



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO DEPARTAMENTO DE  
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Estudio de la interacción entre *Escherichia coli* y *Acanthamoeba castellanii*: modulación de los factores de virulencia amibianos”**

Tesis

que presenta

I.B.T Yanerit Gabriela Rosales Morgan

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Directora de tesis

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

Ciudad de México

Octubre, 2019

**El presente estudio se realizó en el laboratorio 4 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular y en el laboratorio 17 del Departamento de Biología Celular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas. Así mismo, estuvo bajo la asesoría del Dr. Fernando Navarro García, el Dr. Mario Alberto Rodríguez y de la Dra. Bibiana Chávez Mungía. Durante el desarrollo de este estudio el autor fue receptor de la beca del CONACYT con número 633009**

## AGRADECIMIENTOS

Se le agradece al CONACYT por el apoyo que me brindó al otorgarme la beca que me permitió dedicarme de tiempo completo al posgrado.

Se le agradece a mi directora de Tesis, la Dra. Mineko Shibayama por aceptarme en su laboratorio y proveer apoyo y consejos durante la elaboración de mi trabajo experimental y la escritura de tesis.

Se le agradece a mi asesor el Dr. Fernando Navarro por permitirme trabajar en su laboratorio y por sus atinados consejos para continuar con el presente estudio.

Se le agradece a mi asesora la Dra. Bibiana Chávez por su ayuda en el procesamiento y visualización de las muestras de barrido que serán parte de una publicación generada a partir del presente estudio.

Se le agradece a mi asesor el Dr. Mario Rodríguez por su ayuda y consejos durante el trabajo experimental y de tesis.

Se le agradece a la M en C Dora Angélica Silva Olivares por su ayuda en el manejo de los cultivos amibianos y en el procesamiento de las muestras para la microscopía electrónica de transmisión.

Se le agradece a la M en C Jazmin Huerta Cantillo por su apoyo técnico para la realización de la tesis.

Se le agradece a Carlos Vázquez por su apoyo con las microscopías confocales.

Se le agradece a María Lourdes Rojas Morales por su ayuda en la observación de las muestras al microscopio electrónico.

Se le agradece al IBT. Gustavo Sánchez por su ayuda con el proceso de extracción de córneas de hámster

Se le agradece al M en C Fernando Flores por sus ayuda y acertados consejos de la metodología experimental.

Agradezco a mis padres, Juan Carlos Rosales Guzmán y Yanerit Cristina Morgan Sotomayor, y a mi hermana, Berenice Rosales Morgan, por su apoyo incondicional durante el posgrado y toda la vida.

Agradezco a mi esposo, Francisco Javier Medina Bravo, por su amor, apoyo y paciencia durante este proceso.

Agradezco a mis compañeros de generación, Axel Soto Muñoz, Esly Euceda Padilla, Alejandro Escobar Almazán, Carlos Daniel Cordero y Juan Ortiz, por su amistad y apoyo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por su apoyo, amistad y consejos  
Paula Guzmán, Nadia Flores y Juan Unzueta.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1. 1 GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>ACANTHAMOEBA</i> .....	10
1.1.1 Ciclo de vida.....	12
1.1.2 Distribución.....	14
1.1.3 Queratitis Amibiana.....	15
1.1.4 Mecanismos de patogenicidad .....	17
1.1.5 Tratamiento .....	19
1.1.6 Proceso de fagocitosis .....	20
1.1.7 Transporte de bacterias por parte de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	20
1.1.8 Relaciones entre <i>Acanthamoeba</i> spp. y bacterias .....	22
1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	24
1.2.1 Generalidades .....	24
1.2.2 <i>E. coli</i> como bacteria comensal .....	26
1.2.3 <i>E. coli</i> HS.....	26
1.2.4 Como bacterias patógenas .....	28
1.2.5 EHEC.....	28
1.2.6 Mecanismos de patogenicidad .....	29
2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	32
3. JUSTIFICACIÓN .....	35
4. HIPÓTESIS.....	36
5. OBJETIVO GENERAL .....	36
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
7. 1 Cultivo de <i>A. castellanii</i> .....	37
7. 2 Cultivo de cepas de <i>E. coli</i> .....	37
7. 4 Transformación de bacterias .....	37
7. 5 Establecimiento del co-cultivo entre <i>E. coli</i> y <i>A. castellanii</i> .....	38

7. 6 Cuantificación de bacterias internalizadas .....	38
7. 7 Observación de bacterias internalizadas.....	38
7. 8 Determinación de la viabilidad amibiana .....	38
7. 9 Cuantificación de amibas adheridas .....	39
7. 10 Ensayo de faloidina rodaminada.....	39
7.11 Ensayos de sobrevivencia de <i>E. coli</i> internalizada en <i>A. castellanii</i> .....	39
7.12 Evaluación de los cambios ultraestructurales de la amiba .....	39
7.13 Productos de secreción de <i>A. castellanii</i> .....	40
7.14 Extractos totales de <i>A. castellanii</i> .....	40
7.15 Inhibidores de proteasas .....	41
7.16 Perfiles proteicos .....	41
7.17 Perfiles proteolíticos .....	41
7.18 Ensayo de Azocoll .....	42
7.19 Western blot.....	42
7.20 Evaluación de la virulencia amibiana en córneas de hámster .....	43
8. RESULTADOS .....	44
9.0 DISCUSIÓN .....	65
10. CONCLUSIONES .....	70
11. PERSPECTIVAS .....	74

