esta inmunosupresión o inmunoprivilegio es expresado constitutivamente en córnea, retina y cámara anterior, con el fin de evitar la ceguera por infiltrados de células inflamatorias (63,64) ya que la córnea está constantemente bajo un estrés inflamatorio que si no se tiene una regulación adecuada, puede agravarse hasta causar inflamación crónica.

En la superficie ocular, se tienen varios mecanismos de regulación del sistema inmunitario; por ejemplo, la lágrima tiene una alta concentración de factores de inmunoregulación, tales como TGF- β que inhibe la activación de las células presentadoras de antígeno y la proliferación de células T; IL-10 que tiene un efecto antiinflamatorio; antagonistas de IL-1 e inhibidores de metaloproteasas; mucinas sintetizadas por células epiteliales y calciformes, las cuales forman una barrera repulsiva contra la migración de las células inflamatorias en lágrima hacia dentro del epitelio. Asimismo, no posee vasos linfáticos ni vasos sanguíneos y produce la secreción de corticoesteroides e inhibidores del complemento (63–65).

Si por algún motivo se incrementa la producción de citocinas, ya sea por inflamación o estrés de las células epiteliales, las células locales expresan citocinas del tipo inflamatorio (IL-1 y TNF- α , los cuales son capaces de activar las células

presentadoras de antígeno en la córnea), incrementando la expresión de CMH tipo II y moléculas de adhesión secretadas por el epitelio, queratocitos y endotelio vascular, provocando la migración de células inmunitarias hacia la córnea (64).

Queratitis ocular

La queratitis es una inflamación en córnea que puede ser de dos tipos: estéril (no infecciosa) u originada por algún agente patógeno (infecciosa); generando daños de leves a severos, que en su mayoría depende de un diagnóstico temprano y la aplicación del tratamiento adecuado para una buena prognosis (39).

La queratitis estéril es provocada por quemaduras químicas, lesiones postoperatorias, enfermedades autoinmunes degenerativas y alergias (66). En cambio, la queratitis infecciosa es ocasionada por microorganismos que traspasan la barrera epitelial de la córnea; entre los cuales se tienen los siguientes (39):

- *Bacteriana*: causada comúnmente por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y estreptococos; no obstante, también puede ser provocada por microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Haemophilus influenzae* (39).
- *Fúngica*: es poco frecuente en países templados, pero elevado en países tropicales y subdesarrollados; es ocasionado por levaduras (*Cándida*) y hongos filamentosos (*Fusarium* y *Aspergillus*); ésta es asociada a patologías crónicas de la superficie ocular, uso prolongado de corticoesteroides, uso de lentes de contacto, inmunosupresión y diabetes (39).
- *Virus*: generada por VHS-1 que en su mayoría está vinculada a una mala higiene y hacinamiento (39).
- *Amebiana*: causada por el género *Acanthamoeba spp*, es asociado comúnmente por un mal uso de lentes de contacto y falta de higiene (39).

Queratitis amebiana

Las manifestaciones clínicas de la AK son: fotofobia, dolor intenso, lagrimeo, neuritis óptica, hiperemia conjuntiva, úlceras epiteliales en córnea y en casos graves provoca ceguera monocular; no obstante, se han reportado casos aislados de ceguera binocular (37,41,67–69).

Su diagnóstico suele ser tardío, debido a un mal diagnóstico por la aparición de infiltrados epiteliales y pseudodendritas que generalmente están presentes en las queratitis de origen viral (VHS-1), bacteriana (*Pseudomona*) o fúngica (*Fusarium*); en consecuencia, el paciente no recibe el tratamiento adecuado y la progresión del padecimiento es inminente (37).

Métodos de diagnóstico para AK

- 1) Cultivo celular: este método es utilizado comúnmente por su bajo costo, posee una sensibilidad de 7 a 52%. La muestra puede ser obtenida de un raspado de córnea, biopsia o frotis del estuche de lentes de contacto para su posterior siembra en un cultivo celular, generalmente se utiliza agar no nutritivo o con baja concentración de nutrientes (constituido por 0.05% de peptona, 0.05% de extracto de levadura y 0.1% de glucosa) en presencia de bacterias no mucoides (por ejemplo; *Escherichia coli* y *Enterobacter spp.*) a una temperatura de 37°C, con un periodo de incubación mínimo de 6 a 30 días para su posterior análisis en microscopio (70,71); por otro lado, el medio CERVA ha demostrado ser altamente efectivo para favorecer el crecimiento de *Acanthamoeba spp* (72).
- 2) La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), es un método molecular efectivo y confiable, determinando el género y especie causante de la infección, con una sensibilidad del 84% y especificidad del 100% (45,73–76).
- 3) La microscopía confocal, es un estudio *in vivo* que según un estudio elaborado por Kanavi, M. en 2007, posee una sensibilidad del 100% y una

especificidad del 84%; ésta técnica no invasiva utiliza un escáner confocal que es un sistema conformado por un microscopio confocal de escaneo en tándem que provee una serie de imágenes de las capas de la córnea en tiempo real, obteniendo resultados de forma inmediata, además de ser una herramienta útil no sólo para diagnóstico de queratitis por *Acanthamoeba*, si no para el diagnóstico de diferentes infecciones en córnea, teniendo como beneficio un rápido diagnóstico, proporcionándole al paciente un tratamiento adecuado (77).

Acanthamoeba spp.

El género *Acanthamoeba* se cataloga como un grupo de organismos ubicuos, posee dos estados vegetativos: trofozoíto y quiste.

En su forma activa como trofozoíto, posee un tamaño de 25-40µm que puede variar según la especie; se reproduce por medio de fisión binaria (75) y se alimenta mediante fagocitosis y trogocitosis, generalmente de bacterias, algas, levaduras (44) y partículas orgánicas suspendidas (75), incluso se ha demostrado que pueden alimentarse de queratocitos (71).

En condiciones adversas, comienza a diferenciarse a su forma quística, midiendo de 13 a 20 µm, está conformada por una doble pared celular que le confiere resistencia ante la presencia de algunos desinfectantes, tratamientos o el sistema inmunológico del huésped (44). La pared externa (ectoquiste) es la primera en formarse, constituida por una mezcla de proteínas y polisacáridos; por otro lado, la pared interna (endoquiste) posee una estructura granular y delgada, además está conformada por polisacáridos, ambas paredes están constituidas en su mayoría por celulosa (43).

Han sido identificadas al menos 25 especies de *Acanthamoeba*, siendo algunas patógenas para el ser humano, las sobresalientes en clínica son: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes* y recientemente

se ha comprobado la patogenicidad y virulencia de *A. griffini*, existiendo poca información sobre esta especie, motivo por el cual fue seleccionada (78).

Para su clasificación e identificación, comúnmente se realiza un análisis molecular secuencial completo del gen de la pequeña unidad ribosomal 18S (ADNr 18S), clasificándolos en 20 genotipos (T1-T20) (31,79).

Algunas especies del género *Acanthamoeba* están asociadas con afecciones oculares, como el genotipo T3, a la que pertenece *Acanthamoeba griffini* (78), ha demostrado que posee una mayor resistencia ante tratamientos, en comparación del genotipo T4 que incluye a la especie más común que causa queratitis, *A. castellanii*; esto se obtuvo comparando el porcentaje de supervivencia celular de estos dos genotipos frente a sustancias, tales como clorhexidina, dendrímeros de biguanida y diferentes soluciones de limpieza para lentes de contacto (80,81).

Fisiopatología de la queratitis infecciosa por Acanthamoeba

La primera etapa es la adhesión del trofozoíto al epitelio corneal mediante adhesinas, uniéndose a glicoproteínas que contienen manosa o laminina (41,74). La proteína transmembranal conocida como proteína de unión a manosa de 136 kDa (MBP-136, del inglés, *Mannose-Binding Protein 136*) es un receptor de unión a las glicoproteínas que contienen manosa ubicada en las células blanco (células del epitelio corneal y queratocitos). Las MBP-136 poseen agregados ricos en cisteínas en su proporción extracelular, induciendo a la formación de agregados de *Acanthamoeba spp.* Adicionalmente, las proteínas de unión a laminina, que pueden ser de 28.8 y 55 kDa son el principal constituyente de la matriz extracelular (41,44,74).

La presencia de traumas o abrasiones en la superficie corneal provoca una sobreexpresión de glicoproteínas sobre el epitelio corneal incrementando la adherencia de la ameba en las células blanco, por este motivo los individuos que presentan traumas son más susceptibles a desarrollar esta patología (41).

Se ha demostrado que la adhesión de *Acanthamoeba spp.* sobreexpresa genes involucrados en el ciclo celular de las células huésped, como GADD45A y p130Rb, que están asociados con la detención del ciclo celular, asimismo la inducción de la célula a apoptosis dependiente a Caspasas 3, mediante la sobreexpresión de proteínas apoptóticas de la vía mitocondrial (74).

Subsecuente a la adhesión, *Acanthamoeba spp.* secreta diferentes tipos de enzimas hidrolíticas y toxinas como ecto-ATPasas, neuraminidasas, superóxido dismutasa, elastasas, proteasas, fosfolipasas, glucosidasas y acantaporinas que, en conjunto, ocasionan la degradación del estroma, permitiendo una profunda penetración en la córnea (44,45).

Las ecto-ATPasas, son glicoproteínas relacionadas con su patogenicidad, se expresan en la membrana de *Acanthamoeba* con los sitios activos orientados hacia el espacio extracelular, éstas enzimas provocan la ruptura de ATP a ADP, causando un efecto citotóxico para las células huésped, mediante la unión de ADP al receptor P2y2, un receptor purinérgico; incrementando la concentración Ca^{+} de las células huésped, induciendo la activación de la Caspasa 3, provocando apoptosis (44,74).

Las elastasas hidrolizan un amplio rango de proteínas del tejido conectivo, tales como elastina, fibrinógeno, colágeno y proteoglicanos, provocando la degradación del estroma (41,74).

La presencia de manosa ya sea en superficies membranales o en su forma libre, incita a los trofozoítos a secretar proteasas inducidas por manosa de 133 kDa (MIP-133, del inglés, *Mannose-Induced Protein*), una proteasa serina crucial para la patogénesis, causante de la muerte de queratocitos, células del epitelio pigmentario de la retina, del epitelio y endotelio corneal, activando la apoptosis por la vía dependiente a Caspasa 3, facilitando la invasión corneal, edema, necrosis y por ende, desencadena la respuesta inflamatoria. Otro clase de proteasa involucrada es la cisteína proteasa (43, 65, 70 y 130 kDa), que provoca la degradación del colágeno del estroma y al igual que las proteasa serinas tienen actividad metaloproteasa (41,74).

Asimismo, *Acanthamoeba spp.* posee la capacidad para fagocitar células mediante la polimerización de actina inducida por una tirosina quinasa, formando amoebastomas en la superficie celular (44,74). El rol principal de la fagocitosis es tomar partículas sólidas de alimento incluyendo las células de la córnea, mediante pseudópodos para introducir los sólidos al citoplasma a través de vacuolas fagocíticas, para luego ser digeridas (74), durante este proceso de fagocitosis y desplazamiento de *Acanthamoeba spp.*, promueve la nucleación de filamentos de actina en el citoplasma. La proteína “capping” se incrementa críticamente con el incremento de la polimerización de actina; esta proteína bloquea la polimerización de los extremos de los filamentos de actina, que se encuentran en el citoesqueleto (82).

Respuesta del sistema inmunológico contra la AK

La primera defensa contra *Acanthamoeba* es la presencia de IgA localizada en las secreciones de las mucosas, tales como moco, saliva y lágrima; éste último posee mayor cantidad de IgA, que bloquea el receptor MBP de *Acanthamoeba spp.*, impidiendo su adherencia al epitelio corneal y la esclera (31,41,74,83).

Las evidencias en estudios en animales y en humanos sugieren que los macrófagos son la primera línea de defensa contra *Acanthamoeba spp.* y los neutrófilos están involucrados en la resistencia a la queratitis, apareciendo en etapas tardías de la infección (51). Ambos tipos de células proveen protección contra la AK eliminando los quistes y trofozoítos en la superficie ocular (44,51).

Los neutrófilos son atraídos por fragmento de quistes, pero también se ha comprobado *in vitro* que son capaces de eliminarlos mediante el mecanismo dependiente de mieloperoxidasas, además de mostrar una mejor eficiencia para eliminar quistes que los macrófagos (51).

Tanto los neutrófilos como los macrófagos, son activados en presencia de citocinas, sintetizadas y secretadas por varios tipos celulares que median reacciones inflamatorias e inmunitarias, tales como IL-8 (del inglés, *Interleukin-8*),

IL-6, TNF- α (del inglés, *Tumor necrosis factor- α*), TNF- β e IFN- β (del inglés, *Interferon- β*), que son inducidos a través de la activación del TLR-4 (del inglés, *Toll-like Receptor 4*) en respuesta de la infección provocada por *Acanthamoeba* y de algunos anticuerpos como IgA, IgG e IgM (44,51,62,84).

La IL-1 β es una citocina inflamatoria secretada por células dañadas para la activación celular contra los patógenos cuando se encuentran en el tejido del hospedero, que es reconocido por los TLR-4; este tipo de interleucina es secretada a niveles altos en las etapas iniciales de la infección y en las etapas tardías se ha observado una disminución (36). Por el contrario, la IL-10 es una citocina antiinflamatoria que está localizada en tejido expuesto al medio ambiente, como es el caso del epitelio cornea. Se sabe que los trofozoítos de *Acanthamoeba* inducen la producción de IL-10 en células mononucleadas como los macrófagos (36).

Otro modo de defensa contra *Acanthamoeba spp.* es la activación del complemento de la vía alternativa (44); provocada por la adhesión y penetración de la ameba en el epitelio, activando otro mecanismo dependiente de IgA, la opsonización del trofozoíto o la interacción con receptores inflamatorios de IgA (51).

Se han reportado que en modelos animales y en pacientes, existe una susceptibilidad a una reinfección, sugiriendo que no se desarrolla una respuesta inmune adaptativa (44). La ausencia de activación de linfocitos T y B, ha sugerido que los trofozoítos son capaces de enmascarar sus antígenos en su superficie celular (44,51,62). Sin embargo, en un estudio elaborado por Mathers W. y col. en 1987 demostró que *A. castellanii* y *A. polyphaga*, no indujo una respuesta en linfocitos, apoyando la teoría que el género de *Acanthamoeba* tiene la habilidad de enmascarar los antígenos de su superficie con el fin de no ser reconocidos por las células del sistema inmunológico (51,85).

Tratamientos actuales para AK

Actualmente no existe un medicamento aprobado por la FDA ni por COFEPRIS para la resolución de AK, debido a su resistencia a tratamientos

brindada por la doble pared celular en su forma quística. El tratamiento comúnmente utilizado es una combinación de biguanidas y diamidinas (71,75,79,86).

Biguanidas

Los más utilizados son polihexametilen biguanida (PHMB) y clorhexidina (83), en concentraciones de 0.02%. En casos de resistencia se utiliza una concentración máxima de PHMB 0.06% y clorhexidina 0.2%. Las biguanidas interaccionan con la membrana citoplasmática de *Acanthamoeba spp.*, causando lisis celular e inhibición de enzimas que participan en la respiración celular (37,45,75). Sin embargo, Lee y col. en 2007, demostraron *in vitro* que a la misma concentración, el PHMB tiene mayor efecto tóxico para los queratocitos que la clorhexidina (50).

Diamidinas

Las diamidinas provocan cambios en la permeabilidad de la membrana de *Acanthamoeba spp.* introduciéndose en el citoplasma y provocando desnaturalización de proteínas y enzimas e inhibición de síntesis de ADN, ARN (45,46). No es recomendable utilizarlas como monoterapia debido a que causan resistencia, por lo que se recomienda combinarla con una biguanida, obteniendo un efecto sinérgico. Entre las diamidinas más utilizadas están la pentamidina, propamidina y hexamidina (37,45,75).

Estos tratamientos son moléculas de gran tamaño, penetrando menos del 5% en la membrana ocular, teniendo un efecto terapéutico. Al inicio del tratamiento su aplicación es intensiva, administrándose cada hora durante día y noche, durante 2 a 3 días; no obstante, la dosis tiene que ser ajustada dependiendo del progreso de la infección; esta disminución se debe a los efectos tóxicos del tratamiento, razón por la que se utilizan en concentraciones bajas y aunque son tratamientos que se administran por tiempo prolongado debido a la reincidencia y presencia de quistes, se administran regularmente 4 veces por día (33,44).

Isetionato de propamidina

La fórmula química del isetionato de propamidina es $C_{17}H_{20}N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$, tiene un peso molecular de 564.6 g/mol (**Fig. 4**); es una diamidina aromática que es obtenida de la combinación de propamidina con dos equivalentes de ácido isetiónico (87,88).

Es un compuesto catiónico, típicamente usado como tratamiento de infecciones oculares como conjuntivitis y blefaritis; también suele usarse como agente antimicrobiano y antiséptico; posee propiedades bacteriostáticas contra una amplia gama de organismos, entre ellos, cocos pirogénicos, estafilococos resistentes a antibióticos y algunos bacilos gramnegativos; es antifúngico, antiprotozoario y posee actividad antiquistica contra *Acanthamoeba spp.* pese a esto, en algunos casos puede causar hipersensibilidad e irritación, por lo que se recomienda suspender inmediatamente el tratamiento; en el caso de embarazo y lactancia no se ha especificado su uso (45,46,88,89).

El mecanismo de acción contra *Acanthamoeba spp.* consta de la disrupción de la membrana celular, desnaturalización de proteínas citosólicas e inhibición de la síntesis de ADN (89).

El isetionato de propamidina es comercializado en Australia y Reino Unido bajo el nombre de Brolene[®], que es un colirio al 0.1% (90).

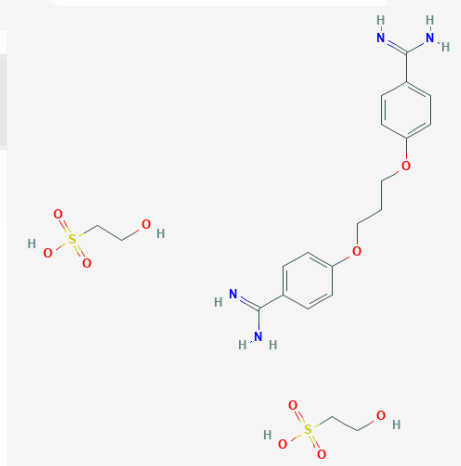


Figura 4. Estructura química del Isetionato de propamidina (87).

Tratamientos con anticuerpos para AK

Los anticuerpos son glicoproteínas secretadas por linfocitos B especializados, mediadores de la inmunidad humoral frente a toda clase de amenaza, las cuales se unen a los antígenos presentes en las membranas de los microorganismos patógenos, neutralizándolos para posteriormente ser fagocitados por macrófagos, monocitos y células NK (29,62).

Los anticuerpos monoclonales son una mezcla pura de moléculas de anticuerpos con la misma especificidad; a diferencia de los anticuerpos policlonales que son mezclas de anticuerpos secretados por muchos clones de linfocitos B que se unen a diferentes epítomos de un antígeno (62).

Las ventajas del uso de anticuerpos policlonales ante los anticuerpos monoclonales son: su bajo costo, reducción del tiempo para su obtención, mayor estabilidad, mayor número de epítomos reconocidos, mayor especificidad y producción de anticuerpos (29).

Los anticuerpos policlonales y monoclonales contra *Acanthamoeba spp.* son utilizados para la elaboración de métodos de diagnóstico, teniendo como objetivo la unión a ciertas proteínas específicas que están ausentes en los otros tipos de microorganismos para realizar un diagnóstico diferencial, evitando resultados falsos positivos (47).

Se han realizado experimentos provocando inmunización oral en hámsteres chinos con una mezcla de antígenos de *Acanthamoeba* con la toxina del cólera induciendo la producción de IgA en mucosas, para la prevención de la adhesión de *Acanthamoeba spp.* a las células epiteliales de la córnea, no obstante, la viabilidad del patógeno no se ve comprometida (91).

En el caso de la queratitis ocasionada por el VHS-1, se han aplicado anticuerpos policlonales contra el antígeno D de la superficie del virus, con la finalidad de mejorar la capacidad de inactivación y neutralización de antígenos, además de inhibir la replicación viral, evaluando la eficiencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales en un modelo *in vitro* e *in vivo* en modelo de conejo,

teniendo como resultado una reducción de la carga viral y síntomas de forma dosis-dependiente; lo anterior se realizó con la finalidad de obtener un tratamiento que sea administrado con menos frecuencia, disminuyendo su toxicidad y la resistencia frente al patógeno (48).