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> CICLO DE VIDA DE <i>ACATHAMOEBA</i> SPP. ....	13
<b>FIGURA 2.</b> EJEMPLOS DE QUISTES EN CADA GRUPO MORFOLÓGICO DE <i>ACATHAMOEBA</i> SPP. ....	15
<b>FIGURA 3.</b> MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE <i>ACANTHAMOEBA</i> SPP. ....	18
<b>FIGURA 4.</b> ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE <i>E. COLI</i> K-12 .....	25
<b>FIGURA 5</b> MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE EHEC. ....	31
<b>FIGURA 6.</b> BACTERIAS INTERNALIZADAS A PARTIR DE LOS CO-CULTIVOS DE <i>A. CASTELLANII</i> CON <i>E. COLI</i> . ....	51
<b>FIGURA 7.</b> INTERNALIZACIÓN DE <i>E. COLI</i> EN <i>A. CASTELLANII</i> . ....	52
<b>FIGURA 8.</b> VIABILIDAD DE <i>A. CASTELLANII</i> ADHERIDAS EN CO-CULTIVO CON <i>E. COLI</i> . ....	53
<b>FIGURA 9.</b> VIABILIDAD DE <i>A. CASTELLANII</i> DESPEGADAS EN CO-CULTIVO CON <i>E. COLI</i> . ....	54
<b>FIGURA 10.</b> ENSAYOS CONFOCALES DE FALOIDINA RODAMINADA. ....	55
<b>FIGURA 11.</b> SOBREVIVENCIA DE CEPAS DE <i>E. COLI</i> DENTRO DE <i>A. CASTELLANII</i> . ....	56
<b>FIGURA 12.</b> MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE <i>A. CASTELLANII</i> INTERACCIONADA CON EHEC POR 1.5 H. ....	56
<b>FIGURA 13.</b> MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE <i>A. CASTELLANII</i> INTERACCIONADA CON EHEC POR 3 H. ....	57
<b>FIGURA 14.</b> MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE <i>A. CASTELLANII</i> INTERACCIONADA CON <i>E. COLI</i> HS POR 1.5 H. ....	57
<b>FIGURA 15.</b> MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE <i>A. CASTELLANII</i> INTERACCIONADA CON <i>E. COLI</i> HS POR 3 H. ....	58
<b>FIGURA 16.</b> PERFIL PROTEICO. ....	59
<b>FIGURA 17.</b> PERFILES PROTEOLÍTICOS DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE <i>A. CASTELLANII</i> . ....	60
<b>FIGURA 18.</b> ENSAYOS DE AZOCOLL DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE <i>A. CASTELLANII</i> . ....	60
<b>FIGURA 19.</b> PERFILES PROTEOLÍTICOS DE LOS PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE <i>A. CASTELLANII</i> . .....	61
<b>FIGURA 20.</b> ENSAYOS DE AZOCOLL DE LOS PRODUCTOS DE SECRECIÓN DE <i>A. CASTELLANII</i> . ...	61
<b>FIGURA 21.</b> WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE TIR. ....	62
<b>FIGURA 22.</b> TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA DE CÓRNEAS DE HÁMSTERES INTERACCIONADAS CON <i>A. CASTELLANII</i> . ....	64

## Resumen

Las especies del género *Acanthamoeba* son amibas de vida libre causantes de enfermedades como la queratitis amibiana (QA) y encefalitis amibiana granulomatosa (EAG). Se pueden encontrar en distintos nichos como cuerpos de agua dulce, mar, suelos, equipos de lavado dental y estuches de lentes de contacto. En la naturaleza, estas amibas interactúan con diversos microorganismos controlando su población, incluyendo *Escherichia coli*. Sin embargo, el impacto que tienen las bacterias sobre la virulencia de *Acanthamoeba castellanii* no se conoce completamente. En el presente trabajo se establecieron co-cultivos de *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) ó *E. coli* HS (no-patógena) y *A. castellanii* con el fin de analizar los cambios en la virulencia amibiana. Los resultados obtenidos indicaron que las bacterias se internalizaron en las amibas a partir de las 3 h de co-interacción con una MOI de 100. Durante la internalización bacteriana se pudo observar tanto por microscopía confocal como por ensayos de exclusión con gentamicina.

Bajo estas condiciones, se apreciaron cambios en los perfiles proteicos y en la actividad proteolítica de *A. castellanii* detectados mediante las técnicas de SDS-PAGE y zimografía, respectivamente. Además, se presentaron cambios notables en la ultraestructura de las amibas que incluyeron la aparición de mitocondrias rodeadas por retículo endoplásmico rugoso y zonas de interacción electrón densas. De igual manera, la interacción entre *A. castellanii* y ambas bacterias generó en las primeras la pérdida de la adherencia a los pozos en lo que fueron sembrados y la reorganización del citoesqueleto de actina. Por último, el efecto citopático de la amiba interaccionada con la bacteria se evaluó usando un modelo de córnea de hámster (*Mesocricetus auratus*). Los estudios histopatológicos sugirieron un aumento en la virulencia de *A. castellanii* como resultado de la interacción previa con EHEC, que puede repercutir en la severidad de la QA. Con base en los resultados obtenidos se concluyó que las interacciones de EHEC y *E. coli* HS resultaron en cambios tanto en la biología como en la virulencia de *A. castellanii*. Este presente trabajo representa el primer estudio en dónde se exploran las alteraciones producidas en *A. castellanii* a causa del co-cultivo con EHEC y *E. coli* HS.

## Abstract

*Acanthamoeba* spp. is a free-living amoeba that is widely distributed throughout the environment and can be found in several ecological niches such as salt and fresh water, soil, swimming pools, contact lens solutions, dialysis machines and dental treatment units. This microorganism is the causative agent of a sight threatening infection known as amoebic keratitis (AK) and granulomatous amoebic encephalitis (GAE), a fatal disease of the central nervous system that mainly affects immunocompromised individuals. In nature, *Acanthamoeba* spp. is known to interact with a plethora of microorganisms regulating several bacterial and fungi populations by phagocytosis. Little is known regarding the changes undergone by *Acanthamoeba* spp. once it has interacted with different microorganisms. In the present work, a co-culture between pathogenic *Escherichia coli*, EHEC or *E. coli* HS and *A. castellanii* was established. Results show that bacteria were internalized after 3 h of interaction and several changes to the amoeba were observed. Co-cultivated *A. castellanii* presented a decrease in adhesion to culture wells but preserved their viability. Rearrangement of actin from the amoeba's cytoskeleton was also observed. Additionally, ultrastructure studies revealed the presence of mitochondria surrounded by endoplasmic reticulum and electron dense areas in amoebas that were interacted with EHEC. Protein profiles and protease activity were also altered compared to amoebas that were not previously exposed to bacteria. To assess changes in the histopathology effect a hamster model (*Mesocricetus auratus*) was used. A drastic increase in tissue damage on hamster corneas was seen when *A. castellanii* was previously exposed to EHEC. This data suggests an increase of virulence in *A. castellanii* that has been co-cultivated with the pathogenic bacteria. Overall, it can be concluded that co-culturing *A. castellanii* with either *E. coli* HS or EHEC leads to marked changes in the amoeba's biology and virulence. The effects could have an impact in the severity of AK produced by these microorganisms. To our knowledge, this is the first study in which changes in *A. castellanii* pathogenicity after interaction with EHEC was described.

## 1. Introducción

### 1.1 Generalidades del género *Acanthamoeba*

*Acanthamoeba* se encuentra en el reino de los protistas y, en el grupo de los Amoebozoa, dentro del cual también se encuentran los géneros *Entamoeba*, *Hartmannella*, y *Balamuthia* (Khan, 2006). Varios de los integrantes de este grupo, incluyendo *Acanthamoeba* spp., han sido reportados como patógenos para el humano (Trabelsi et al., 2012). La primera cepa de *Acanthamoeba* se descubrió en un cultivo de *Cryptococcus pararoseus* en 1930 (Castellani, 1930). En el género *Acanthamoeba* se describen microorganismos que presentan características distintivas, como la presencia de proyecciones en forma de espina conocidas como acantópodos y la morfología de su quiste, la cual es característica de este género por lo que se separan de los demás protozoarios (Köhler et al., 2016).

En la década de los 1970s se registraron los primeros casos de queratitis amibiana (QA) producida por *Acanthamoeba* spp. y poco después, en 1984 se estableció una correlación entre la infección y el uso de lentes de contacto (Naginton et al., 1974). En 1987 se describió por primera vez otra enfermedad causada por esta amiba conocida como encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) la cual se presentó en un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Wiley et al., 1987). La EAG sólo ocurre en pacientes inmunocomprometidos mientras que la QA afecta principalmente a usuarios de lentes de contacto; por lo cual las especies del género *Acanthamoeba* se consideran oportunistas ya que las infecciones normalmente no ocurren en personas sanas (Tabla 1). Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 300 casos de EAG en todo el mundo (Köhler et al., 2016) y de 1-5 casos de QA por millón de usuarios de lentes de contacto al año (Carnt & Stapleton, 2016); Estas enfermedades han sido previamente estudiadas y los mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba* spp. son conocidos; sin embargo, los factores que contribuyen a la virulencia de la amiba permanecen parcialmente descritos.

**Tabla 1: Ejemplos de infecciones por *Acanthamoeba* spp. en pacientes inmunocomprometidos**

Condición previa del paciente	Tipo de infección	Resultado
SIDA	Sinusitis	Muerte por septicemia
SIDA	Infección cutánea y EAG	Muerte por EAG
SIDA	EAG	Muerte por EAG
SIDA	Otitis y EAG	Muerte por EAG
SIDA	EAG	Muerte por EAG
SIDA	EAG	Muerte por EAG
SIDA	Sinusitis/Infección cutánea	Muerte por EAG
SIDA	Infección cutánea y EAG	Muerte por EAG
SIDA	Sinusitis/Infección cutánea y EAG	Muerte por EAG
SIDA	Lesiones cutáneas	Recuperación de la infección
SIDA	Lesiones cutáneas	Muerte por EAG
Trasplante renal	Lesiones cutáneas	Recuperación de la infección
SIDA	Sinusitis/Infección cutánea	Muerte
Trasplante de pulmón	Infección cutánea	Recuperación de la infección
VIH positivo	Sinusitis	Recuperación de la infección

(Modificada de Marciano-Cabral & Cabral, 2003)