Medicamentos inmunoconjugados

Actualmente, los medicamentos inmunoconjugados han sido utilizados principalmente en tratamientos oncológicos, con la finalidad de entregar un medicamento tóxico a una célula blanco, evitando dañar a las células sanas (92), sin embargo, utilizan ingeniería genética para modificar el anticuerpo con el fin de unir en un sitio específico al medicamento, evitando uniones inespecíficas o bloqueando los epítomos con el fin de garantizar que el anticuerpo inmunoconjugado pueda ser administrado y entregado a la célula blanco (27).

Uno de los métodos clásicos para la obtención de un tratamiento inmunoconjugado es por medio de la reacción con glutaraldehído al 0.1%, mediante la formación de enlaces covalentes a grupos amino o sulfhidrilos a los grupos aldehídos, formando una base de Schiff, para posteriormente ser estabilizada, formando una unión entre el anticuerpo y el tratamiento (28).

El mecanismo de acción de estos tratamientos es que el anticuerpo se une al receptor por la célula blanco para posteriormente ser introducido dentro de la célula y degradada por los lisosomas, liberando el medicamento y provocando la muerte celular. Sin embargo, también se utilizan como vehículo para aproximar el medicamento a la célula blanco (92,93).

Metodología

Tipo y diseño general de estudio

Se realizó un estudio experimental, longitudinal y prospectivo en cinco bloques aleatorizados.

Universo de trabajo

Hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) macho, de un peso promedio de 150 g (\pm 50g), proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Tipo de muestreo, selección y tamaño de muestra

Se realizó un muestreo no probabilístico de cuota de 65 hámsteres, realizando las intervenciones en el laboratorio de Morfología, en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Los hámsteres se resguardaron en el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, bajo condiciones controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. La dieta consistió en alimento para roedores y agua filtrada *ad libitum*.

Para la inducción de queratitis se inoculó la cepa de *A. griffini* MYP2004, que se cultivó en medio de cultivo CERVA (**Anexo A**), administrando una dosis de 50,000 trofozoítos vía intraestromal con ayuda de una jeringa de 32 G y un estereoscopio (Discovery.V8, Zeiss).

Se dividieron en 5 grupos (1 grupo de $n=5$ y 4 grupos con $n=15$):

- 1) Control sano: Sin ningún tipo de intervención (grupo de $n=5$).
- 2) Sham: Inyección de solución fisiológica.
- 3) Control positivo: Inoculación de *A. griffini*.
- 4) Tratamiento control: Inoculación de *A. griffini* + tratamiento con isetionato.
- 5) Tratamiento prueba: Inoculación de *A. griffini* + tratamiento inmunconjugado.

Cada grupo se dividió en 3 subgrupos de $n=5$, a excepción del grupo sano, los animales se sacrificaron a 1, 2 y 3 semanas post-inoculación.

Los grupos a los cuales se inocularon *Acanthamoeba griffini*, se diagnosticaron a la semana de la inoculación si presentaron o no queratitis;

mediante la sedación local de la córnea del hámster con sevoflurano al 4% en O₂ inhalado, posteriormente se administró fluoresceína en el ojo con ayuda de una micropipeta para posteriormente observarse bajo un estereoscopio.

Para la dosis del tratamiento control (isetionato de propamidina) y tratamiento de prueba (inmunoconjugado), se tomó como referencia la metodología utilizada por Polat Z. et al., por ende, se administró el medicamento la primera semana 8 veces al día y en la semana 2 y 3, se disminuyó a 3 veces al día (56).

Los hámsteres fueron sacrificados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital 1:10 en solución salina fisiológica (administración de 1.5 ml por cada 100 g de peso del animal) y dislocación cervical.

Obtención de antígeno amebiano de *A. griffini*

Para la obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra *A. griffini*, se realizó un lisado amebiano (Ver. **Anexo B**) y se cuantificó la cantidad de proteína por medio del método de Bradford, para posteriormente liofilizar el antígeno amebiano.

Se aplicó 1 vacuna subcutánea semanalmente en el lomo del conejo por 3 semanas, constituida por una mezcla de 2mg de antígeno amebiano, 1ml de agua estéril y 1mL de adyuvante completo de Freund; posteriormente de la última aplicación se inmunizó al conejo con una vacuna intramuscular, preparado con 1mL de antígeno amebiano y 1mL de adyuvante incompleto de Freund.

Luego de 10 días de la última inmunización, se obtuvo la sangre del conejo mediante una punción cardiaca. Se separaron los componentes celulares de la sangre y el suero; conservando el suero en alícuotas a una temperatura de -70°C para su conservación.

Para la cuantificación e identificación de los anticuerpos en el suero del conejo, se realizó una ELISA utilizando el antígeno amebiano; como control se utilizó suero de conejo sin inmunizar, además para corroborar que el anticuerpo se

une a la ameba, se montó una inmunofluorescencia a diferentes concentraciones del suero (Ver **Anexo C**).

Síntesis inmunoconjugado

Para obtener la cantidad de IgG indicada para la inmunoconjugación, se realizó una ELISA utilizando media placa a una concentración de antígeno 1:10 y la otra 1:100; el anticuerpo se añadió a una concentración 1:2000 y 1:5000.

Posteriormente se tomaron 10ml de Brolene® y se dejó en constante agitación a temperatura ambiente durante 24h con una solución de glutaraldehído y PBS 1M al 1.25%. Al siguiente día, se tomó la solución y se mezcló con 15ml de buffer fosfatos 0.1M y 15 ml de una solución 1:1000 de IgG, dejándolo a 4°C durante 24h.

Para eliminar el glutaraldehído y las sales excedentes, se dializó la solución, se liofilizó y se cuantificó la proteína por medio del método de Bradford.

Intervención propuesta

La aplicación del tratamiento (experimental o de prueba) se realizó a la semana de inoculación de *Acanthamoeba griffini* posteriormente del diagnóstico de queratitis en un ojo.

Criterios de inclusión

Diagnóstico de AK en un ojo.

Criterios de exclusión

Presentar daños corneales previos, daños severos en córnea o no presentar signos de AK durante el desarrollo experimental.

Criterios de eliminación

Muerte por situaciones fuera de la intervención o autolesiones en ojo.



Variables, definiciones conceptuales y operacionales

<i>Variable</i>	Definición conceptual	Tipo de variable	Operacionalización	Indicadores	Dimensión	Rango
<i>Peso del hámster</i>	Magnitud física que expresa la cantidad de materia de un cuerpo, medida por la inercia de este, que determina la aceleración producida por una fuerza que actúa sobre él, y cuya unidad en el sistema internacional es el kilogramo (Kg) (94).	Cuantitativa Independiente	Báscula	g	Razón	100 g a 200 g
<i>A. griffini en tejido</i>	La queratitis amebiana (AK) es una infección en la córnea causada por una ameba del género <i>Acanthamoeba</i> , el nombre <i>Acanthamoeba</i> proviene del griego “ <i>akantha</i> ” que significa “ <i>pico</i> ” y “ <i>amœba</i> ”, el cual se refiere a su superficie “ <i>tipo espina</i> ” (95).	Cuantitativa Dependiente	Inmunofluorescencia	Células positivas/mm ²	Razón	6,000
<i>IL1-β</i>	Citocina producida por macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales y queratocitos. Es mediador de la respuesta inmunitaria aguda y tiene acciones similares al FNT (62).	Cuantitativa Dependiente	Inmunofluorescencia	Células positivas/mm ²	Razón	6,000
<i>IL-10</i>	Citocina producida por macrófagos y linfocitos T (en su mayoría linfocitos T reguladores (96). Inhiben la expresión de IL-12, coestimuladores y clase II del	Cuantitativa Dependiente	Inmunofluorescencia	Células positivas/mm ²	Razón	6,000

	MCH (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>) (62).					
Caspasa 3	Familia de enzimas perteneciente al grupo de la cisteína proteasas; son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis (62).	Cuantitativa Dependiente	Inmunofluorescencia	Células positivas/mm ²	Razón	6,000
Dosis	Cantidad o porción de algo, material o inmaterial (97).	Cuantitativa Independiente	Micropipet a	μL	Razón	7 μL
Tiempo	Magnitud física que permite ordenar la secuencia de los sucesos, estableciendo un pasado, un presente y un futuro (71).	Cuantitativa Independiente	Calendario	días	Razón	0-28

Tabla 1. Variables de estudio.



Instrumentos de medición

Se utilizó cámaras digitales (CoolSNAP-Procf y AxioCam MRc) acopladas a microscopios (Axioskop 40 y Axiovert 40 CFL correspondientemente, ambos marca ZEISS) para la obtención de imágenes y su posterior análisis con ayuda software Fiji is just ImageJ (Versión 1.53c, descargado de la página <https://imagej.net/Fiji/Downloads>) (98).

Plan de tabulación y análisis de los resultados

Técnicas y procedimientos de recolección de datos

Las técnicas que se utilizaron para recolección de datos fueron las siguientes: peso del hámster dorado, ELISA (**Anexo C**), inmunofluorescencia (**Anexo C**), tinción del tejido con la técnica hematoxilina y eosina (**Anexo C**); con ayuda del software *Fiji* se realizó la cuantificación de células activadas con IL-10, IL-1 β , caspasas 3 y presencia de *A. griffini* en el tejido corneal.

Los datos obtenidos fueron recopilados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 365, para su posterior análisis.

Estadística descriptiva

Se realizó un análisis de varianzas, además de utilizar gráficas de barras para la comparación entre grupos.

Programa y análisis estadístico

Para el modelo estadístico aleatorio estratificado en 5 grupos, se utilizó la herramienta GraphPad Prism (Versión 8.0.2 para Windows y 9.0 para macOS).

Se realizó un análisis de varianza según la prueba de normalidad, si los datos correspondían a una distribución normal, se utilizaron las pruebas de ANOVA y post

hocTukey, en caso contrario la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y post hoc Dunn; en ambas pruebas se tomó en cuenta un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.

Presupuesto

Recursos humanos, materiales y financieros

Se contó con el personal necesario capacitado para la realización del proyecto, además de la infraestructura y financiamiento necesario por la Universidad Autónoma de Aguascalientes (**Anexo D**).

Consideraciones éticas de estudio

Se realizó de acuerdo con el reglamento de ética para el uso de animales en la docencia e investigación en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA); así como las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

La carta de aprobación del Comité de ética para el uso de animales en la docencia e investigación en la Universidad Autónoma de Aguascalientes tiene el folio CEADI-UAA, posee el folio CEADI-UAA/002/03/202 (Ver **Anexo E**).

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.

Cronograma de actividades

	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar
MODELO DE AK	x	x	x	x											
OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	x	x	x	x	x										
EFEECTO DEL TRATAMIENTO EN AK						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DATOS															
Masa de los hámsteres	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Presencia de queratitis	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DAÑO AL TEJIDO / RESPUESTA AL TRATAMIENTO															
Histología	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Presencia de <i>A. griffini</i>						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
IL-10			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
IL-1 β			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Caspasa 3															

	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar
<i>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabla 2. Cronograma de actividades.



Resultados

Análisis de anticuerpos policlonales

ELISA

La prueba de ELISA arrojó como resultado un mayor reconocimiento a una concentración de 1:1000 (Ver Fig. 5).

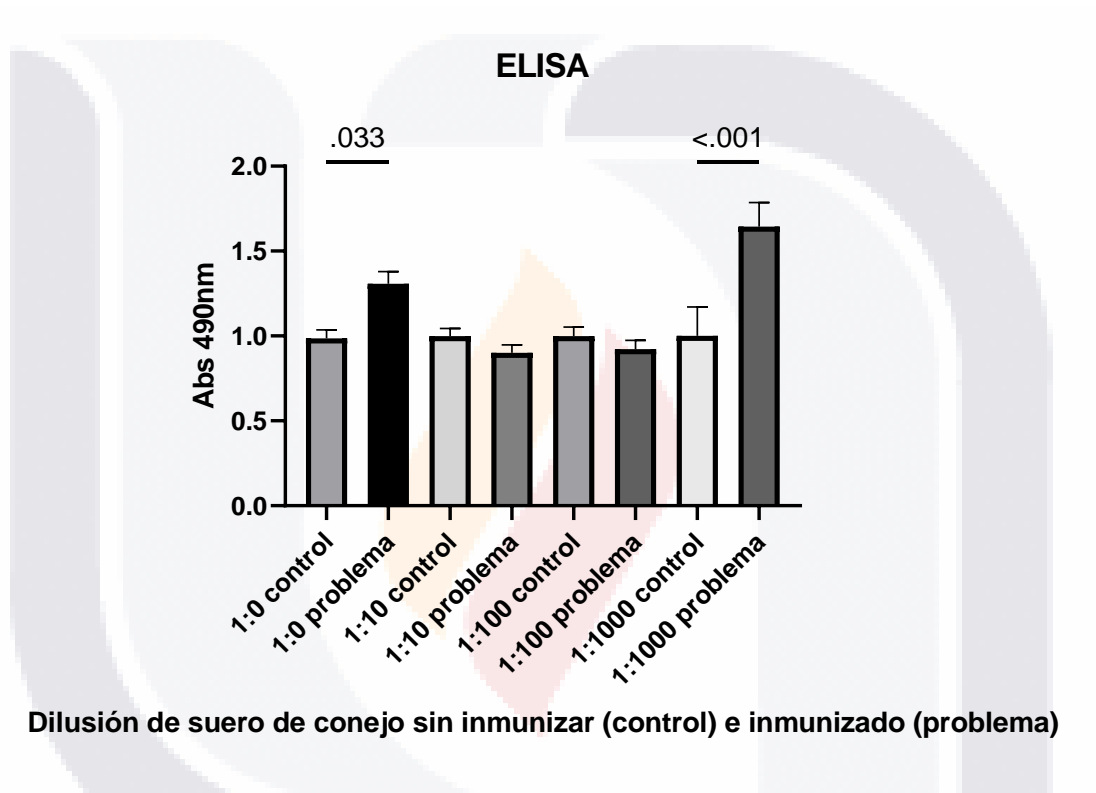


Figura 5. Gráfica de ELISA para la detección de anticuerpos policlonales de *A. griffini*. Técnica de ELISA para el reconocimiento del antígeno amebiano que se inoculó al conejo Nueva Zelanda, a concentraciones del anticuerpo del suero del conejo inmunizado sin diluir, a una dilución 1:10, 1:100 y 1:1000; se encontró una diferencia estadística contra su control (suero de conejo sin ser inmunizado) del suero sin diluir y una dilución 1:1000. Prueba de Kruskal-Wallis y post hoc Dunn. *: * p <0.05; **p <0.01; *** p<0.001.

Imunofluorescencia para detección de *A. griffini*

Se realizó la prueba de inmunofluorescencia a diferentes concentraciones del suero del conejo inmunizado con el antígeno amebiano (Ver Fig. 27), dando como resultado un reconocimiento de *A. griffini*, comprobando la presencia de anticuerpos

policlonales contra esta ameba. En una concentración 1:200 del suero de conejo se puede observar que se comienza a perder el reconocimiento de la ameba (Ver **Fig. 6**).

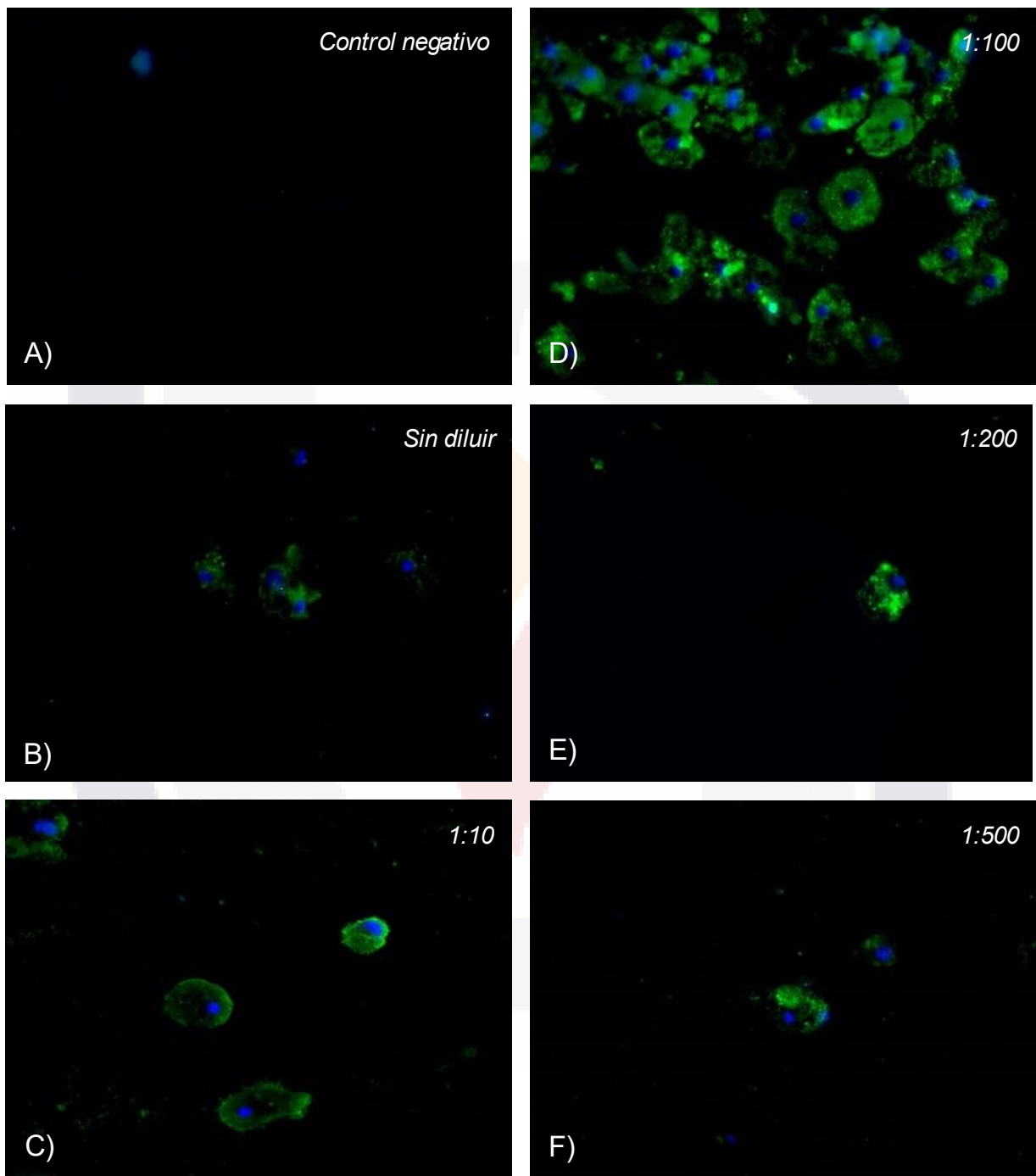


Figura 6. Inmunofluorescencia a diferentes diluciones de anticuerpos policlonales obtenidos de conejo Nueva Zelanda. A) Sin anticuerpos policlonales (Control). B) Con anticuerpo sin dilución del suero. C) Dilución 1:10 del suero. D) Dilución 1:100. E) Dilución 1:200. F) Dilución 1:500. Se puede apreciar que la disolución con mejor reconocimiento de *A. griffini* es 1:200.

ELISA para inmuconjugación

Para encontrar la concentración de IgG adecuada para conjugar el anticuerpo, se realizó una prueba ELISA, obteniendo un mayor reconocimiento a una concentración de 1:2000 (Ver **Fig. 7**), eligiendo una concentración 1:1000 para realizar la conjugación con el isetionato de propamidina.

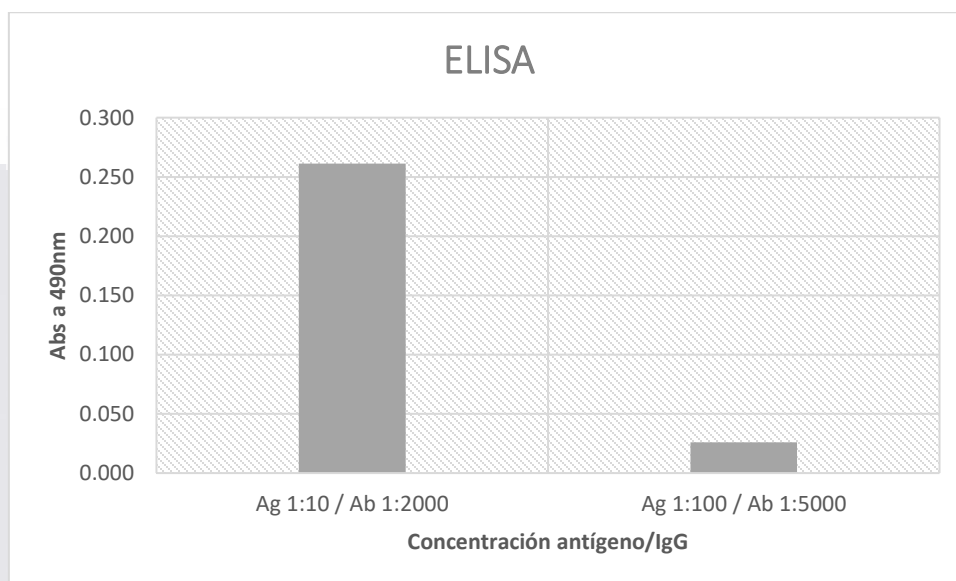


Figura 7. Gráfica de resultados ELISA. Se observa un mejor reconocimiento del antígeno a una concentración de 1:2000.