### 1.1.1 Ciclo de vida

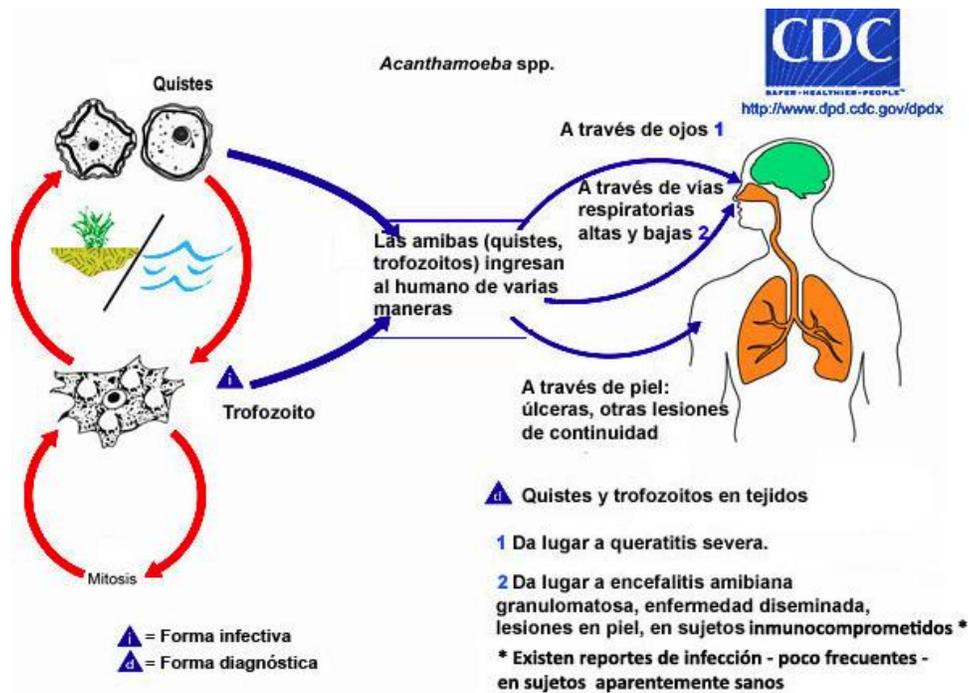
*Acanthamoeba* sp. se puede encontrar en dos estadios distintos: trofozoíto y quiste (Figura 1). El estadio de trofozoíto es el metabólicamente activo y lleva a cabo procesos de fagocitosis, motilidad y división celular. Por otro lado, el quiste es la fase metabólicamente inactiva que se forma cuando hay una ausencia de nutrientes o condiciones adversas para el microorganismo. El quiste es resistente a los antibióticos generando una gran dificultad para tratar las infecciones causadas por la amiba ya que *Acanthamoeba* spp. puede enquistarse dentro del hospedero (Bowers & Korn, 1968; Bowers & Korn, 1969; Khan, 2006). En estudios recientes se ha reportado la sensibilidad del quiste de *A. castellanii* y dos aislados clínicos a diferentes agentes antimicrobianos con el fin de poder generar terapias más efectivas para tratar la QA. Entre los compuestos probados, el Voriniconazol mostró una buena actividad amoebicida y evita la formación del quiste (Martín-Navarro *et al.*, 2013).

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. miden aproximadamente 12-35  $\mu\text{m}$  y contienen diferentes estructuras como lobopodios, acanthopodios y lamelas celulares. Los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. contienen organelos típicos de eucariontes como un complejo de Golgi, un retículo endoplásmico rugoso y liso, ribosomas, lisosomas, mitocondrias, una vacuola contráctil y un nucléolo denso con un núcleo prominente. Las mitocondrias de *Acanthamoeba* spp. normalmente se presentan en forma ovalada con cisternas. Además, en el citoplasma se pueden encontrar gotas lipídicas y reservas de polisacáridos (Bowers & Korn, 1968). Los trofozoítos se mueven a través de sus acantópodos que generan fuerzas de adhesión entre la amiba y la superficie donde se encuentra. También pueden transportarse de manera pasiva a través de superficies líquidas (Blair Bowers & Korn, 1968; Khan, 2006).

El quiste mide aproximadamente 5-20  $\mu\text{m}$  y consiste en una pared celular externa llamada ectoquiste y una pared celular interna llamada endoquiste. Ambas paredes están conformadas por celulosa. Las dos paredes están separadas y sólo convergen en puntos conocidos como ostioles, los cuales. Los ostioles contienen a su vez una región llamada opérculo (Fouque *et al.*, 2012). Este estadio también

presenta un aumento en el número de lisosomas. Durante fases tempranas de enquistamiento las mitocondrias se caracterizan por presentar una estructura lamelar, misma que desaparece en fases tardías (después de 2 h). De igual manera, el quiste puede presentar gránulos electrón-densos y gotas lipídicas (B. Bowers & Korn, 1969; Khan, 2006).

El proceso de enquistamiento ha sido previamente estudiado y puede ser inducido *in vitro* con el uso de distintos reactivos como catecolaminas, magnesio y taurina (Köhler *et al.*, 2008). En la naturaleza, las condiciones adversas que causan el enquistamiento incluyen falta de nutrientes y estrés osmótico. Se ha observado que durante el proceso de enquistamiento y en el estadio de quiste hay una disminución de macromoléculas como proteínas, glucógeno y RNA. De igual manera, se ha reportado una disminución en la masa citoplasmática del 80% debido a la pérdida de agua (Bowers & Korn, 1969). Además, se han identificado varias proteasas que juegan un papel importante en este proceso, incluyendo una parecida a subtilisina y varias cisteín proteasas específicas del enquistamiento (Moon *et al.*, 2008). Se sugiere que *Acanthamoeba* spp. probablemente utiliza estas proteasas para degradar sus mitocondrias y así poder utilizar las



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (CDC, 2012)

biomoléculas resultantes para la generación de las paredes que conforman el quiste. Estudios de la ultraestructura del quiste revelaron que durante el proceso de enquistamiento se forman vacuolas posiblemente conteniendo celulosa. Además se cree que al desenquistar parte de la pared es fagocitada por la ameba aunque los procesos bioquímicos que ocurren permanecen sin describir (Chávez-Munguía *et al.*, 2005). Antes de la formación del quiste la actina filamentosa de *A. castellanii* se une a vesículas de pre-enquistamiento y la proteína estructural desaparece cuando la estructura del quiste está completamente formada. Al regresar a la forma de trofozoíto, nuevamente se observa la presencia de cúmulos de actina en el citoplasma (Chávez-Munguía *et al.*, 2013).

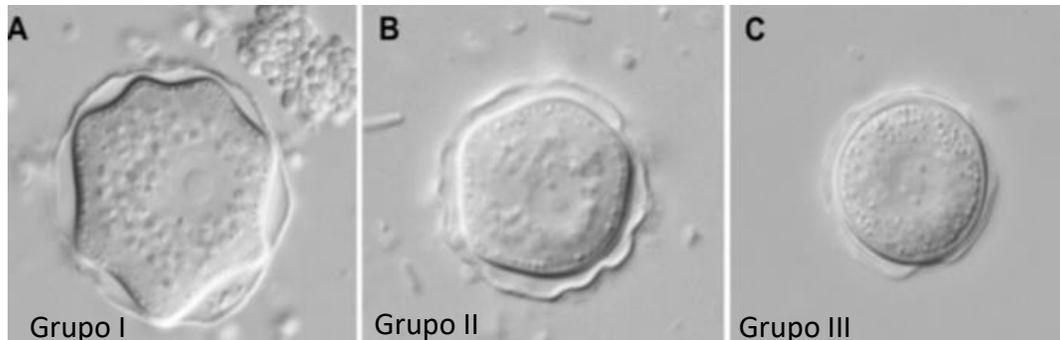
### 1.1.2 Distribución

El género *Acanthamoeba* comprende aproximadamente 24 especies y puede ser clasificado dependiendo de sus características morfológicas en tres grupos (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015) (Figura 2. Ejemplos de quistes en cada grupo morfológico de *Acanthamoeba* spp. (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015)

). El grupo I comprende especies que tienen quistes que oscilan entre los 16-30  $\mu\text{m}$  con endoquistes en forma de estrella y ectoquistes con forma lisa o rugosa. El grupo II tiene quistes de menos de 18  $\mu\text{m}$  con ectoquistes rugosos y endoquistes en forma poligonal, triangular, ovalado o redondo. Finalmente, el grupo III consiste en especies con quistes del mismo tamaño que el grupo II; sin embargo, se diferencian por cambios sutiles en la morfología. Por ejemplo, presentan un ectoquiste más delgado y ondulado con un endoquiste generalmente redondeado. Entre las especies principales del grupo I se encuentran *Acanthamoeba astronyxis*, *Acanthamoeba comandoni* y *Acanthamoeba tubiashi*. Las del grupo II comprenden a *A. castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba ryhsodes* y *Acanthamoeba hatchetti*; mientras que en el grupo III se encuentra *Acanthamoeba*

*culbertsoni*, *Acanthamoeba royreba* y *Acanthamoeba lenticulata* (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Desde su hallazgo, se han encontrado un gran número de cepas del género *Acanthamoeba* y recientemente se han clasificado en distintos genotipos basados en la secuencia de su subunidad ribosomal 18S (Fuerst *et al.*, 2015). Usando este criterio, se han descrito al menos 20 genotipos diferentes de *Acanthamoeba*



**Figura 3 .** Ejemplos de quistes en cada grupo morfológico de *Acanthamoeba* spp. (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015)

clasificadas como T1-T20 (Fuerst *et al.*, 2015). Cada genotipo difiere en su secuencia en al menos un 5% con respecto a las demás para ser considerada como un nuevo genotipo. El genotipo más abundante en casos de infecciones humanas es el T4, el cual puede causar QA, EAG e infecciones cutáneas (Köhler *et al.*, 2016).

### 1.1.3 Queratitis Amibiana

La enfermedad más común causada por distintas amibas del género *Acanthamoeba* es la QA, frecuentemente causada por *A. castellanii* y *A. polyphaga*. Esta infección es caracterizada por un daño severo a la córnea, generando dolor y pérdida de la visión. La prevalencia aumenta en los usuarios de lentes de contacto, los cuales representan aproximadamente 80% de los casos de QA (Radford *et al.*, 2002). La enfermedad es difícil de diagnosticar debido a que pocas veces se logra aislar a la amiba o puede ser diagnosticado de manera errónea como una infección causada por un microorganismo diferente, generalmente por bacterias o virus (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; Panjwani, 2010). Algunos de los síntomas incluyen opacidad del stroma, escleritis, inflamación ocular y la presencia de un hipopión. La

manera más efectiva de diagnosticar esta enfermedad es a través de raspados corneales. Las muestras se cultivan en placas de agar enriquecidas con *E. coli* inactivadas por calor y se monitorean para determinar la presencia de trofozoítos y quistes (Carnt & Stapleton, 2016).

Las especies virulentas de *Acanthamoeba* invaden la córnea, que es una estructura curvilínea cristalina avascular ubicada en la parte anterior del ojo. Está formada por el epitelio anterior que tiene un grosor de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , la membrana de Bowman de 10  $\mu\text{m}$  de grueso, el estroma o sustancia propia de la córnea que mide 480-500  $\mu\text{m}$  de grueso, la membrana de Descemet o lámina limitante posterior de 8-10  $\mu\text{m}$  de grueso y por último el epitelio posterior o endotelio de 5  $\mu\text{m}$  de grueso. El epitelio corneal es plano y no queratinizado. Sus células externas contienen uniones de tipo *Zonula occludens* y están formadas por células alargadas, aladas y basales. La membrana de Bowman es la parte modificada más superficial de la sustancia propia de la córnea y está compuesta por colágeno de tipo I, III, V y VI. El estroma es la parte más gruesa de la córnea y contiene fibras de colágeno principalmente tipo I organizadas en lamelas. De igual manera contiene queratinocitos y glucosaminoglicanos. La membrana de Descemet está compuesta de colágeno tipo IV y laminina. Se ha reportado que la córnea provee aproximadamente dos tercios del poder refractivo del ojo (Navaratnam *et al.*, 2015).