Posteriormente de la obtención del inmuconjugado, se diluyó el polvo en 3ml de agua a nivel reactivo y se procedió a realizar una ELISA bajo las mismas concentraciones obteniendo un reconocimiento a 1:2000, aunque en menor cantidad del antígeno (Ver **Fig. 8**).

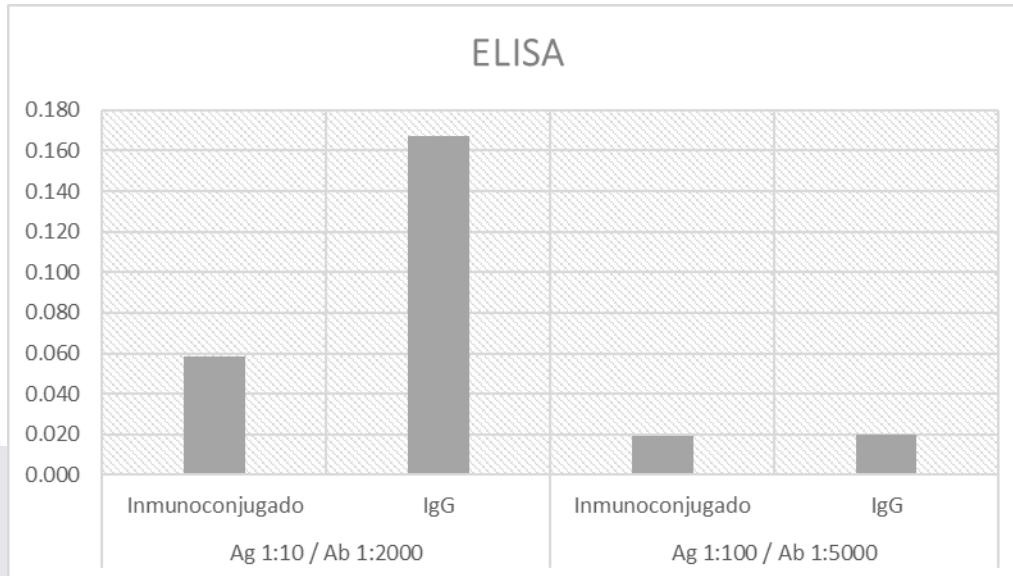


Figura 8. Gráfica de resultados ELISA. Se observa un mejor reconocimiento del antígeno a una concentración de 1:2000.

Estudio morfológico

En el grupo sano, se puede observar como la córnea no presentó ningún tipo de alteración aparente (Ver **Fig. 9**).

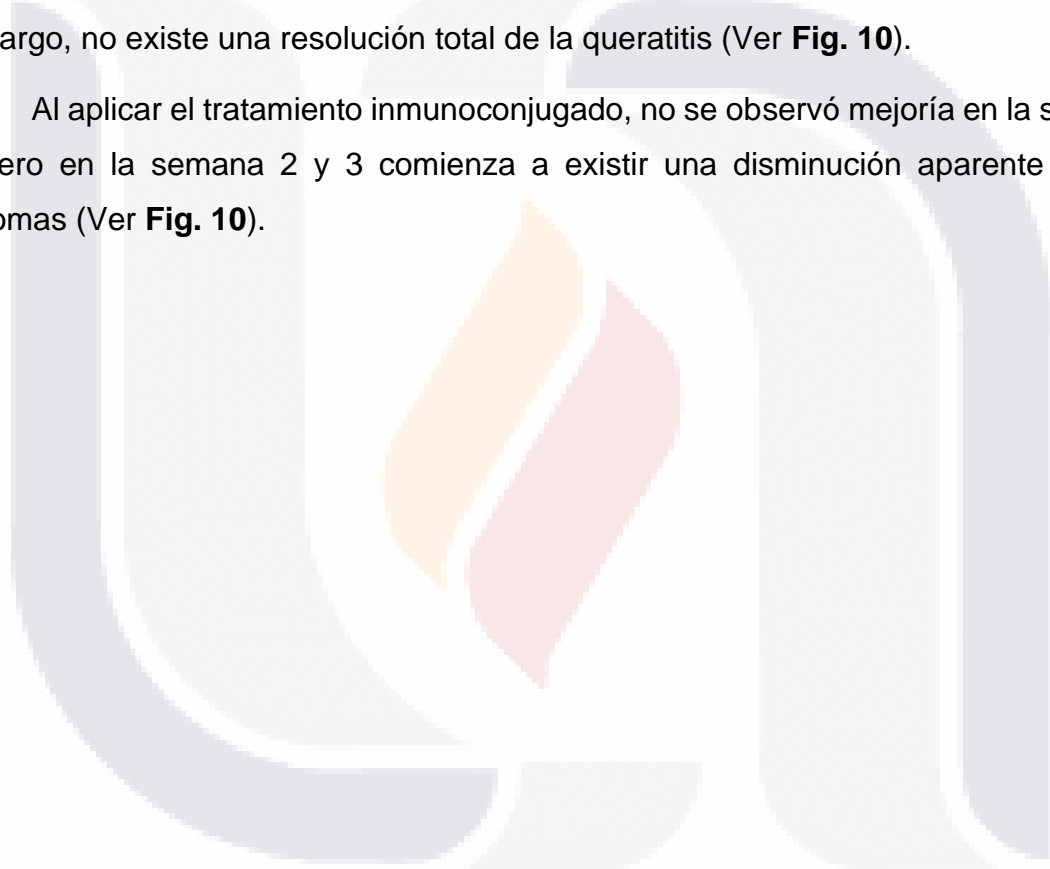


Figura 9. Estudio morfológico de córnea sana de hámster. Aparentemente no existe daño en el tejido. Tinción in vivo con fluoresceína.

En el grupo Sham, no se encontró lesión en la córnea en la semana 1, 2 y 3, por lo que la intervención aparentemente no provoca daños en tejido (Ver **Fig. 10**).

En contraste, los grupos control positivo de 1, 2 y 3 semanas, se observó claramente la presencia de queratitis, formación de úlceras, leucoma y angiogénesis en córnea, teniendo un modelo de AK exitoso. Además, en la semana 1 del grupo tratado con isetionato de propamidina, aparentemente se obtuvo una ligera mejoría de las úlceras corneales, una reducción del infiltrado en forma de anillo y en la presencia de vasos sanguíneos, disminuyendo considerablemente hasta la semana 3; sin embargo, no existe una resolución total de la queratitis (Ver **Fig. 10**).

Al aplicar el tratamiento inmunoconjugado, no se observó mejoría en la semana 1, pero en la semana 2 y 3 comienza a existir una disminución aparente de los síntomas (Ver **Fig. 10**).



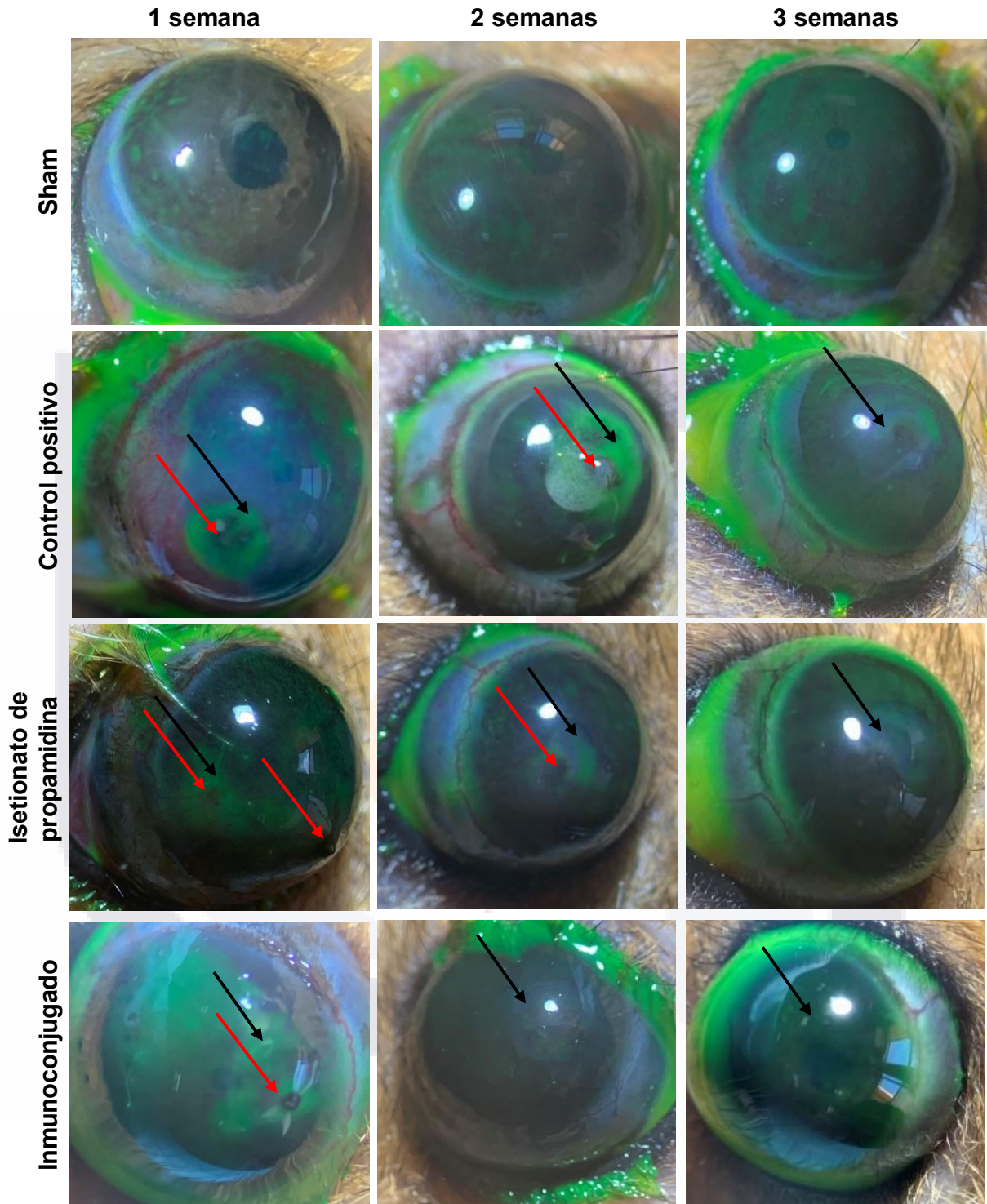


Figura 10. Estudio morfológico de los grupos con intervenciones. El grupo sano y sham, se tiene aparentemente una cornea sin daños. En el grupo control positivo se observa la formación de queratitis; sin embargo, a comparación de este grupo, en el tratado con isetionato de propamidina, existe una mejoría, pero no una resolución total. El tratamiento inmunoc conjugado se observa una aparente mejoría en córnea. Tinción in vivo con fluoresceína.

Estudio histológico (Tinción Hematoxilina & Eosina)

La córnea sana no posee ninguna alteración a nivel tisular; el tejido está organizado, no existe inflamación, presencia de infiltrados celulares del sistema inmunológico o vasos sanguíneos. En el grupo Sham tanto a 1, 2 y 3 semanas se encontraron pequeñas lesiones en el epitelio e inflamación leve, no se encontró infiltrado inflamatorio o vascularización (Ver **Fig. 11**).

Por el contrario, en el grupo control positivo se observa a 1, 2 y 3 semanas la presencia de gran cantidad de infiltrado inflamatorio, formación de úlceras, inflamación, desorganización de las células epiteliales y estromales y angiogénesis; induciendo una respuesta del sistema inmunológico ante la inoculación de *A. griffini* en la córnea (Ver **Fig. 11**).

En el grupo tratado con isetionato de propamidina se apreció una disminución considerable en la cantidad de infiltrado inflamatorio, en la formación de úlceras e inflamación sobre todo en la semana 3 a comparación del grupo que no recibió tratamiento, sin embargo, no se observó una resolución total de la queratitis a las 3 semanas de tratamiento (Ver **Fig. 11**).

Al administrar el tratamiento inmunocombinado, se observó una progresión lenta; no se logró una resolución total del tejido, aunque la cantidad de infiltrado inflamatorio, formación de úlceras y vasos sanguíneos disminuyó considerablemente a comparación del control positivo. Sin embargo, se observó una menor cantidad de infiltrado inflamatorio en el grupo tratado solamente con isetionato de propamidina (Ver **Fig. 11**).

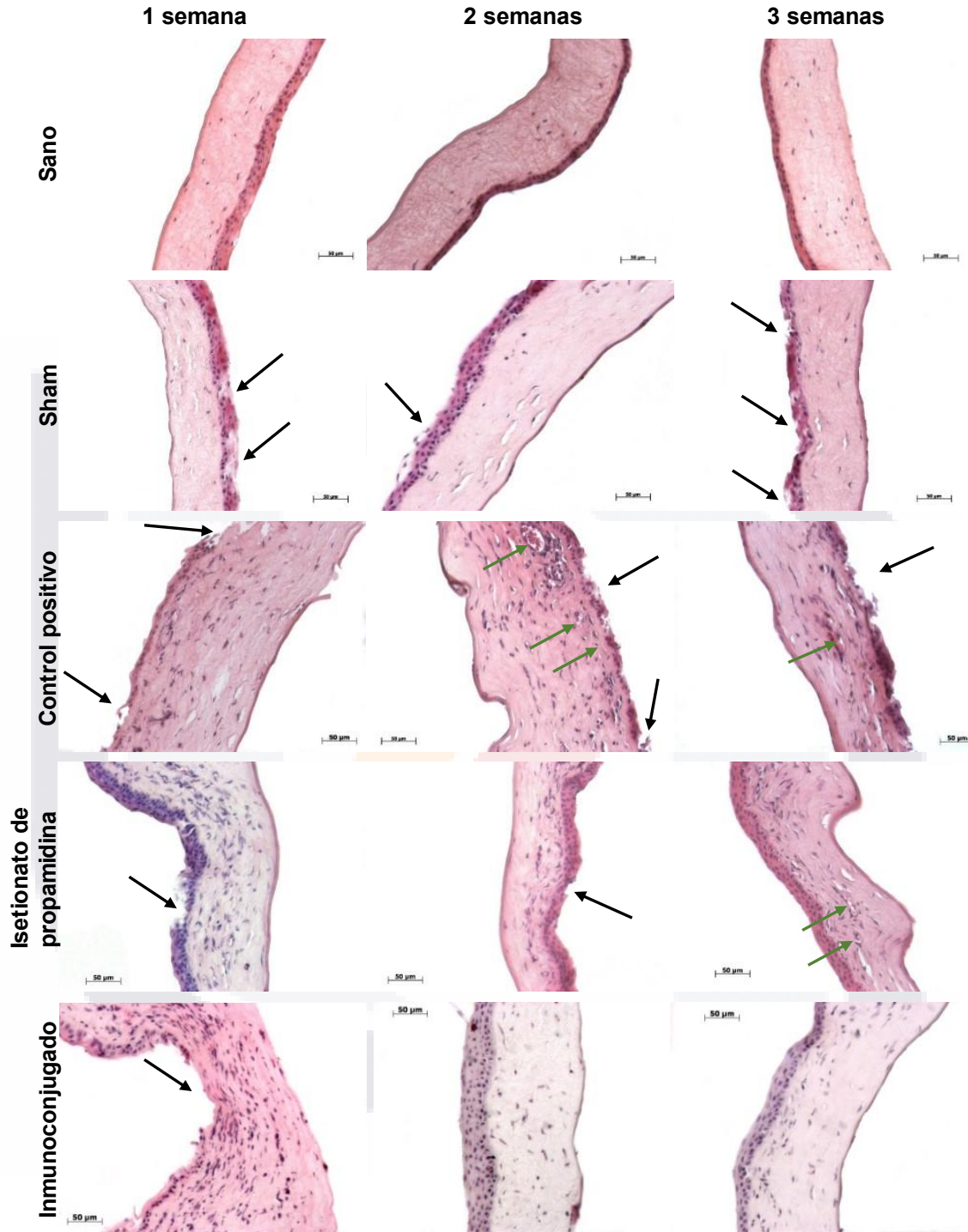


Figura 11. Estudio histológico de la córnea de hámster. En el grupo control positivo existe gran cantidad de infiltrado inflamatorio, desorganización de fibras de colágeno, presencia de vasos sanguíneos y úlceras. En la córnea en los hámsteres bajo tratamiento de isetionato de propamidina se observó una disminución del daño y respuesta inflamatoria; sin embargo, no existió una resolución total. En las córneas tratadas con el inmunoconjugado existe una progresión, aunque no una resolución total. Las puntas de las flechas indican daño epitelio. Tinción mediante la técnica de H&E. Imagen tomada a 20x.

Estudio histológico (Inmunofluorescencia)

En el grupo sano como en el sham (a 1, 2 y 3 semanas) no se encontró la presencia de *A. griffini* en el tejido corneal; algunas células expresaban poca IL-10 e IL-1 β y la actividad de caspasa 3 es baja (Ver **Fig. 12-15**); es importante recalcar que no se encontró diferencias significativas entre estos dos grupos (Ver **Fig. 25**).

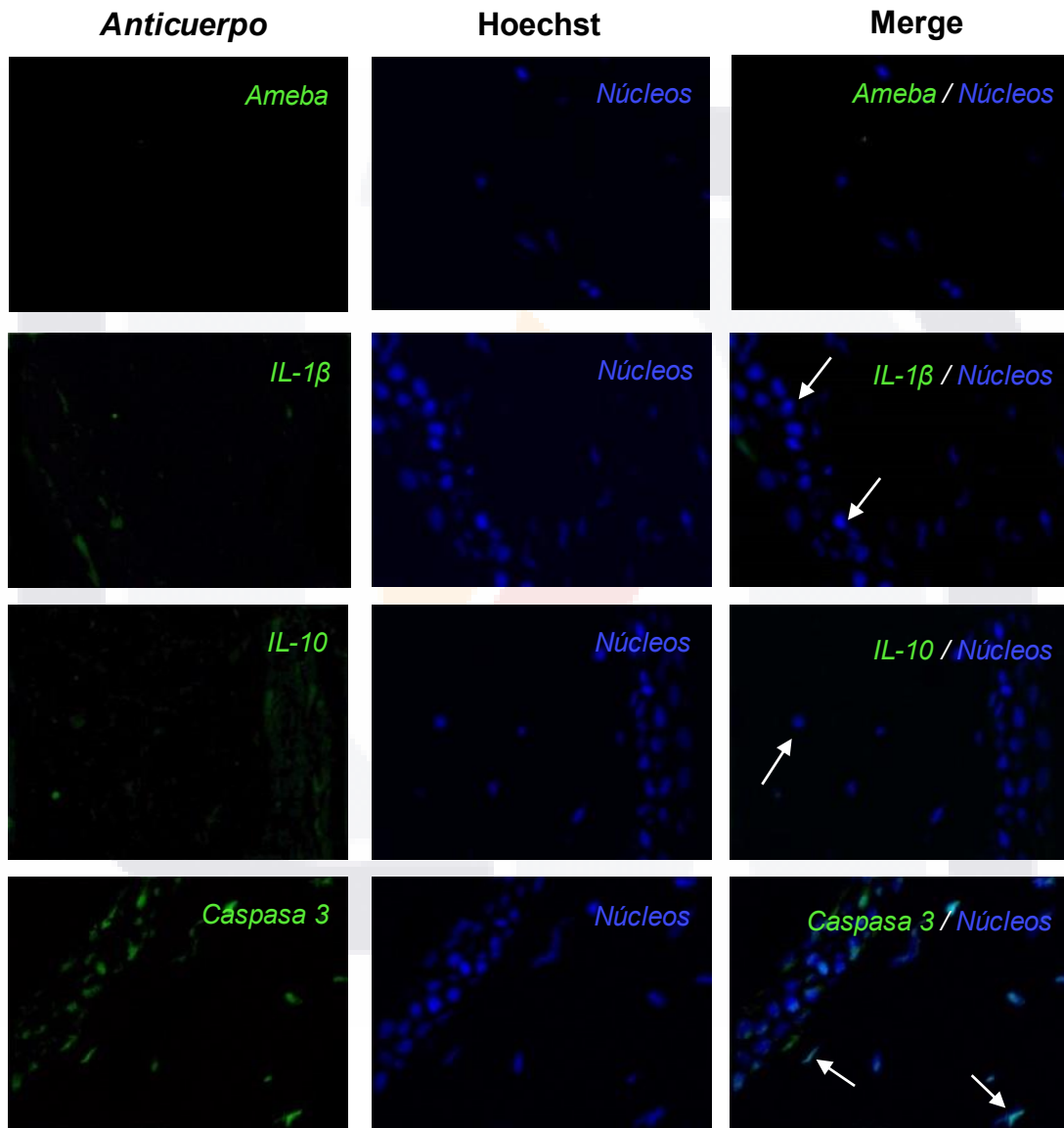


Figura 12. Inmunofluorescencias de córnea sana de hámster. Existe una expresión basal de IL-1 β , IL-10 y poca actividad de caspasa en córnea, sin embargo, no se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1 β , IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

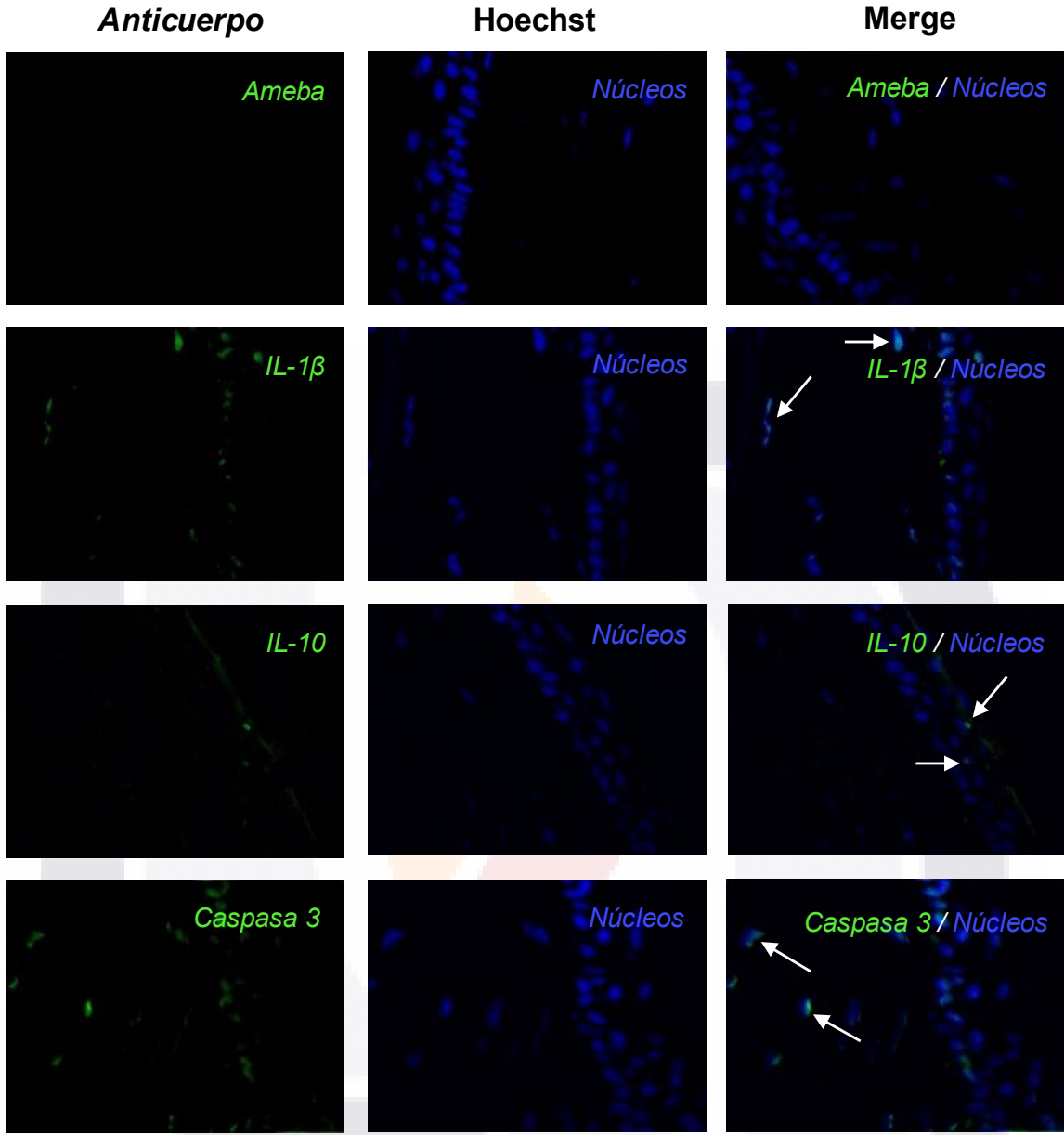


Figura 13. Córnea de hámster a 1 semana de inyectar solución salina. Se observa baja actividad de caspasa 3 y una ligera expresión de IL-10 e IL-1 β ; no se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1 β , IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

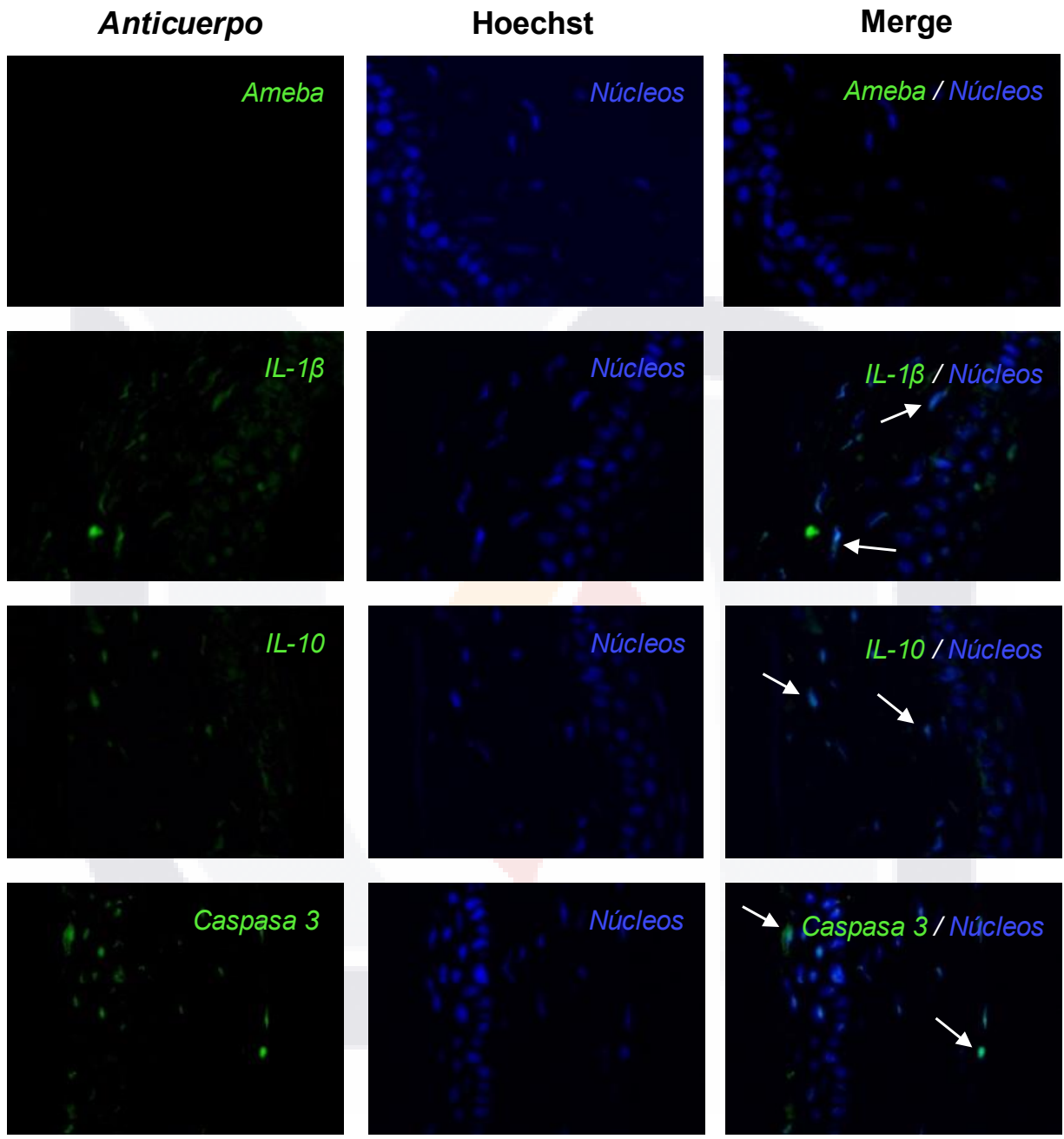


Figura 14. Córnea de hámster a 2 semanas de inyectar solución salina. Se observa baja actividad de caspasa 3 y una ligera expresión de IL-10 e IL-1 β ; no se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1 β , IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

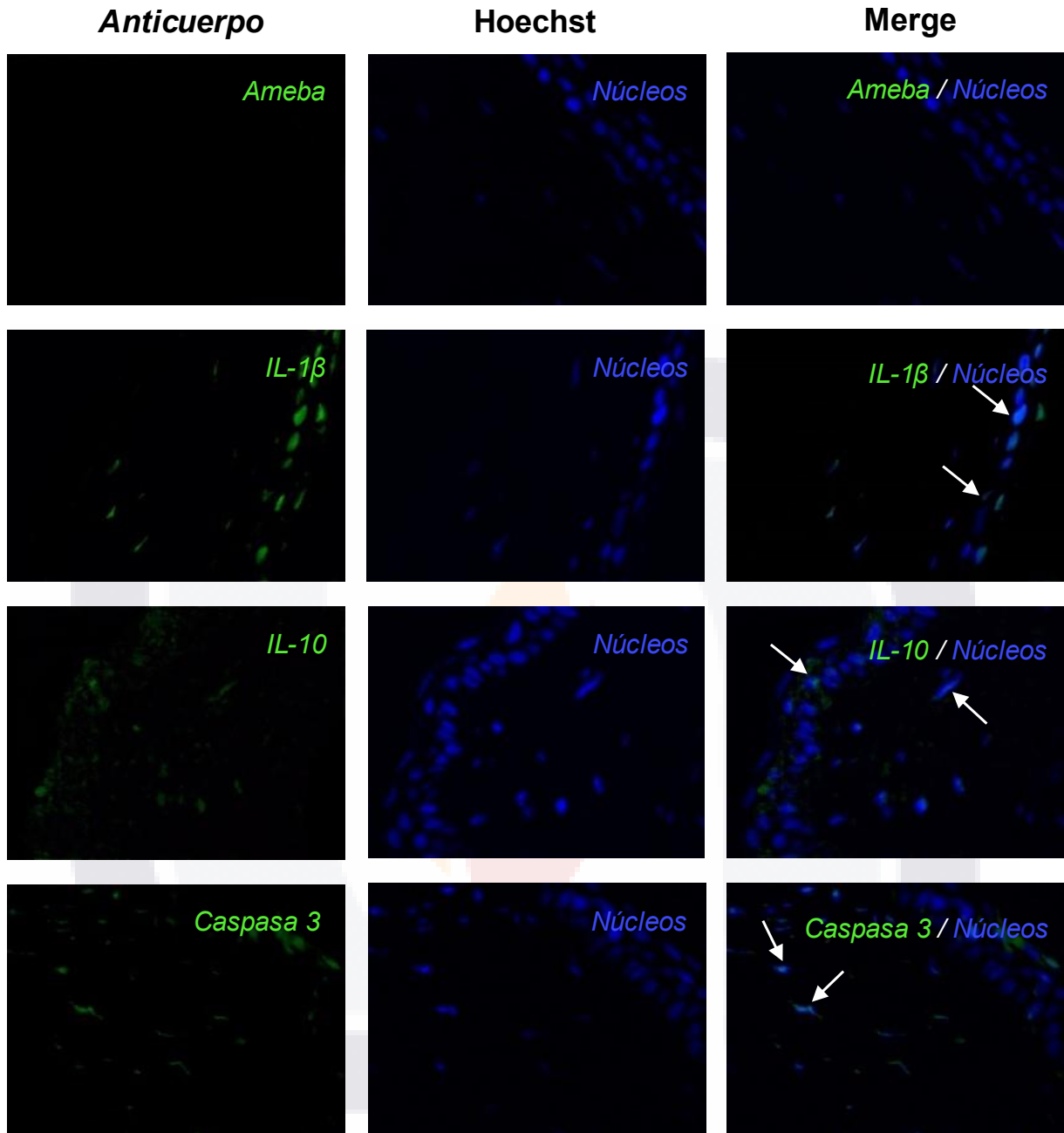
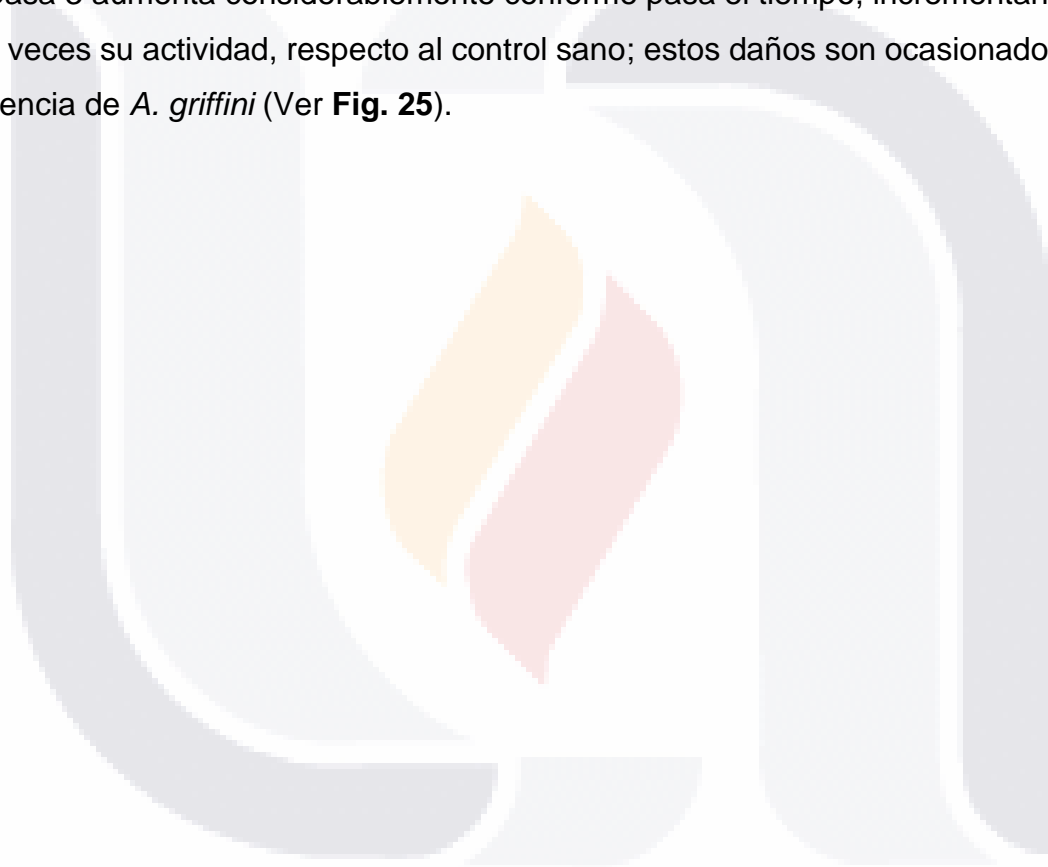


Figura 15. Córnea de hámster a 3 semanas de inyectar solución salina. Se observa baja actividad de caspasa 3 y una ligera expresión de IL-10 e IL-1 β ; no se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1 β , IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

En el grupo que se inoculó la ameba, en las 3 semanas se encontró la ameba en tejido, la forma quística predominó en estroma, mientras que su forma de trofozoíto predominó en el epitelio (Ver **Fig. 16-18**).

La expresión de la IL-1 β e IL-10 a 1 semana no tiene diferencias significativas con respecto al grupo sano y sham; aunque, a las 2 semanas aumenta considerablemente para posteriormente disminuir en la semana 3. La actividad de la caspasa 3 aumenta considerablemente conforme pasa el tiempo, incrementando más de 3 veces su actividad, respecto al control sano; estos daños son ocasionados por la presencia de *A. griffini* (Ver **Fig. 25**).



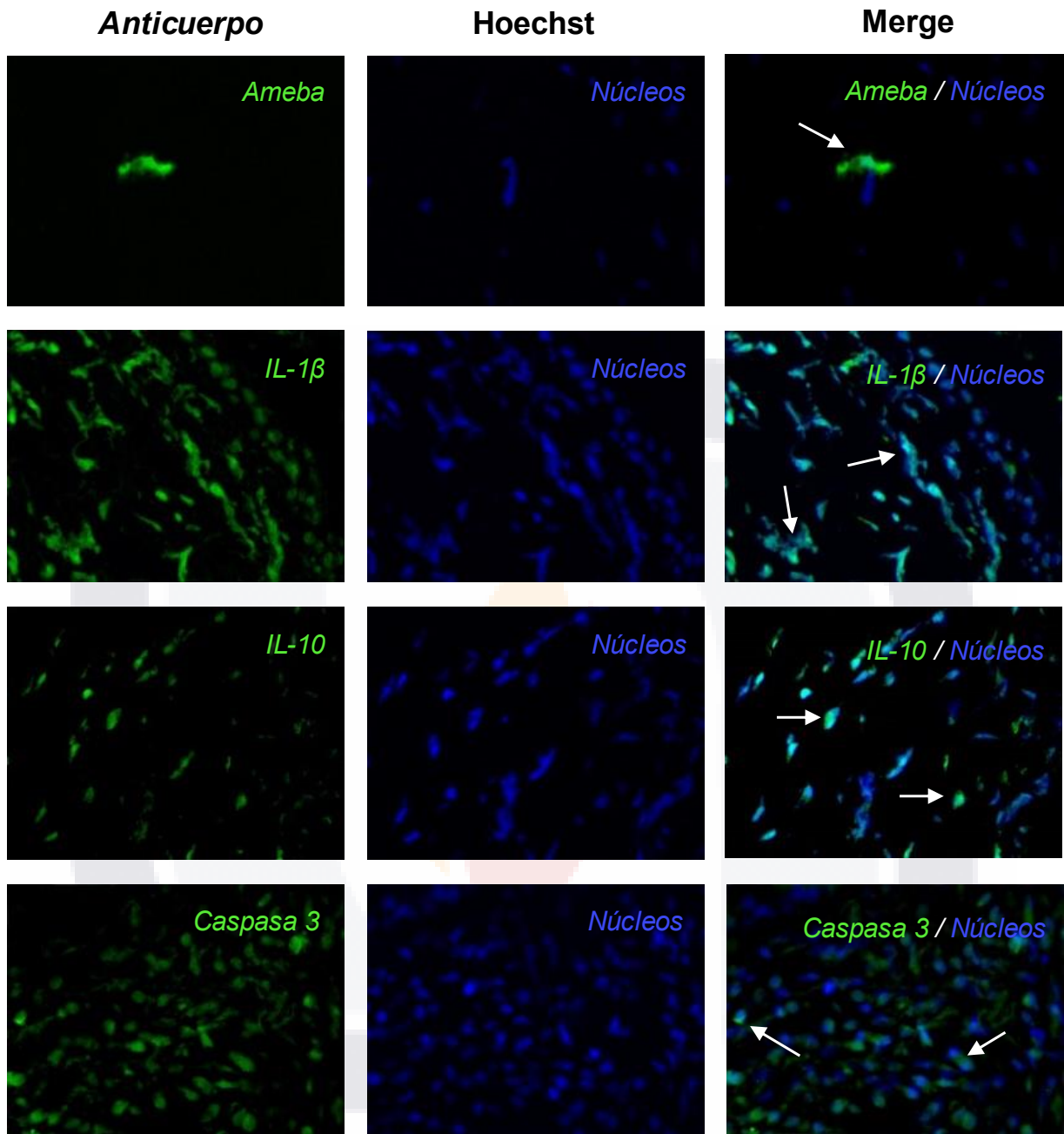


Figura 16. Córnea de hámster a 1 semana de inoculación de *A. griffini*. Se observa actividad de caspasa 3 y una sobre expresión de IL-10 e IL-1β; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1β, IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