El establecimiento de la infección por *Acanthamoeba* spp. está relacionado con un trauma en la córnea; sin embargo se ha reportado que en modelos animales puede haber internalización y daño del tejido sin la necesidad de una abrasión previa (Omaña-Molina *et al.*, 2004). Durante el proceso de QA el microorganismo se adhiere al ojo por medio de lectinas que posee en su superficie y desencadena los demás mecanismos de patogenicidad entre los cuales destacan la fagocitosis, la inducción de apoptosis y la secreción de proteasas (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Una vez adherida, la amiba puede penetrar las subsecuentes capas de la córnea generando la destrucción del epitelio, para atravesar a la membrana de Bowman y degradar la colágena del stroma. En el stroma la amiba se puede adherir a las terminaciones nerviosas del ojo generando un gran dolor. En la mayoría de los casos la infección no penetra más allá de la membrana de Descemet; sin

embargo, la enfermedad puede ser tan grave que el paciente puede perder por completo la visión en el ojo afectado (Kuennen *et al.*, 2010).

#### **1.1.4 Mecanismos de patogenicidad**

Existen distintos factores de virulencia en las cepas patógenas de *Acanthamoeba* spp. y principalmente consisten en adhesión, secreción de proteasas y fagocitosis (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Las amibas del género *Acanthamoeba* que pueden producir daño, cuentan con distintas lectinas en la superficie de sus acantópodos que le permiten mediar el proceso de adhesión entre ella y la célula blanco. Estos receptores de superficie anclan distintos residuos de la célula al citoesqueleto de la amiba (Garate *et al.*, 2005). La lectina más estudiada de *A. castellanii* es la proteína de unión a manosa (MBP) la cual reconoce residuos de este carbohidrato en la superficie de la córnea y de otras células. Esta proteína pesa 400 kDa y consiste en subunidades de 130 kDa (Garate *et al.*, 2006). Además, contiene un dominio citoplasmático con varios sitios de fosforilación putativos que pueden activar distintas vías de señalización generando en cambios en el movimiento y la forma de la amiba (Garate *et al.*, 2005).

Se especula que existen otras lectinas involucradas en el proceso de adhesión entre las cuales se encuentra una proteína de 207 kDa que al ser inhibida por un anticuerpo policlonal bloquea la adhesión a células de epitelio corneal (Kennett *et al.*, 1999). Así mismo, se han reportado 16 glicoproteínas con residuos de manosa y 8 glicoproteínas con residuos de N-acetil glucosamina relacionadas con el evento de adhesión en *A. castellanii* (Soto-Arredondo *et al.*, 2014). *Acanthamoeba healyi* y *A. culbertsoni* también contienen algunas proteínas que le permiten unirse a otros componentes de la matriz extracelular, como laminina, colágeno tipo IV y fibronectina (Hong *et al.*, 2004; Rocha-Azevedo *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta la fecha solamente la MPB ha sido asociada directamente con la virulencia amibiana.

La adhesión es crucial para desencadenar los demás efectos citopáticos ya que genera la activación de una serina proteasa de 133 kDa conocida como la proteína inducida por manosa (MIP-133) (Hurt *et al.*, 2003a). Esta proteína se

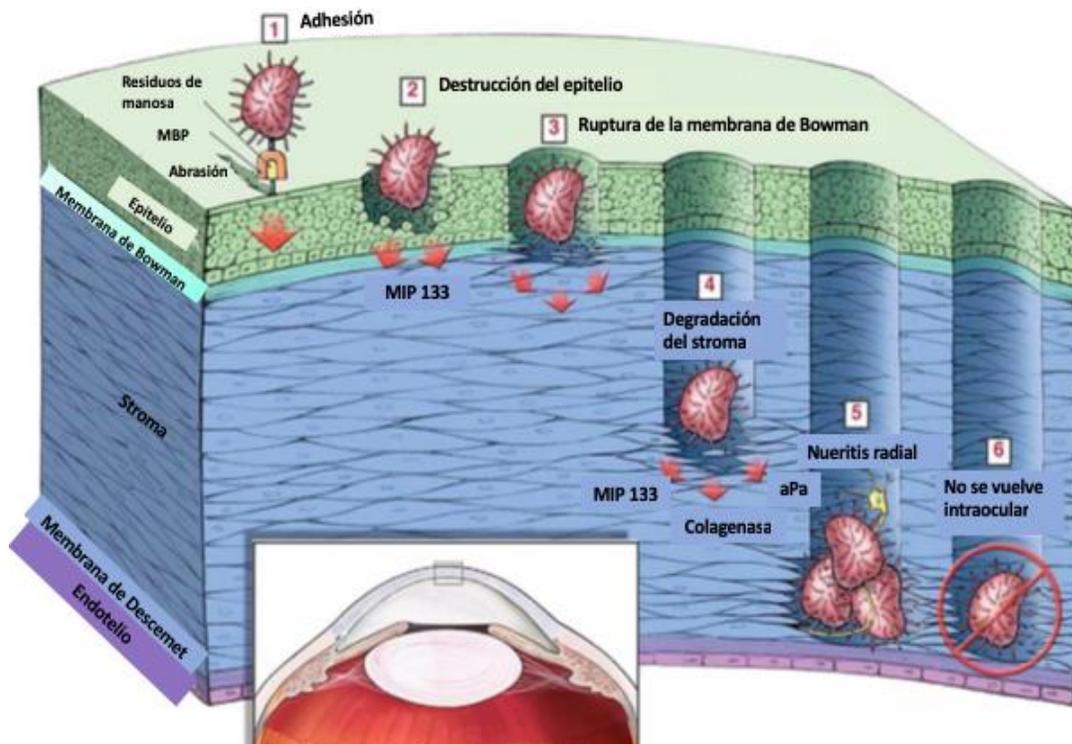
encuentra sobre-expresada en distintas cepas virulentas de las especies del género *Acanthamoeba* (Hurt *et al.*, 2003b) y activa metaloproteasas expresadas en las células corneales como MMP-2 y MMP-3 que exacerban la QA (Alizadeh *et al.*, 2008). Además, MIP-133 degrada proteínas de la matriz extracelular de la córnea como colágeno tipo I y IV e induce apoptosis a través de la vía dependiente de la caspasa 3 (Hurt *et al.*, 2003a).