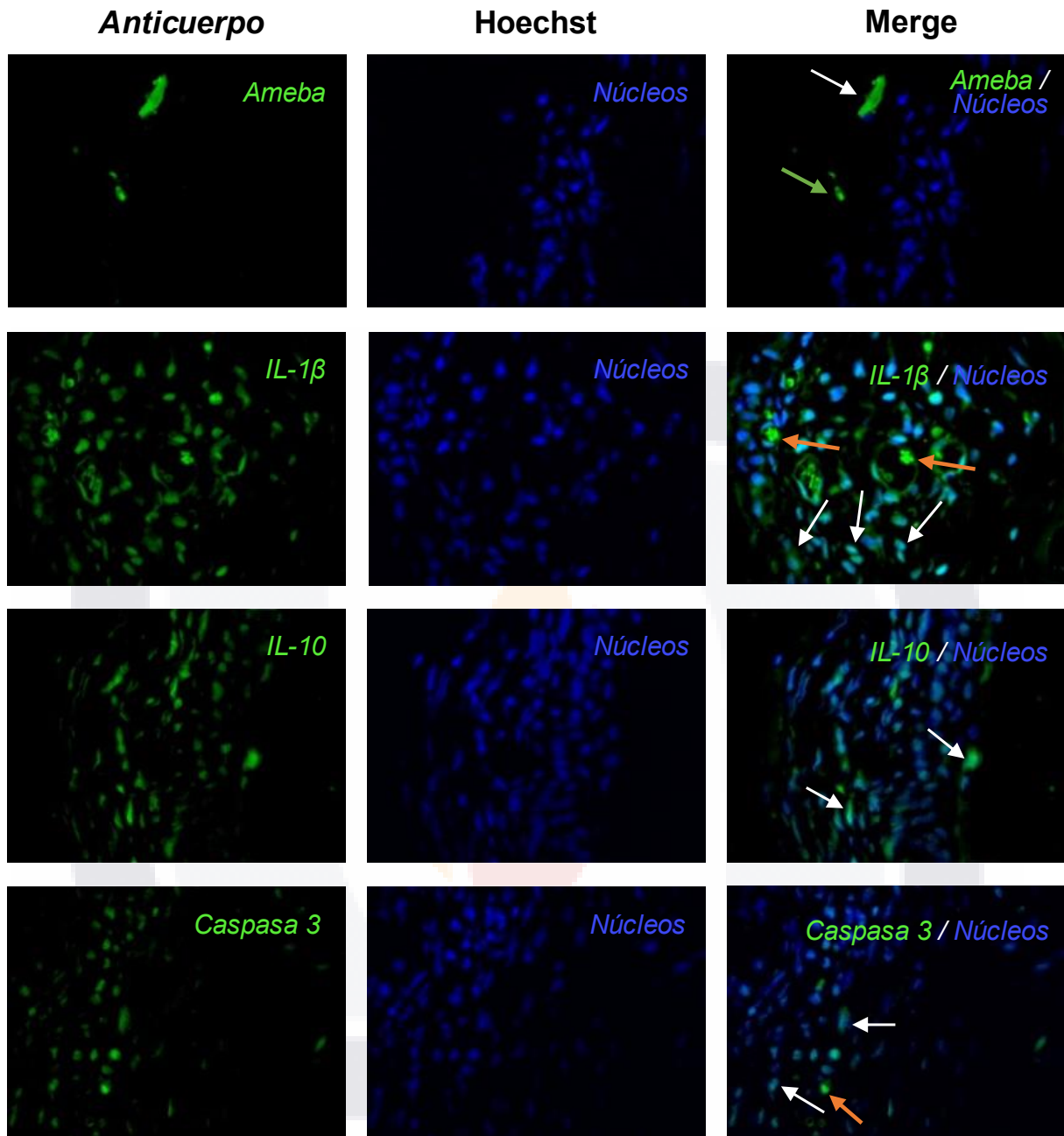


Figura 17. Córnea de hámster a 2 semanas de inoculación de *A. griffini*. Se observa actividad de caspasa 3 y una sobre expresión de IL-10 e IL-1β; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido tanto en forma de trofozoito y quiste. La flecha verde indica la presencia de *A. griffini* en forma de quiste y las flechas naranjas indican vasos sanguíneos. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1β, IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

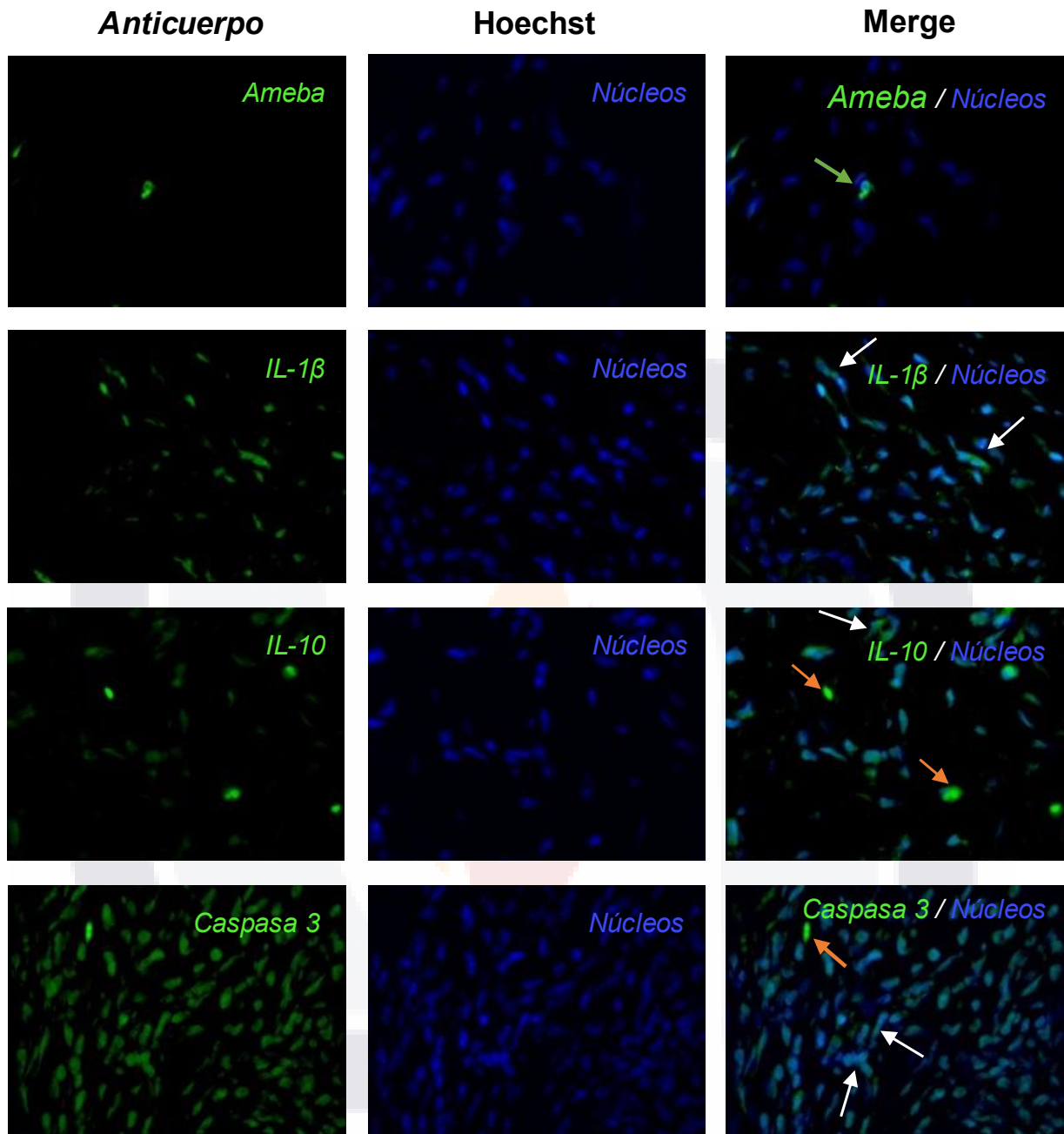
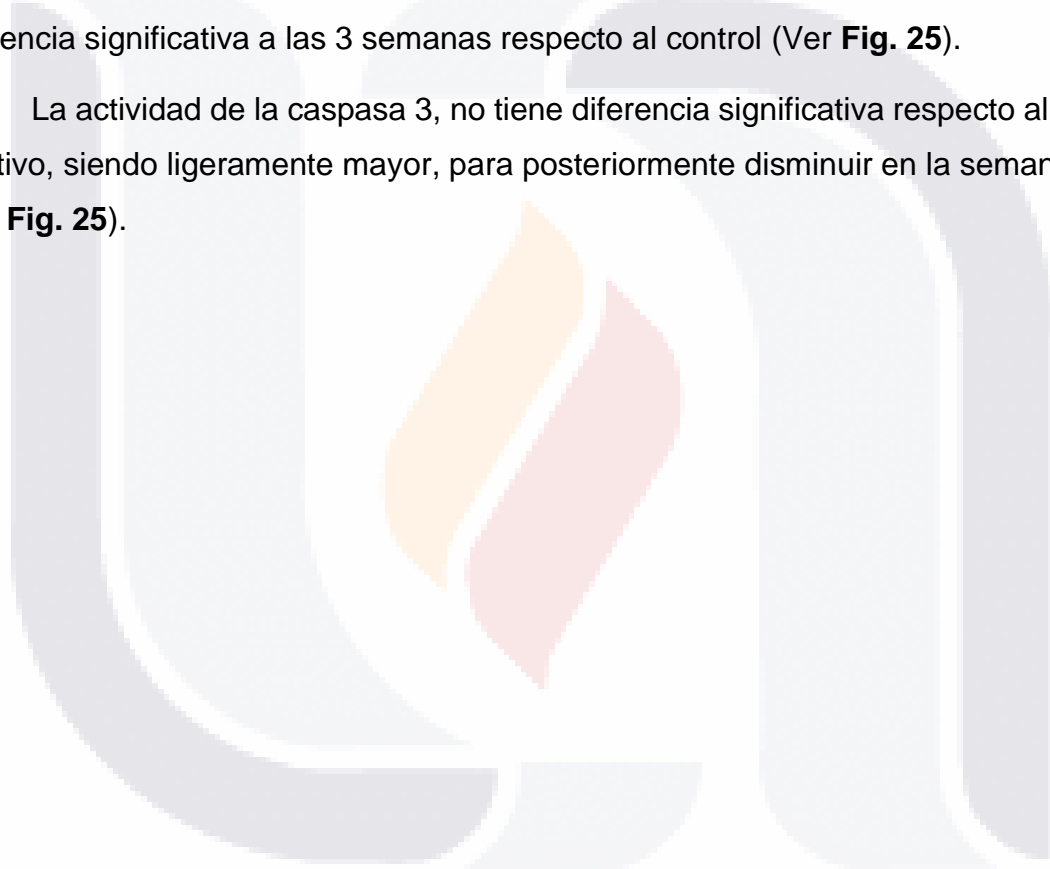


Figura 18. Córnea de hámster a 3 semanas de inoculación de *A. griffini*. Se observa actividad de caspasa 3 y una sobre expresión de IL-10 e IL-1β; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Las flechas naranjas indican vasos sanguíneos. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1β, IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

En el grupo que se administró isetionato de propamidina, se observó que existe la presencia de *A. griffini*; sin embargo, el número de amebas encontradas en tejido eran menores (Ver **Fig. 19-21**).

La expresión de la IL-1 β tuvo diferencia significativa en la semana 1, 2 y 3, con respecto al control sano y sham; se puede observar que, al inicio del tratamiento, al igual que la IL-10, tiene mayor número de células activadas a comparación de los demás grupos. Además, se puede observó que en ambas interleucinas en la semana 2 y 3, el número de células activadas disminuyen. No obstante, la IL-1 β posee diferencia significativa a las 3 semanas respecto al control (Ver **Fig. 25**).

La actividad de la caspasa 3, no tiene diferencia significativa respecto al control positivo, siendo ligeramente mayor, para posteriormente disminuir en la semana 2 y 3 (Ver **Fig. 25**).



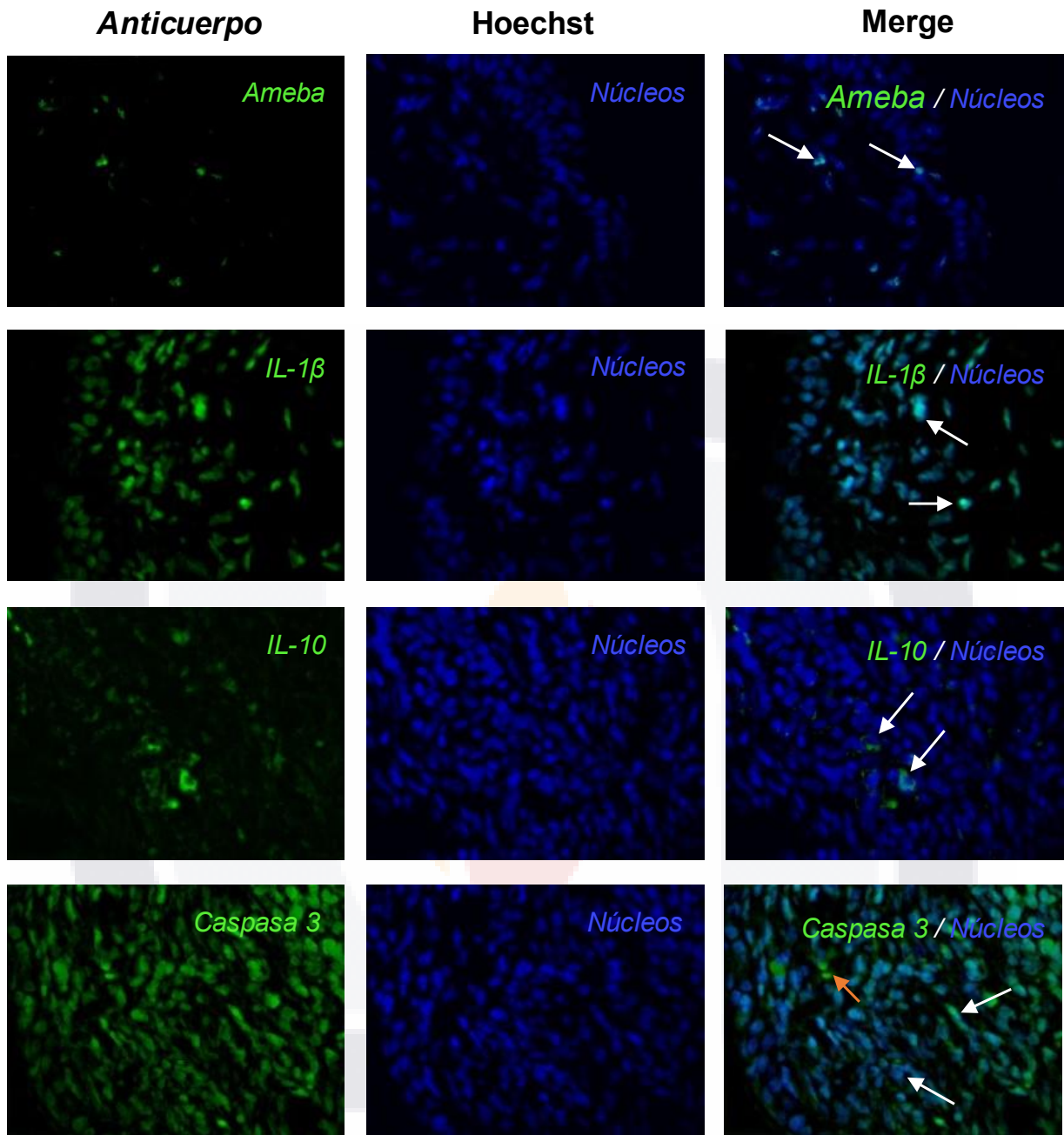


Figura 19. Córnea de hámster a 1 semana de tratamiento con isetionato de propamidina. Se observa actividad de caspasa 3 y una sobre expresión de IL-10 e IL-1 β ; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Las flechas naranjas indican vasos sanguíneos. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1 β , IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

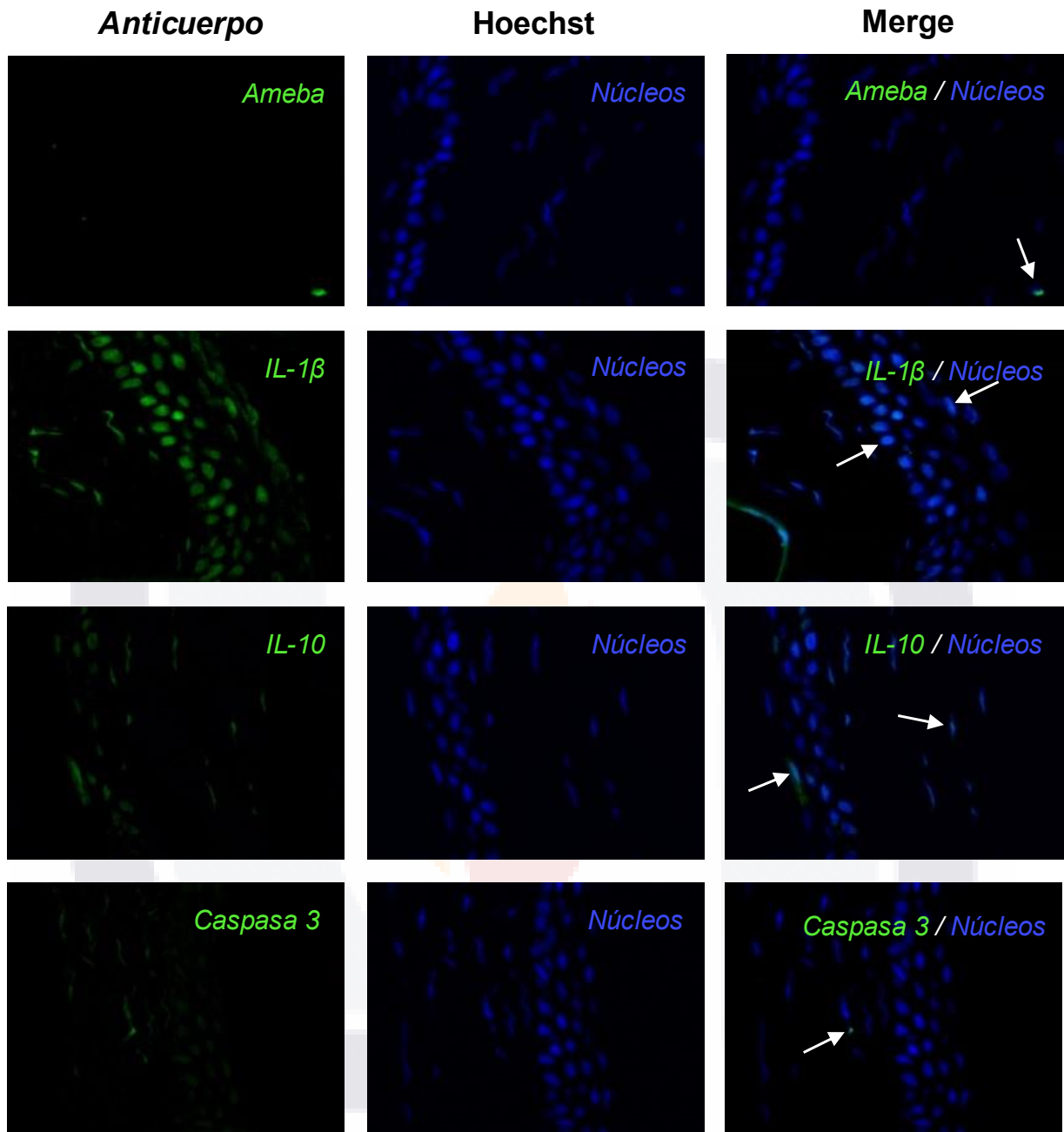


Figura 20. Córnea de hámster a 2 semanas de tratamiento con isetionato de propamidina. Se observa una disminución de la actividad de caspasa 3 y de la expresión de IL-10 e IL-1β; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Las flechas naranjas indican vasos sanguíneos. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1β, IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

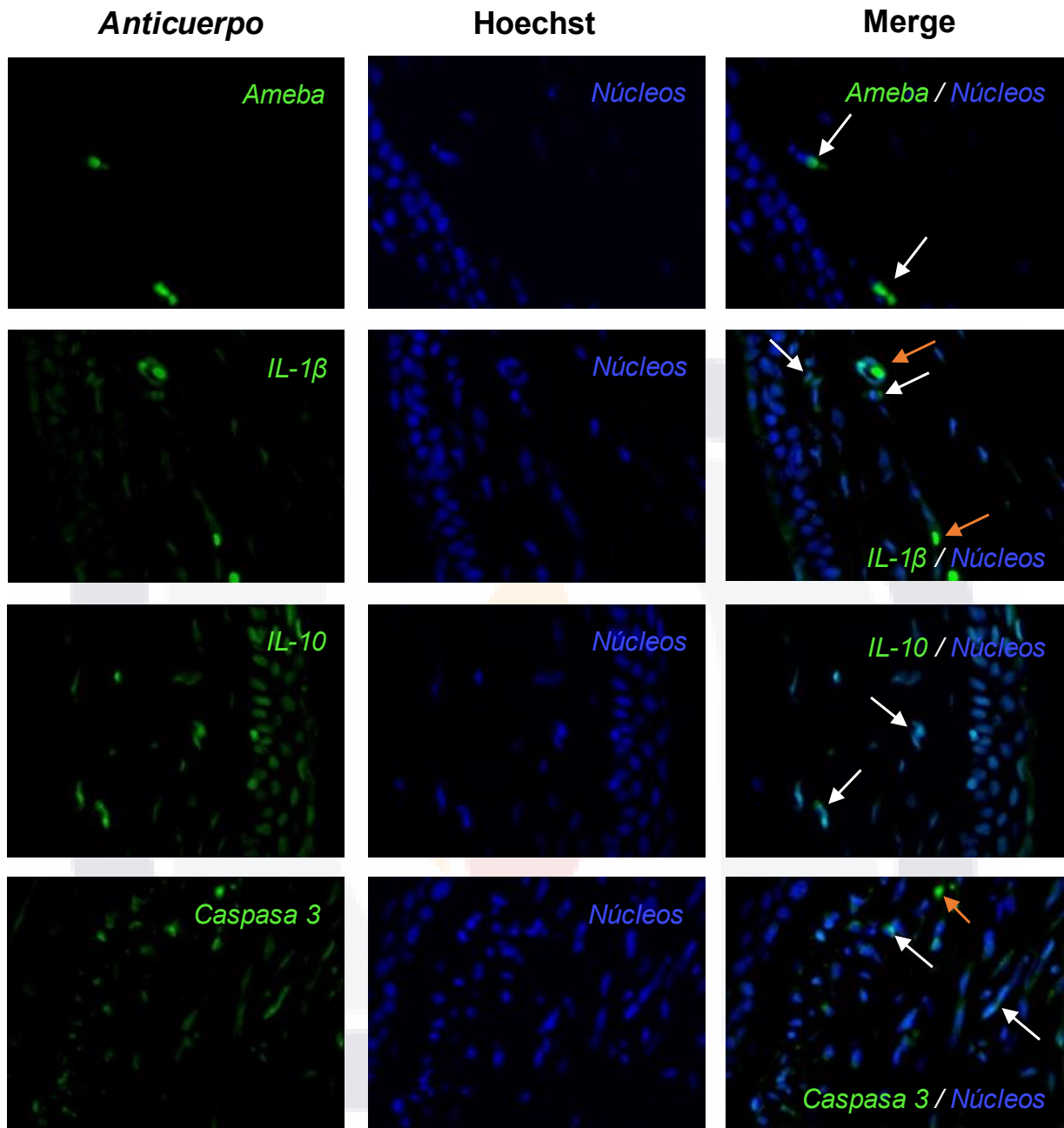


Figura 21. Córnea de hámster a 3 semanas de tratamiento con isetionato de propamidina. Se observa una disminución de la actividad de caspasa 3 y de la expresión de *IL-10* e *IL-1 β* ; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Las flechas naranjas indican vasos sanguíneos. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, *IL-1 β* , *IL-10* y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

El grupo al que se le administró el tratamiento inmunocombinado con isetionato de propamidina se detectó la ameba en tejido en su forma de trofozoíto, en cantidades bajas (Ver **Fig. 22-24**).

La IL-1 β se mantuvo a niveles bajos de expresión desde la semana 1, obteniendo una diferencia significativa contra el grupo isetionato; por otra parte, no existe diferencia significativa contra el grupo sham y sano. La expresión de IL-10 y la actividad de la caspasa 3, aumentó considerablemente en la semana 1, disminuyendo su expresión en la semana 2 y 3 (Ver **Fig. 25**).

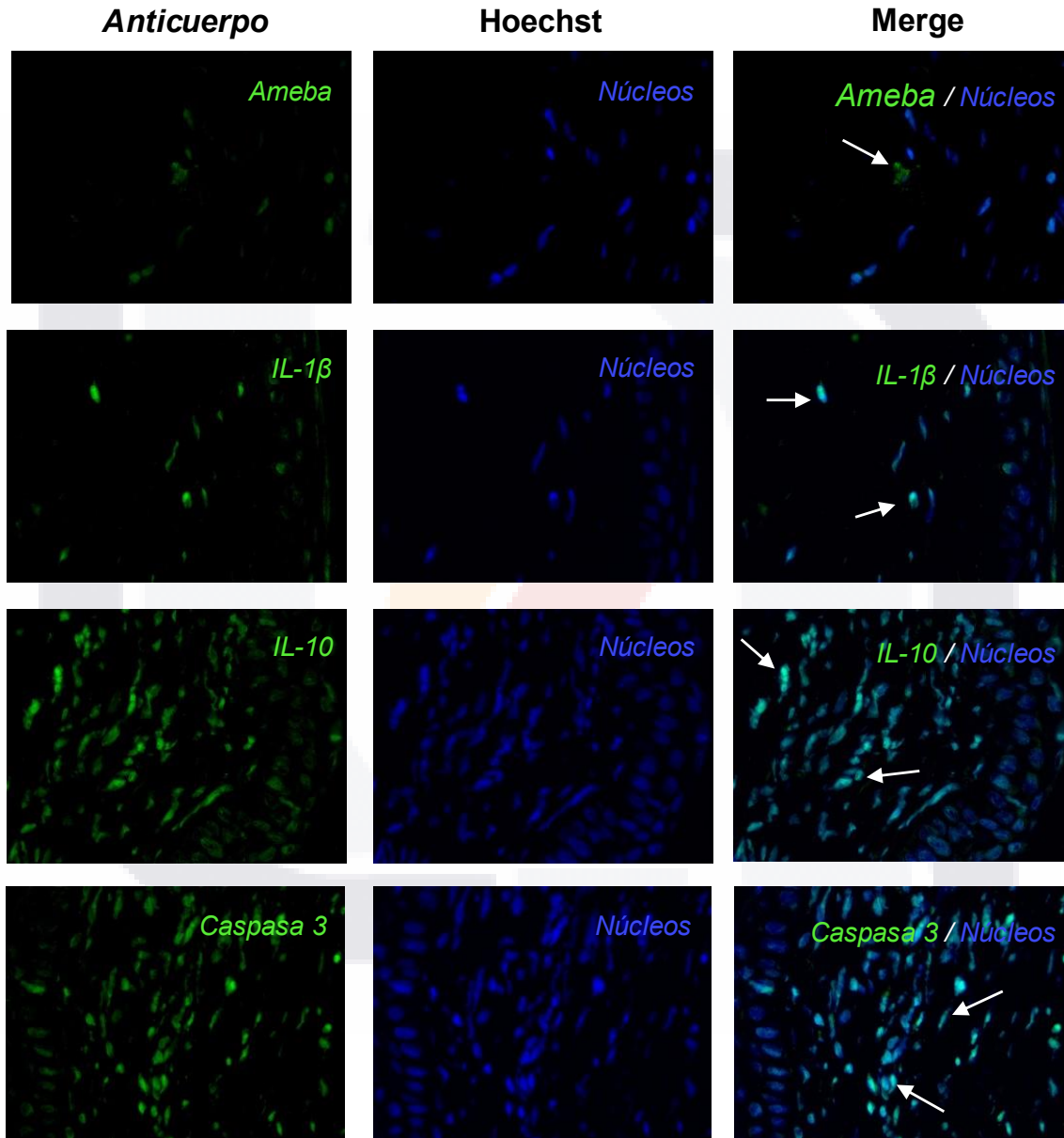


Figura 22. Córnea de hámster a 1 semana de tratamiento inmunocombinado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales. Se observa una elevada actividad de caspasa 3 e IL-10, y una disminución de la expresión de IL-1 β ; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1 β , IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

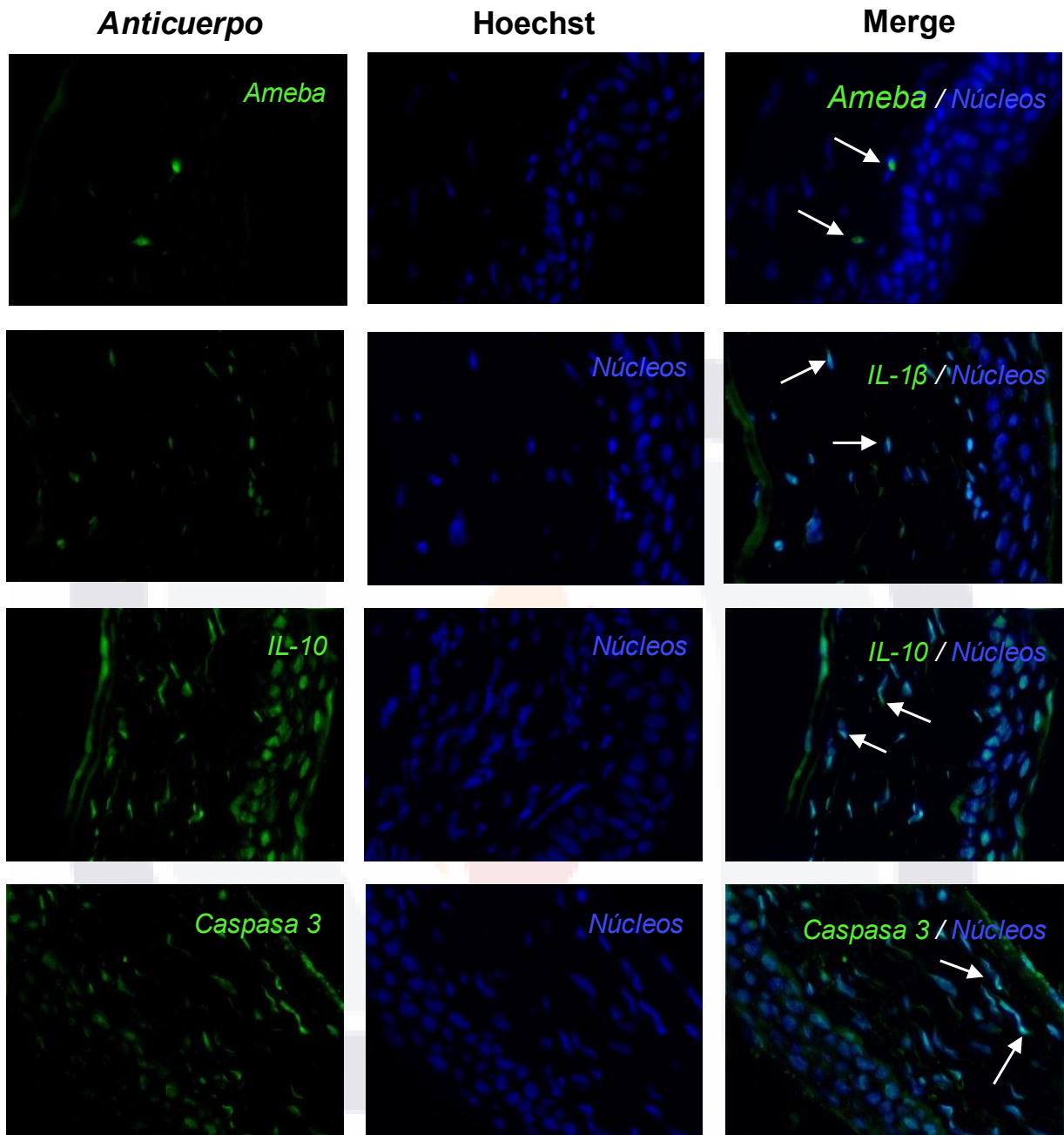


Figura 23. Córnea de hámster a 2 semanas de tratamiento inmunocombinado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales. Se observa una disminución de la actividad de caspasa 3, IL-10 e IL-1 β ; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1 β , IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

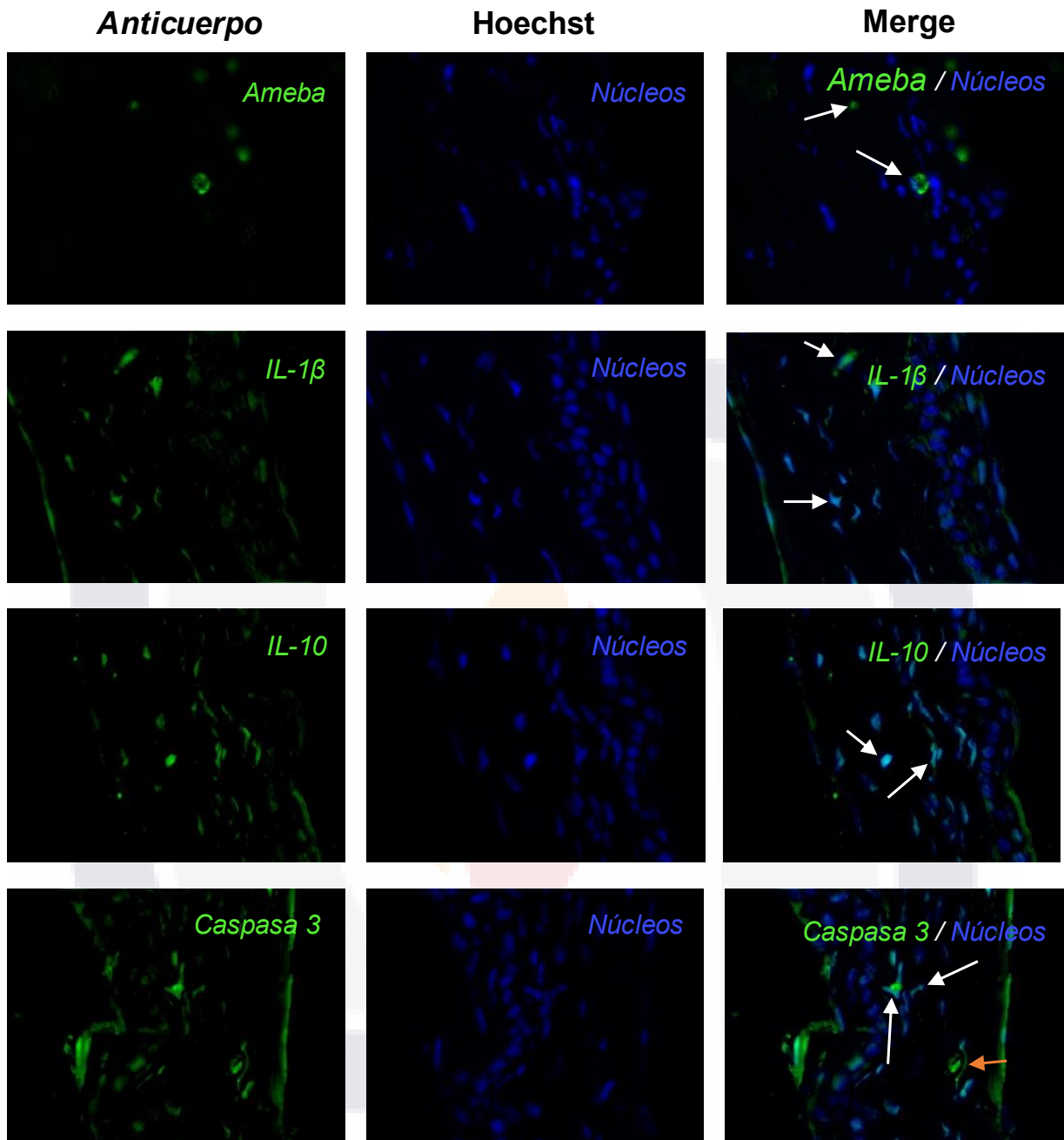


Figura 24. Córnea de hámster a 3 semanas de tratamiento inmunocombinado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales. Se observa una disminución de la actividad de caspasa 3, IL-10 e IL-1β; se encontró la presencia de *A. griffini* en tejido. Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra *A. griffini*, IL-1β, IL-10 y caspasa 3 activada. Alexa Flúor 488nm (color verde) y reactivo Hoechst (color azul). Imágenes tomadas a 40x.

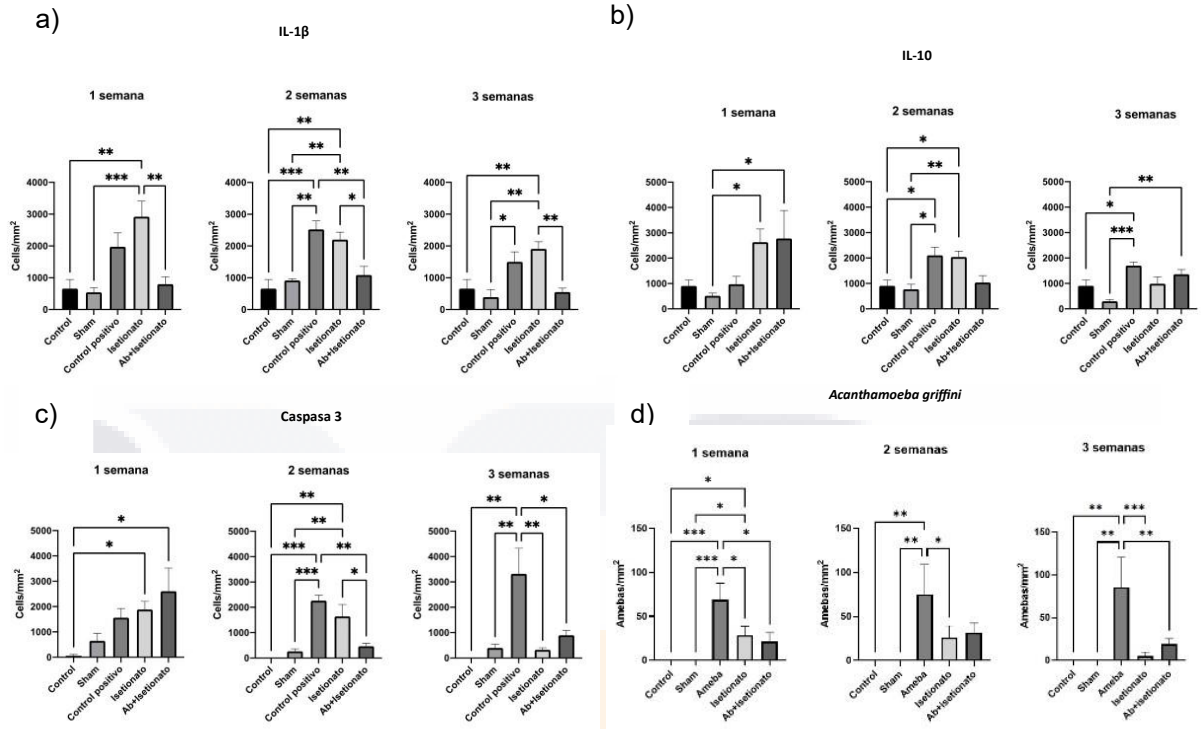


Figura 25. Gráficas de cuantificación de células activas en inmunofluorescencia. a) Expresión de IL-1 β . b) Expresión de IL-10. c) Actividad de caspasa 3. d) Conteo de *A. griffini* en tejido. Se utilizó el método de conteo de células activadas por campo. La prueba estadística se realizó dependiendo de la prueba de normalidad. Se aplicó la prueba ANOVA de una vía y post hoc Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Discusión

En el grupo sano, se puede observar la expresión basal de las interleucinas tanto 10, 1 β como la activación de caspasa 3 en las 3 semanas; esto es debido a la expresión basal de IL-1 β en epitelios por el estímulo con el exterior; por este motivo, se expresa constitutivamente la IL-10 y antagonistas de la IL-1 β , evitando así la sobreestimulación del sistema inmunológico, facilitando la transparencia e integridad de la córnea. Por otro lado, la activación de caspasa 3, genera la apoptosis que es una muerte celular programada que no genera inflamación ni activación del sistema inmunológico, para posteriormente ser fagocitado por macrófagos; este método es constantemente utilizado por los tejidos para eliminar células dañadas o viejas, para posteriormente ser reemplazadas por otras nuevas (99–101).

En el grupo Sham, se observó descamación en el epitelio y en algunos casos edema, esta respuesta es causada por el traumatismo que genera la intervención y/o el rascado (102); sin embargo, se observó que a comparación del grupo sano, en el grupo sham se aumentó la activación de caspasa 3; lo que concuerda con los resultados de Steve, W y col., donde reporta la activación de caspasa 3, provocando apoptosis y necrosis en tejido corneal en presencia de algún tipo de lesión en epitelio, que dependiendo del grado de daño, puede llegar a expresarse en los queratocitos del estroma, que por el contrario, en el caso de las córneas sanas no es común encontrar (101).