Además de la MIP-133, la proteasa amibiana conocida como el activador de plasminógeno (aPa) también contribuye al efecto citopático (Mitra *et al.*, 1995). El activador aPA ha sido detectado en las cepas patógenas *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. rhysodes* (Alizadeh *et al.*, 2007). La proteína escinde a una proteína presente en la córnea llamada plasminógeno y la convierte en plasmina. A su vez, la plasmina puede activar a más proteasas como PAR 1, 2, 3, y 4 las cuales degradan la matriz extracelular del hospedero (Alizadeh *et al.*, 2007) (Figura 3 Mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba* spp. (Clarke & Niederkorn, 2006)).

Un mecanismo citopático adicional es la liberación del ADP por medio de ATPasas. Se ha reportado que existe un aumento en el calcio citosólico de las células epiteliales expuestas a ADP, lo cual activa la caspasa-3 e induce a apoptosis. De igual manera, cuando las ATPasas de *Acanthamoeba* spp. provenientes de aislados clínicos son inhibidas por suramina, su efecto citopático disminuye (Sissons *et al.*, 2004). El proceso de fagocitosis también es considerado un factor de virulencia ya que se ha visto la internalización de las células del huésped por la amiba. Este fenómeno ha sido previamente estudiado en córneas de hámster (*Mesocricetus auratus*) (Omaña-Molina *et al.*, 2004). *Acanthamoeba castellanii* fagocita fragmentos de células y se ha descrito que el proceso es mediado por un rearrreglo de su citoesqueleto de actina (Alsam *et al.*, 2005).

### 1.1.5 Tratamiento

El tratamiento para la infección por las amibas del género *Acanthamoeba* spp. y su efectividad dependen de un diagnóstico certero y oportuno ya que en muchos casos



**Figura 4** Mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba* spp. (Clarke & Niederkorn, 2006).

la infección se confunde por una queratitis bacteriana y se trata con medicamentos inadecuados, permitiendo la progresión de la enfermedad (Szentmáry *et al.*, 2019). Hasta la fecha no existe ningún fármaco que sea exitoso en tratar la QA y uno de los problemas más grandes para el tratamiento eficaz es la formación de quistes los cuales son resistentes a la mayoría de los compuestos usados (Huang *et al.*, 2017). Normalmente, los cuadros de QA se tratan con agentes antimicrobianos como el polyhidroximetil-biguanida (0.02-0.06%) y el clorhexadeno (0.02-0.2%) (Clarke *et al.*, 2012). Sin embargo, estos compuestos también son tóxicos para el ojo así que se deben administrar con cautela y por tiempos reducidos. El tratamiento se puede complementar con esteroides para tratar de disminuir la inflamación asociada con la infección, sin embargo, el uso de estos medicamentos se evita ya que suprimen la respuesta inmunológica del paciente (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Si la córnea presenta un daño grave, puede ser necesaria una intervención quirúrgica para removerla y evitar que la infección se extienda al sistema nervioso central (Kuennen *et al.*, 2010). En la actualidad un reto en la investigación es la búsqueda de algún fármaco que sirva como terapia efectiva para la QA y poder evitar la pérdida de la visión en los pacientes infectados.

### **1.1.6 Proceso de fagocitosis**

*Acanthamoeba* spp. utiliza distintos mecanismos para fagocitar a las bacterias con las que se encuentra en su nicho ecológico. Se ha reportado que el mecanismo depende de la naturaleza de lo que está siendo internalizado. Por ejemplo, se ha encontrado que *E. coli* y *Klebsiella aerogenes* son fagocitadas con más facilidad que otras especies bacterianas (Pickup *et al.*, 2007). También se ha reportado que *Acanthamoeba* spp. puede ingerir perlas de silica, carbono y látex (Bowers & Olszewski, 1983; Korn, 1967). El proceso puede durar tan poco como 40 segundos y cataliza un metabolismo oxidativo similar al del estallido respiratorio de los neutrófilos (Brooks & Schneider, 1985).

Para fagocitar la amiba rodea la partícula con su membrana e internaliza pedazos de la bacteria o célula. Posteriormente se crean vacuolas cuyo pH se acidifica hasta que el material internalizado es destruido. Se ha observado que el proceso es dependiente de una remodelación del citoesqueleto de actina ya que se ha observado que la citocalasina D inhibe este proceso de fagocitosis (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Además, se cree que el mecanismo también es mediado en parte por cinasas de Rho ya que la incubación con el fármaco Y27632 inhibe parcialmente la fagocitosis (Alsam *et al.*, 2005). Otros fármacos que inhiben la fagocitosis en *A. castellanii* incluyen el inhibidor de tirosina cinasa, Genisteína y el inhibidor de fosfatidil-inositol cinasa, LY294002 (Alsam *et al.*, 2005). Sin embargo, el mecanismo molecular específico que de la fagocitosis no es del todo conocido.

#### **1.1.7 Transporte de bacterias por parte de *Acanthamoeba* spp.**

Debido a que las amibas del género *Acanthamoeba* son ubicuas en la naturaleza, interactúan con una gran variedad de microorganismos, principalmente bacterias, algunas de las cuales pueden sobrevivir dentro de la amiba por distintos periodos de tiempo y cierto tipo perduran lo suficiente para ser transportadas y diseminadas causando la propagación de enfermedades (Guimaraes *et al.*, 2016). Tales relaciones por su carácter transitorio no se consideran de endosimbiosis sino que se denominan endocitobiontes (Balczun & Scheid, 2017).