A diferencia de lo mencionado anteriormente, a las 2 semanas, en el grupo sham se observó una disminución en la activación en las células de caspasa 3, que se mantiene constante a las 3 semanas para la remodelación del tejido; lo cual se puede comprobar con la expresión de IL-1 β e IL-10 que poseen el mismo comportamiento en este grupo (99,100).

La IL-10 es expresada por las células epiteliales y queratocitos después de existir algún tipo de lesión, por tal motivo, se observó que se mantiene constante a la semana 1 y 2, para posteriormente disminuir su expresión, confirmando que, con el tiempo en el que se realizaron los sacrificios, el tejido dañado estaba en reparación en la semana 1 y 2 (99,100). No obstante, es importante mencionar que a pesar que se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tiene en apariencia diferencias en la expresión de IL-10, IL-1 β y activación de caspasa 3, no existe diferencia significativa entre el grupo control sano y sham en cada semana, indicando que el tejido a pesar del daño realizado por la aguja, se trató de un daño mecánico que no generó inflamación o presencia de infiltrado inflamatorio, además que los hámsteres no desarrollaron infección de ningún agente patógeno debido a la intervención; lo que coincide con el estudio morfológico, ya que la córnea aparentemente no posee ningún tipo de abrasión u opacidad.

En el estudio morfológico se puede observar que, al introducir *Acanthamoeba griffini* en la córnea de hámster por medio de la inyección intraestromal (grupo control positivo), se obtuvo la presencia de úlceras e infiltrado estromal en forma de anillo tal como menciona Shaan N y col. (103), desarrollando en los hámsteres una queratitis de diferentes grados con 50,000 trofozoítos en la semana 1, 2 y 3, siendo la más exacerbada en la semana 2.

En presencia de la ameba, existe una sobre activación de caspasas en estroma y epitelio, debido a la fisiopatología de la queratitis, activando esta vía de señalización en las células huésped, para posteriormente ser fagocitada por la ameba (104).

Se sabe que el ojo es un órgano inmunoprivilegiado, posee inmunomoduladores que reducen la inflamación como la IL-10 (63). En el trabajo realizado por Manuel, Ávila y col., se reporta un incremento de IL-10 a las 2 y 4 semanas de inoculación de *A. griffini* en rata, que disminuyó en la semana 8 (36), coincidiendo este comportamiento con este trabajo, puesto que se observa que la expresión de esta interleucina a la semana 1 aumenta ligeramente a comparación del grupo sham o sano, pero no existe diferencia significativa entre estos tres grupos, no obstante se dispara a la semana 2, para posteriormente disminuir en la semana 3.

Según los experimentos de Mattana, A. et. al, indican que la presencia de *Acanthamoeba spp.* genera una sobre expresión de IL-10, con el fin de evadir y limitar la activación del sistema inmunológico, lo explica, por qué en la semana 2 se tiene una sobre expresión de esta interleucina, a pesar de que es cuando se tiene más exacerbada la queratitis (105), para posteriormente disminuir junto con los demás indicadores de daño. Este comportamiento es semejante al de la IL-1 β , no obstante,

su expresión es el doble a la primera semana a comparación del grupo sano y control, para aumentar a las 2 semanas y posteriormente disminuir en la semana 3.

Lo anterior se confirma con el estudio histológico con la tinción de Hematoxilina y Eosina, donde se puede encontrar la presencia de infiltrados e inflamación, además de una desorganización celular y daños en el epitelio corneal; sin embargo, es importante mencionar que no hubo daño significativo en el endotelio de la córnea; este resultado concuerda con lo que menciona Clarke, D y Niederkorn, J. en su review, sólo en muy escasas ocasiones la queratitis corneal producida por *Acanthamoeba* progresa a una infección intraocular o daño al endotelio (41), concentrando una mayor cantidad de células inflamatorias en la parte anterior del estroma, a pesar de ello, en la semana 3 se encuentra una disminución de la queratitis.

Por otro lado, el isetionato de propamidina es un compuesto catiónico de amplio espectro (89), debido a esto es utilizado para la resolución de la queratitis amebiana; aunque existen varios reportes que indican que posee propiedades citotóxicas en córnea, motivo por el que se disminuye la dosis y se utiliza por tiempos prolongados (11,106).

No existen estudios que expliquen el comportamiento de las interleucinas, actividad de caspasa 3 y presencia de *A. griffini* en tejido *in vivo* para la resolución de queratitis con la administración de isetionato de propamidina; sugiriendo en este trabajo que la alta expresión de IL-1 β es consecuencia del isetionato en conjunto con la presencia de *A. griffini* en tejido; disminuyendo la expresión de esta interleucina al bajar la dosis a 2 y 3 semanas.

En el estudio realizado por Shi et al. demostraron el poder antiquístico del isetionato *in vitro* a 1, 2 y 3 semanas (107). En nuestro estudio *in vivo* se encontraron varios quistes en tejido y se disminuyó considerablemente la cantidad de trofozoítos, sugiriendo que el isetionato de propamidina ocasiona el enquistamiento de *A. griffini*, coincidiendo con la literatura, ya que en condiciones adversas, la ameba comienza su diferenciación de trofozoíto a quiste siendo más difícil su destrucción, disminuyendo la efectividad de los tratamientos (108).

Además, la ameba en su forma quística no es inmunógena, disminuyendo la respuesta inflamatoria del sistema inmunológico (51); esto explica el por qué a pesar de que existen algunos quistes en el tejido corneal se observa mejoría en su morfología y reducción del infiltrado inflamatorio lo cual se comprueba con los resultados de la técnica con Hematoxilina y eosina, por lo que tiene que seguirse administrando el tratamiento hasta erradicar todos los quistes.

La expresión de IL-10 posee un efecto antiinflamatorio, relacionada con la cantidad de IL-1 β , por lo que en la semana 1 existe una gran expresión de IL-10, disminuyendo en las semanas 2 y 3. Asimismo, la disminución de trofozoítos provoca que no exista estímulo para su sobreexpresión (99).

Los resultados anteriores son novedosos, ya que no existen trabajos similares en literatura que expliquen como el isetionato de propamidina daña a la córnea, debido a que varios trabajos se centran en modelos *in vitro* (107), más no involucran como el tejido reacciona ante la presencia de este medicamento.

Otra novedad de este trabajo es el estudio que incluye morfología, histología y expresión de interleucinas, haciendo de este un trabajo más completo que refleja el daño con marcadores proinflamatorios, antiinflamatorios, daño tisular y la localización de la ameba, garantizando con los diferentes grupos como es que la ameba y los tratamientos afectan al tejido, ya que en la mayoría de los trabajos publicados se tratan de casos clínicos, o estudios *in vivo* que sólo involucran el estudio morfológico con ayuda de un estereoscopio (52), sin tomar en cuenta cortes histológicos.

Para evitar el daño del isetionato de propamidina se sintetizó un inmunoconjugado, estos tratamientos comúnmente son usados contra el cáncer (109), por lo que hace a nuestro medicamento novedoso al utilizar este principio en otra patología.

Al obtener los anticuerpos policlonales mediante métodos tradicionales como fue el método utilizado por Ventura Juárez et al. (110), se extrajo el suero, comprobando mediante la inmunofluorescencia y ELISA el reconocimiento del antígeno, obteniendo la dilución necesaria para las posteriores pruebas de detección de la ameba en tejido. Posteriormente para el diseño del inmunoconjugado, se han

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utilizado varios métodos que van desde utilizar ingeniería genética como métodos tradicionales como lo es el uso de glutaraldehído (28,109).

Un punto importante para la síntesis de este tipo de tratamientos es la detección de antígeno, comprobándolo por medio del método de ELISA antes y después de la inmunoconjugación, arrojando como resultado una disminución en la capacidad de reconocimiento del antígeno, mediante la adición de grupos aldehídos de forma inespecífica, motivo por el cual se disminuyó su capacidad de reconocimiento.

Sinkule et al. realizó inmunoconjugación mediante varios métodos, obteniendo tratamientos inmunoconjugados con el uso de glutaraldehído; sin embargo se disminuyó su capacidad de reconocimiento hacia su antígeno, pero obtuvieron un medicamento funcional (28).

En este caso el tratamiento obtenido, se comprobó la efectividad de la inmunoconjugación mediante la respuesta biológica del tratamiento; ya que al administrar este tratamiento a los hámsteres se tiene una disminución de la IL-1 β desde la semana 1, además de un aumento de la actividad de caspasa 3, sugiriendo que el tratamiento disminuye la patología en la fase aguda, y comienza la remodelación del tejido, controlando la infección. En la semana 2 y 3, disminuyen considerablemente, obteniendo un resultado sin diferencias significativas contra el grupo control y sham.

Lo anterior se puede reflejar en los resultados obtenidos del estudio histológico y morfológico; las úlceras disminuyen considerablemente, así como la cantidad de infiltrado inflamatorio; recuperando su transparencia y, por ende, logrando mejora en el tejido. Sin embargo, sólo fueron encontrados en tejido la ameba en forma de trofozoítos, teniendo un logro importante, debido a que el isetionato a pesar de su poder antiquístico que reportan algunos autores (89), es más sencillo de eliminar el trofozoíto que su forma quística, debido a que la doble pared celular es casi impermeable al uso de tratamientos, teniendo efectos solo algunos de ellos, que en ocasiones son tóxicos para la córnea, como lo es el uso del isetionato de propamidina.

Otro punto interesante es el comportamiento de la IL-10, ya que se trata de un marcador antiinflamatorio y de recuperación del tejido, el cual se encuentra elevado en

la semana 1, disminuyendo en la semana 2 y 3, además de no tener diferencia estadísticamente significativa en comparación con el isetionato de propamidina.

Además, el tratamiento inmunconjugado no arrojó resultados de rechazo por parte de los 5 hámsteres utilizados para este protocolo; sin embargo, se requieren más estudios al respecto a nivel molecular mediante técnicas como PCR y Western Blot, con el fin de ahondar en el mecanismo de acción de este tratamiento potencial.



Conclusión

El tejido sano tiene una expresión basal de IL-10 y caspasas 3, con el fin de tener un buen funcionamiento, sin embargo, a pesar de que existe la expresión basal de IL-1 β , se tiene la expresión de IL-10 y antagonistas para contrarrestar la constante estimulación del exterior.

La intervención con solución salina no afecta significativamente a la córnea; por lo tanto, la inyección intraestromal de solución salina por sí sola no causa daño, por lo que el daño observado en la córnea es causado por *A. griffini*.

Se indujo queratitis amebiana en hámsteres dorados, inoculando 50,000 trofozoítos, siendo un buen modelo para estudios de esta patología, encontrando en el epitelio y estroma quistes y trofozoítos.

El tratamiento con isetionato de propamidina genera una disminución de la patología, encontrado una disminución importante a 3 semanas de tratamiento, sin embargo, no existe una resolución total.

El tratamiento inmunoconjugado tiene el efecto de disminuir la inflamación en córnea, el infiltrado inflamatorio, formación de úlceras y evita la diferenciación de la ameba a su forma quística, esto utilizando menor cantidad de isetionato de propamidina; aunque no se llegó a una resolución total de la patología.

Referencias bibliográficas

1. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites Vectors*. diciembre de 2012;5(1):6.
2. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev*. agosto de 1998;73(3):203-66.
3. Sawyer TK, Griffin JL. A Proposed New Family, *Acanthamoebidae* n. fam. (Order *Amoebida*), for Certain Cyst-Forming Filose *Amoebae*. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1975;94(1):93-8.
4. Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet*. 28 de diciembre de 1974;2(7896):1537-40.
5. Li W, Wang Z, Qu J, Zhang Y, Sun X. *Acanthamoeba* keratitis related to contact lens use in a tertiary hospital in China. *BMC Ophthalmology*. 18 de septiembre de 2019;19(1):202.
6. Shoff ME, Joslin CE, Tu EY, Kubatko L, Fuerst PA. Efficacy of contact lens systems against recent clinical and tap water *Acanthamoeba* isolates. *Cornea*. julio de 2008;27(6):713-9.
7. Zanetti S, Fiori PL, Pinna A, Usai S, Carta F, Fadda G. Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to contact lens disinfecting solutions. *Antimicrob Agents Chemother*. julio de 1995;39(7):1596-8.
8. Alizadeh H, Apte S, El-Agha MS, Li L, Hurt M, Howard K, et al. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. agosto de 2001;20(6):622-7.
9. Nunes Diehl ML, Paes J, Rott MB. Genotype distribution of *Acanthamoeba* in keratitis: a systematic review. *Parasitol Res*. septiembre de 2021;120(9):3051-63.
10. Rabinovitch T, Weissman SS, Ostler HB, Sheppard JD, Teikari J. *Acanthamoeba* keratitis: clinical signs and analysis of outcome. *Rev Infect Dis*. abril de 1991;13 Suppl 5:S427.
11. Varacalli G, Di Zazzo A, Mori T, Dohlman TH, Spelta S, Coassin M, et al. Challenges in *Acanthamoeba* Keratitis: A Review. *JCM*. 1 de marzo de 2021;10(5):942.
12. Band RN, Mohrlök S. The Cell Cycle and Induced Amitosis in *Acanthamoeba* *. *The Journal of Protozoology*. noviembre de 1973;20(5):654-7.
13. Page FC. Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with Descriptions of Three Species. *The Journal of Protozoology*. noviembre de 1967;14(4):709-24.

14. Lacerda AG, Lira M. *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. *Ophthalmic Physiol Opt.* enero de 2021;41(1):116-35.
15. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2003;16(2):273-307.
16. Proca-Ciobanu M, Lupascu Gh, Petrovici AI, Ionescu MD. Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: The presence of bacterial endosymbionts. *International Journal for Parasitology.* febrero de 1975;5(1):49-56.
17. Hurt M, Neelam S, Niederkorn J, Alizadeh H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. Secrete a Mannose-Induced Cytolytic Protein That Correlates with the Ability To Cause Disease. *Infect Immun.* noviembre de 2003;71(11):6243-55.
18. Khan NA. Pathogenicity, Morphology, and Differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol.* diciembre de 2001;43(6):391-5.
19. Omaña-Molina M, Navarro-García F, González-Robles A, Serrano-Luna J de J, Campos-Rodríguez R, Martínez-Palomo A, et al. Induction of Morphological and Electrophysiological Changes in Hamster Cornea after In Vitro Interaction with Trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun.* junio de 2004;72(6):3245-51.
20. Alizadeh H, Neelam S, Hurt M, Niederkorn JY. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect Immun.* febrero de 2005;73(2):1061-8.
21. Garate M, Cubillos I, Marchant J, Panjwani N. Biochemical Characterization and Functional Studies of *Acanthamoeba* Mannose-Binding Protein. *Infect Immun.* septiembre de 2005;73(9):5775-81.
22. Garate M, Cao Z, Bateman E, Panjwani N. Cloning and Characterization of a Novel Mannose-binding Protein of *Acanthamoeba*. *Journal of Biological Chemistry.* julio de 2004;279(28):29849-56.
23. Sissons J, Kim KS, Stins M, Jayasekera S, Alsam S, Khan NA. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Infect Immun.* mayo de 2005;73(5):2704-8.
24. Maycock NJR, Jayaswal R. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. 2016;0(0):8.
25. Shing B, Balen M, McKerrow JH, Debnath A. *Acanthamoeba* Keratitis: an update on amebicidal and cysticidal drug screening methodologies and potential treatment with azole drugs. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 19 de mayo de 2021;1-15.
26. Hafeez U, Parakh S, Gan HK, Scott AM. Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules.* enero de 2020;25(20):4764.

27. Goulet DR, Atkins WM. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;109(1):74-103.
28. Sinkule JA, Rosen ST, Radosevich JA. Monoclonal Antibody 44-3A6 Doxorubicin Immunoconjugates: Comparative in vitro Anti-Tumor Efficacy of Different Conjugation Methods. *Tumor Biol*. 1991;12(4):198-206.
29. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*. 2005;46(3):258-68.
30. Juárez MM, Tártara LI, Cid AG, Real JP, Bermúdez JM, Rajal VB, et al. Acanthamoeba in the eye, can the parasite hide even more? Latest developments on the disease. *Contact Lens and Anterior Eye*. junio de 2018;41(3):245-51.
31. Cabello-Vílchez AM. Acanthamoeba spp. un agente oportunista en infecciones humanas. *Revista de investigación de la Universidade Norbert Wiener*. 2015;4(51):11-32.
32. Padzik M, Baltaza W, Conn DB, Szaflik JP, Chomicz L. Effect of povidone iodine, chlorhexidine digluconate and toyocamycin on amphizoic amoebic strains, infectious agents of Acanthamoeba keratitis – a growing threat to human health worldwide. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 20 de diciembre de 2018;25(4):725-31.
33. Pérez-Irezábala J, Martínez I, Isasab P, Jorge B. Queratitis por Acanthamoeba. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2006;24(1):46-52.
34. Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*. 2017;124(11):1678-89.
35. Davila JR, Mian SI. Infectious keratitis after keratoplasty. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2016;27(4):358-66.
36. Ávila-Blanco ME, Martín-Pérez T, Ventura-Juárez J, Pérez-Serrano J. Experimental keratitis in rats caused by Acanthamoeba griffini: A kinetic histopathological study. *Parasite Immunology*. 2019;42(3):1-11.
37. Dart JKG, Saw VPJ, Kilvington S. Acanthamoeba Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. *American Journal of Ophthalmology*. 2009;148(4):487-499.e2.
38. D'Alessandro L., Rossetti S. CJ. Queratoplastia terapéutica en queratitis por Acantoameba. *Oftalmol Clin Exp*. 2009;3(2):46-52.
39. Bowling B. Kanski. *Oftalmología clínica. Un enfoque sistemático*. Octava edi. Vol. 53, Analisis pendapatan dan tingkat kesejahteraan rumah tangga petani. Barcelona: Elsevier; 2016.

40. Somani SN, Ronquillo Y, Moshirfar M. Acanthamoeba Keratitis. StatPearls. 2020;
41. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis. Trends in Parasitology. 2006;22(4):175-80.
42. Ledee DR, Hay J, Byers TJ, Seal D V., Kirkness CM. Acanthamoeba griffini: Molecular characterization of a new corneal pathogen. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1996;37(4):544-50.
43. Anwar A, Khan NA, Siddiqui R. Combating Acanthamoeba spp. cysts: What are the options? Parasites and Vectors. 2018;11(1):1-6.
44. Castrillón JC, Orozco LP. Acanthamoeba spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Revista chilena de infectología. 2013;30(2):147-55.
45. Maycock NJR, Jayaswal R. Update on Acanthamoeba Keratitis: diagnosis, treatment, and outcomes. Cornea. 2016;35(5):713-20.
46. Lim CC, Peng IC, Huang YH. Safety of intrastromal injection of polyhexamethylene biguanide and propamidine isethionate in a rabbit model. Journal of Advanced Research. 2020;22(1):1-6.
47. Park SM, Lee HA, Chu KB, Quan FS, Kim SJ, Moon EK. Production of a polyclonal antibody against inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase of Acanthamoeba castellanii and its access to diagnosis of Acanthamoeba keratitis. PLoS ONE. 2020;15(9 September):1-10.
48. Epstein SP, Nurozler M, Smetana CR, Asbell PA. Efficacy of polyclonal antibodies for treatment of ocular herpes simplex infection. Cornea. 2001;20(5):495-500.
49. Ritchie MH, Oakes JE, Lausch RN. Passive transfer of anti-herpes simplex virus type 2 monoclonal and polyclonal antibodies protect against herpes simplex virus type 1-induced but not herpes simplex virus type 2-induced stromal keratitis. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1993;34(8):2460-8.
50. Lee JE, Oum BS, Choi HY, Yu HS, Lee JS. Cysticidal effect on Acanthamoeba and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. Cornea. 2007;26(6):736-41.
51. Clarke DW, Niederkorn JY. The immunobiology of Acanthamoeba keratitis. Microbes and Infection. 2006;8(5):1400-5.
52. Polat ZA, Obwaller A, Vural A, Walochnik J. Efficacy of miltefosine for topical treatment of Acanthamoeba keratitis in Syrian hamsters. Parasitol Res. febrero de 2012;110(2):515-20.
53. Cooper E, Cowmeadow W, Elsheikha HM. Should Veterinary Practitioners Be Concerned about Acanthamoeba Keratitis? Parasitologia. 2021;1(1):12-9.

54. Feng X, Zheng W, Wang Y, Zhao D, Jiang X, Lv S. A Rabbit Model of Acanthamoeba Keratitis That Better Reflects the Natural Human Infection. *Anatomical Record*. 2015;298(8):1509-17.
55. Halenda RM, Grevan VL, Hook RR, Riley LK. An immortalized hamster corneal epithelial cell line for studies of the pathogenesis of Acanthamoeba keratitis. *Current Eye Research*. 1998;17(3):225-30.
56. Polat ZA, Obwaller A, Vural A, Walochnik J. Efficacy of miltefosine for topical treatment of Acanthamoeba keratitis in Syrian hamsters. *Parasitology Research*. 2012;110(2):515-20.
57. Welsch U, Sobotta J. *Histología*. 3ra ed. Alemania: Editorial panamericana; 2014.
58. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J. Regeneración de la superficie ocular: Stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2008;31(1):53-69.
59. Gemma JM. Estudio de los cambios morfológicos del epitelio corneal en un modelo animal de ojo seco. Universidad de Barcelona;
60. Brusco HA, Costa JLL, Loidl CF. *Histología médico-práctica*. Vol. 1, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. 2014. 467 p.
61. Audesirk T, Audesirk G, Byers B. *Biología. La vida en la tierra con fisiología*. Décima edi. México: Pearson Educación de México; 2017.
62. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 9.^a ed. Madrid, España: Elsevier; 2018. 1-564 p.
63. De A, Torre L, Ximena Núñez M. *Inmunología ocular: síndromes de ojo seco*. Vol. 33, Colomb Med. 2002.
64. Keino H, Horie S, Sugita S. Immune privilege and eye-derived T-regulatory cells. *Journal of Immunology Research*. 2018;2018.
65. Pflugfelder SC, Stern ME, Beutler BA, Burns AR, Calonge M, Chodosh J, et al. Immunoregulation on the ocular surface: 2nd cullen symposium. *Ocular Surface*. 2009;7(2):67-77.
66. Messmer EM. Sterile Keratitis. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2019;236(10):1235-50.
67. Ojeda CC, Quiroz FG, Cruz JM de la, Jaramillo R, Meza MG. Determinación de la prevalencia de conjuntivitis alérgica infantil en ocho escuelas primarias del Cono Sur de Lima, Perú. 2014;27(3):163-7.

68. Jinich H, Lifshitz A, García Mangas JA. Síntomas y signos cardinales de las enfermedades. 7ma ed. México: Manual Moderno; 2017.
69. Carbajal Ramirez A. Diagnóstico, Tratamiento y Pronóstico de la Neuritis Óptica. Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica. 2009;172(09):7-17.
70. Dart JKG, Saw VPJ, Kilvington S. Acanthamoeba Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. American Journal of Ophthalmology. 2009;148(4):487-499.e2.
71. Benitez, M del Carmen; Nuñez F. Parra Z MJ, Alexeide de la C. CP. Parasitosis ocular por Acanthamoeba. Revista Cubana de Oftalmología. 2019;32(2):1-14.
72. Heredero Bermejo I. Caracterización de nuevos aislados de Acanthamoeba y evaluación de la actividad amebicida de nanopartículas dendríticas. 2015.
73. Roozbahani M, Hammersmith KM, Rapuano CJ, Nagra PK, Zhang Q, Siu SY. Acanthamoeba keratitis: Are recent cases more severe? Cornea. 2018;37(11):1381-7.
74. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on Acanthamoeba keratitis: Diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite. 2015;22(10):1-20.
75. Juárez MM, Tártara LI, Cid AG, Real JP, Bermúdez JM, Rajal VB, et al. Acanthamoeba in the eye, can the parasite hide even more? Latest developments on the disease. Contact Lens and Anterior Eye. 2018;41(3):245-51.
76. Heredero-Bermejo I, Criado-Fornelio A, De Fuentes I, Soliveri J, Copa-Patinõ JL, Pérez-Serrano J. Characterization of a human-pathogenic Acanthamoeba griffini isolated from a contact lens-wearing keratitis patient in Spain. Parasitology. 2015;142(2):363-73.
77. Kanavi MR, Javadi M, Yazdani S, Mirdehghanm S. Sensitivity and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis. Cornea. 2007;26(7):782-6.
78. Nagyová V, Nagy A, Janeček Š, Timko J. Morphological, physiological, molecular and phylogenetic characterization of new environmental isolates of Acanthamoeba spp. from the region of Bratislava, Slovakia. Biologia. 2010;65(1):81-91.
79. Solgi R, Niyiyati M, Haghghi A, Taghipour N, Tabaei SJS, Eftekhar M, et al. Thermotolerant Acanthamoeba spp. Isolated from therapeutic hot springs in northwestern Iran. Journal of Water and Health. 2012;10(4):650-6.
80. Martín-Pérez T, Lozano-Cruz T, Criado-Fornelio A, Ortega P, Gómez R, de la Mata FJ, et al. Synthesis and in vitro activity of new biguanide-containing dendrimers on pathogenic isolates of Acanthamoeba polyphaga and Acanthamoeba griffini. Parasitology Research. 2019;118(6):1953-61.

81. Shoff M, Rogerson A, Schatz S, Seal D. Variable responses of Acanthamoeba strains to three multipurpose lens cleaning solutions. *Optometry and Vision Science*. marzo de 2007;84(3):202-7.
82. Cooper JA, Blum JD, Pollard TD. Acanthamoeba castellanii capping protein: Properties, mechanism of action, immunologic cross-reactivity, and localization. *Journal of Cell Biology*. 1984;99(1 I):217-25.
83. Huth S, Reverey JF, Leippe M, Selhuber-unkel C. Adhesion forces and mechanics in mannose- mediated acanthamoeba interactions. *PLOS ONE*. 2017;12(5):1-14.
84. Pan H, Wu X. Hypoxia attenuates inflammatory mediators production induced by Acanthamoeba via Toll-like receptor 4 signaling in human corneal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;420(3):685-91.
85. Mathers W, Stevens G, Rodrigues M, Chan CC, Gold J, Visvesvara GS, et al. Immunopathology and electron microscopy of Acanthamoeba keratitis. *American Journal of Ophthalmology*. 1 de mayo de 1987;103(5 III):626-35.
86. Moore K, Gray D. Uso del agente antimicrobiano PHMB para prevenir la infección de heridas. *Gerokomos*. 2008;19(3):145-52.
87. Wang Y, Bryant SH, Cheng T, Wang J, Gindulyte A, Shoemaker BA, et al. PubChem BioAssay: 2017 update. *Nucleic Acids Research*. 1 de enero de 2017;45(D1):D955-63.
88. Electronic Medicines Compendium. Brolene Eye Drops. *Electronic Medicines Compendium*. 2020.
89. Shing B, Balen M, McKerrow JH, Debnath A. Acanthamoeba Keratitis: an update on amebicidal and cysticidal drug screening methodologies and potential treatment with azole drugs. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2021;19(11):1427-41.
90. Méndez Fernández MaR. Protocolo de tratamiento en la queratitis por Amebas. *Boletín de la Soc Oftalmo de Madrid*. 2015;55.
91. Leher HF, Alizadeh H, Taylor WM, Shea AS, Silvany RS, Van Klink F, et al. Role of mucosal IgA in the resistance to Acanthamoeba keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1998;39(13):2666-73.
92. Bargh JD, Isidro-Llobet A, Parker JS, Spring DR. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chemical Society Reviews*. 2019;48(16):4361-74.
93. Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein and Cell*. 2018;9(1):33-46.

94. Real Academia Española. Masa [Internet]. [citado 22 de abril de 2020]. Disponible en: <https://dle.rae.es/masa>
95. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*. 2012;5(1):6.
96. McDonald AG, Boyce S, Moss GP, Dixon HBF, Tipton KF. ExplorEnz: A MySQL database of the IUBMB enzyme nomenclature. *BMC Biochemistry*. 2007;8.
97. Real Academia Española. Dosis [Internet]. [citado 22 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://dle.rae.es/dosis>
98. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. Vol. 9, *Nature Methods*. NIH Public Access; 2012. p. 676-82.
99. Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Owlia P, Hassan ZM, Faghihzadeh S. Roles of IL-10 in ocular inflammations: A review. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2012;20(6):406-18.
100. Wilson SE, Esposito A. Focus on Molecules: Interleukin-1: A master regulator of the corneal response to injury. *Experimental Eye Research*. 2009;89(2):124-5.
101. Jonathan Posner and Bradley S. Peterson JAR. Apoptosis in the Initiation, Modulation and Termination of the Corneal Wound Healing Response. *Bone*. 2008;23(1):1-7.
102. Michaeli-Cohen A, Neufeld M, Lazar M, Geyer O, Haddad R, Kashtan H. Bilateral corneal contusion and angle recession caused by an airbag. Vol. 80, *The British journal of ophthalmology*. BMJ Publishing Group; 1996. p. 487.
103. Khan AO. *Acanthamoeba Keratitis*. Vol. 114, *Ophthalmology*. StatPearls Publishing; 2007. p. 395.
104. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba keratitis*: Diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22.
105. Mattana A, Sanna M, Cano A, Delogu G, Erre G, Roberts CW, et al. *Acanthamoeba castellanii* Genotype T4 Stimulates the Production of Interleukin-10 as Well as Proinflammatory Cytokines in THP-1 Cells ., 2016;84(10):2953-62.
106. Fernández-Ferreiro A, Santiago-Varela M, Gil-Martínez M, González-Barcia M, Luaces-Rodríguez A, Díaz-Tome V, et al. *In Vitro* Evaluation of the Ophthalmic Toxicity Profile of Chlorhexidine and Propamidine Isethionate Eye Drops. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. abril de 2017;33(3):202-9.
107. Shi L, Muthukumar V, Stachon T, Latta L, Elhawry MI, Gunaratnam G, et al. The Effect of Anti-Amoebic Agents and Ce6-PDT on *Acanthamoeba castellanii*

Trophozoites and Cysts, In Vitro. Trans Vis Sci Tech. 23 de noviembre de 2020;9(12):29.

108. Magistrado-Coxen P, Aqeel Y, Lopez A, Haserick JR, Urbanowicz BR, Costello CE, et al. The most abundant cyst wall proteins of *Acanthamoeba castellanii* are lectins that bind cellulose and localize to distinct structures in developing and mature cyst walls. Sinnis P, editor. PLoS Negl Trop Dis. 16 de mayo de 2019;13(5):e0007352.
109. Goulet DR, Atkins WM. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. Journal of Pharmaceutical Sciences. enero de 2020;109(1):74-103.
110. Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. Can J Microbiol. 1 de febrero de 2002;48(2):123-31.



Anexos

Anexo A

Preparación medio CERVA

1. Para 500 ml de medio, disolver 10g de bactocasitona en 430ml de agua destilada.
2. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y HCl de concentraciones de 1N
3. Colocar el recipiente con la solución en la autoclave por 20 min a 121°C y dejar enfriar.
4. Descomplementar el suero fetal bovino, colocando el suero en un baño de agua 56°C durante 30 min.
5. Agregar 50 ml de suero fetal bovino descomplementado y 5ml de penicilina/estreptomicina (solución de 10,000 unidades de penicilina y 10mg de estreptomicina por ml). Ambas se deben de agregar en condiciones estériles.

Anexo B

Obtención de antígeno amebiano

1. Realizar el cambio de medio a la ameba 2 días antes de realizar el antígeno amebiano.
2. Después de 48h de incubación, enfriar las cajas en un baño de hielo por 15 min, dando pequeños golpes para despegar la ameba de las paredes del frasco.
3. Tomar 4mL de medio con amebas y centrifugar a 1500rpm, por 15 min a 4°C.
4. Realizar 3 lavados, resuspendiendo con solución fisiológica estéril.
5. En el último lavado, resuspender la pastilla en 1ml de solución fisiológica estéril y realizar el conteo celular por medio de la cámara de Neubauer.
6. Agregar 1mL de RIPA por cada millón de trofozoítos y 100µL de inhibidor de proteasas por cada mL de RIPA y mezclar con cuidado.
7. Realizar 5 ciclos de congelamiento (con nitrógeno líquido) intercalados con ciclos de calentamiento en un baño maría a 37°C.
8. Centrifugar a 10000 x g por 30 min a 4°C.
9. Recolectar el sobrenadante y colocarlo en alícuotas.
10. Congelar a -70°C

Anexo C

Técnica de inmunofluorescencia en córnea

1. Fijación del tejido con paraformaldehído (PFA) 4% durante 12 horas.
2. Inclusión del tejido en parafina.
3. Secciones de 5 μm de grosor.
4. Desparafinización del tejido:
 - a. Colorar por 7 minutos el tejido en Xileno (2 veces).
 - b. Colorar por 7 minutos el tejido en Etanol 100% (2 veces).
 - c. Colorar por 15 minutos el tejido en Etanol 96%.
 - d. Colorar por 5 minutos el tejido en Etanol 70%.
 - e. Enjuagar el tejido con agua corriente durante 5min.
5. Lavar en PBS (3 veces por 5 min).
6. Marcar con pequeños círculos alrededor del tejido con pen PAP.
7. Permeabilización de la membrana
 - a. Lavar con PBS-Tritón X-100 0.2% (1 vez/30min).
8. Bloqueo de uniones inespecíficas
 - a. Incubar las laminillas durante 1 hora a temperatura ambiente con Suero Fetal Bovino 20% en PBS-Tritón X-100 0.2%.
9. Primer anticuerpo.
 - a. Incubar el primer anticuerpo durante 1.5 horas a temperatura ambiente y 30 minutos a temperatura de 37°C. El anticuerpo se diluye en PBS-Tritón X-100 0.2%- BSA 3%. En el caso del anticuerpo de IL-10, IL-1 β , se utilizó una concentración de 1:500 y caspasas 3, una dilución 1:1000 (todos los anticuerpos fueron obtenidos de conejo).
10. Lavar con PBS-Tritón X-100 0.2%.
11. Segundo anticuerpo.
 - a. Incubar con el segundo anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente y 20 minutos a 37°C. El anticuerpo deberá de ser diluido en PBS + 0.5% Suero Fetal Bovino. En este experimento se utilizó Alexa Flúor 488nm Cabra anti-conejo a una dilución 1:1000.
12. Lavar con PBS (3 veces/5 minutos).

13. Incubar por 10 minutos con Hoechst 1x en PBS.
14. Realizar 3 lavados con PBS por 5 minutos.
15. Cubrir con Glicergel, evitando la formación de burbujas.
16. Obtención de imágenes digitales con ayuda de un microscopio UV profesional con cámara integrada.

Técnica de inmunofluorescencia para cultivo celular

1. Realizar el cambio de medio a la ameba 2 días antes de realizar el antígeno amebiano.
2. Después de 48h de incubación, enfriar las cajas en un baño de hielo por 15 min, dando pequeños golpes para despegar la ameba de las paredes del frasco.
3. Tomar 4mL de medio con amebas y centrifugar a 1500rpm, por 15 min a 4°C.
4. Realizar 3 lavados, resuspendiendo con solución fisiológica estéril.
5. En el último lavado, resuspender la pastilla en 1ml de solución fisiológica estéril y realizar el conteo celular por medio de la cámara de Neubauer.
6. Colocar en una placa de ELISA de 24 pocillos un cubreobjetos circular.
7. Colocar 50,000 amebas por pocillo y dejar incubar por 30 min. a temperatura ambiente.
8. Colocar 200 μ L de paraformaldehído 0.25% por 30 min a temperatura ambiente.
9. Permeabilización de la membrana
 - a. Lavar con PBS-Tritón X-100 0.2% (1 vez/30min).
10. Bloqueo de uniones inespecíficas
 - a. Incubar las laminillas durante 1 hora a temperatura ambiente con Suero Fetal Bovino 20% en PBS-Tritón X-100 0.2%.
11. Primer anticuerpo.
 - a. Incubar el primer anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente y 15 minutos a temperatura de 37°C. El anticuerpo se diluye en PBS 0.2%-

BSA 3%. En el caso del anticuerpo vs *Acanthamoeba griffini* se utilizó el control con PBS, suero del conejo sin diluir y diluciones 1:10, 1:100, 1:200 y 1:500 (todos los anticuerpos se obtuvieron de conejo Nueva Zelanda).

12. Lavar con PBS.

13. Segundo anticuerpo.

- a. Incubar con el segundo anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente y 20 minutos a 37°C. El anticuerpo deberá de diluirse en PBS + 0.5% Suero Fetal Bovino. En este experimento se utilizó Alexa Flúor 488nm Cabra anti-conejo a una dilución 1:1000.

14. Lavar con PBS (3 veces/5 minutos).

15. Incubar por 10 minutos con Hoechst 1x en PBS.

16. Realizar 3 lavados con PBS por 5 minutos.

17. Cubrir con Glicergel, evitando la formación de burbujas.

18. Obtención de imágenes digitales con ayuda de un microscopio UV profesional con cámara integrada.

Técnica tinción Hematoxilina y Eosina

- 1) Fijación del tejido con paraformaldehído (PFA) 4% durante 24 horas.
- 2) Inclusión del tejido en parafina
- 3) Realizar el corte del tejido en secciones de 5 μm y fijarlo en un portaobjeto con recubierta silanizada.
- 4) Desparafinar durante 24 horas en un horno a 20°C.
- 5) Incubar el tejido en Xileno durante 5 minutos; realizar este paso dos veces.
- 6) Incubar en alcohol etílico al 100% por 2 min; realizar este paso 2 veces.
- 7) Incubar en una solución de alcohol etílico al 96% por 2 min; realizar este paso 2 veces.
- 8) Incubar en agua destilada por 3 minutos.
- 9) Incubar en hematoxilina por 1 minuto.
- 10) Incubar en agua corriente por 5 minutos, provocando un flujo de agua en una esquina dentro de la cuba.

- 11) Incubar en una solución de alcohol ácido (solución de alcohol etílico y ácido clorhídrico al 1%) durante unos segundos hasta conseguir el viraje deseado.
- 12) Incubar en agua destilada con 10 minutos.
- 13) Incubar en eosina por 1 minuto.
- 14) Incubar en agua destilada por 1 minuto.
- 15) Incubar en una solución de alcohol etílico al 96% por 2 min; realizar este paso 2 veces.
- 16) Incubar en alcohol etílico al 100% por 2 min; realizar este paso 2 veces.
- 17) Incubar en Xileno durante 5 minutos; realizar este paso dos veces.
- 18) Cubrir con Entellan y dejar secar por 24 horas.
- 19) Obtención de imágenes digitales con ayuda de un microscopio profesional con cámara integrada.

Anexo D

Recursos humanos, materiales y financieros


Recursos humanos	Recursos materiales	Reactivos	Recursos financieros
Tutor	Centrifuga	Formaldehído*	\$1,275.00
Asesor	Campana flujo laminar	Anticuerpos: Caspasa 3*	\$4,540.00
		IL-1 β *	\$8,584.00
		IL-10*	\$16,709.00
		INF- γ *	\$5,855.00
		Alexa Fluor 488	\$2,394.00
Alumno maestría	Estereoscopio	Brolene®	\$1,374.99
	Microscopio óptico	Bacto® casitona**	\$2,599.30
	Microscopio UV	Suero fetal bovino*	\$14,717.00

Recursos necesarios para el presente proyecto.

Nota: * Marca Sigma-Aldrich, ** Marca Fisher-scientific

Anexo E

Carta de aprobación del comité de ética



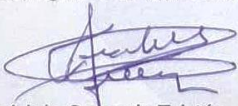
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CEADI-UAA/002/03/2021


Ing. Sandra Lizbeth Aguilera Martínez
Estudiante de la Maestría en Investigación Biomédica
Presente

Por este medio me permito informar que su proyecto titulado *“Efectividad del tratamiento combinado de isetionato de propamidina y anticuerpos policlonales para queratitis por Acanthamoeba griffini en hámsteres dorados (Mesocricetus auratus)”* de la Maestría en Investigación Biomédica, adscrita al Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, cuyo tutor es el Dr. Luis Fernando Barba Gallardo, una vez que fue revisado y analizado el protocolo propuesto por el Comité de Ética para el uso de Animales en la Docencia e Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA) se tiene a bien dar la autorización para el uso de hámsteres dorados machos en este diseño experimental ya que reúne las condiciones establecidas en el Reglamento del CEADI-UAA y que son compatibles con la NORMA Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

ATENTAMENTE
“SE LUMEN PROFERRE”
Aguascalientes, Ags., 05 de marzo del 2021



Dr. Teódulo Quezada Tristán
Presidente del CEADI-UAA



c.c.p. M.C.O. Elizabeth Casillas Casillas. Dir. Gral. de Investigación y Posgrados de la UAA
c.c.p. M. en I.T.C. Arturo Femat Díaz. Jefe del Depto. de Apoyo a la Investigación
c.c.p. M. en C.E. María Guadalupe Valdés Reyes. Jefa del Depto. de Apoyo al Posgrado
c.c.p. Expediente