Las interacciones amiba-bacteria pueden ser estudiadas de distintas maneras. Se han realizado co-cultivos en donde se visualiza al microorganismo internalizado y su desarrollo dentro de la amiba puede ser evaluado *in vitro* (Bui *et al.*, 2012). Por otro lado, también se han analizado estas relaciones usando aislados clínicos de amibas provenientes de distintos sitios. En este caso las bacterias internalizadas son identificadas por medio de técnicas de biología molecular como secuenciación de la subunidad 16S ribosomal (Iovieno *et al.*, 2010).

Existen beneficios atribuidos a los microorganismos capaces de sobrevivir a la fagocitosis amibiana ya que al encontrarse dentro ella, son protegidos de las condiciones adversas externas como la cloración del agua, microbicidas y cambios

bruscos de temperatura (Balczun & Scheid, 2017; King *et al.*, 1988; Scheid, 2014). Posterior al resguardo las bacterias pueden egresar íntegras de la amiba. Debido a esto, algunos autores han calificado a *Acanthamoeba* spp. como un “caballo de troya” para estos microorganismos (Guimaraes *et al.*, 2016) .

Adicionalmente, se ha especulado que la capacidad de las bacterias de sobrevivir dentro de *A. castellanii* y de otras amibas de vida libre fue generada por una presión de selección en el nicho ecológico (Scheid, 2014). Los microorganismos resistentes a amibas resultantes son más aptos para evadir los procesos de fagocitosis incluyendo los de las células del sistema inmune, generando cepas más virulentas. Por lo tanto, la relación entre bacteria-amiba resulta de alta importancia médica (Scheid, 2014).

Los cambios y requerimientos necesarios para que un microorganismo pueda sobrevivir dentro de *A. castellanii* y *A. polyphaga* han sido ampliamente estudiados (Guimaraes *et al.*, 2016). Sin embargo, el efecto de esta relación sobre la amiba aún permanece sin entenderse por completo. Se ha reportado que aislados clínicos de *Acanthamoeba* spp. (cepas no tipificadas) tomados de pacientes con QA pueden contener bacterias internalizadas (Iovieno *et al.*, 2010). En el mismo estudio se evaluó el efecto citopático de los aislados y se determinó que las amibas que contenían microorganismos generaban un mayor efecto citopático sobre los cultivos celulares epiteliales (Iovieno *et al.*, 2010). Debido a esto, se cree que algunos endocitobiontes podrían aumentar la virulencia de *Acanthamoeba* spp. Sin embargo, este efecto es dependiente del tipo de microorganismo internalizado, por lo tanto, se requieren más estudios para confirmar estos datos.

#### **1.1.8 Relaciones entre *Acanthamoeba* spp. y bacterias**

Actualmente se estima que aproximadamente 25% de los aislados de *Acanthamoeba* spp. contienen bacterias; así mismo, se han identificado más de 100 microorganismos patógenos para el humano capaces de sobrevivir dentro de distintas especies amibianas (Greub & Raoult, 2004). Una de las primeras bacterias que se encontraron dentro de *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *Acanthamoeba* sp. fue

*Legionella pneumophila* (Rowbotham, 1980), ya que la relación entre esta bacteria con *A. castellanii* y *A. polyphaga* ha sido ampliamente estudiada, se han caracterizado algunos mecanismos relacionados con su entrada, sobrevivencia y liberación dentro de la amiba (Bozue & Johnson, 1996, Isberg *et al.*, 2009, King *et al.*, 1988).

*L. pneumophila* ingresa a *A. castellanii* por medio de endocitosis causando re-arreglos en el citoesqueleto amibiano. *A. castellanii* puede extender sus acantópodos y rodear a la bacteria en un mecanismo conocido como “coiling” (Bozue & Johnson, 1996) de manera similar a la fagocitosis de *L. pneumophila* por macrófagos (Segal & Shuman, 1999). Una vez internalizada, la bacteria evita su degradación por medio de la producción de efectores que son insertados al citosol amibiano a través del sistema de secreción tipo IV (Isberg *et al.*, 2009). Estos efectores evitan la unión de bombas de protones a las vacuolas que acidifican el ambiente intracelular impidiendo la disminución del pH y la degradación bacteriana (Isberg *et al.*, 2009). *L. pneumophila*, puede sobrevivir dentro de *A. castellanii* a concentraciones altas de biocidas (King *et al.*, 1988) y es liberada mediante dos vías; la primera consiste en el egreso causado por la lisis amibiana, mientras que la segunda vía implica la generación de vesículas producidas por *A. castellanii* conteniendo a *L. pneumophila* las cuales la transportan y protegen a la bacteria. De esta manera la bacteria es diseminada a través del ambiente, propagando la enfermedad del Legionario.

Otra bacteria comúnmente reportada que sobrevive dentro de *A. castellanii* es *Listeria monocytogenes* (Ly & Müller, 1990). Se ha observado que este microorganismo sobrevive hasta 8 días en co-cultivo dentro de la amiba; no obstante, conforme continúa el cultivo y las amibas empiezan a enquistar las bacterias viables disminuyen hasta desaparecer (Schuppler, 2014). En este caso, parece que los factores de virulencia de la bacteria no contribuyen a la sobrevivencia dentro de la amiba ya que no se encontraron diferencias entre cepas patógenas y no patógenas (Schuppler, 2014). Aunque existen varios estudios que reportan la sobrevivencia de cepas de *L. monocytogenes* en *A. castellanii* y *A. polyphaga*, también hay algunos que reportan la muerte de la bacteria a causa de

la fagocitosis amibiana (Zhou *et al.*, 2007); por lo que la permanencia de la bacteria dentro de la *A. castellanii* continua sin confirmarse y probablemente pueda depender de ciertas condiciones de temperatura y pH aún no completamente entendidas (Schuppler, 2014).

De igual manera, tanto la sobrevivencia intracelular como la fagocitosis de distintas cepas de *Campilobacter* han sido reportadas en la literatura. *C. jejuni* puede existir dentro de *A. polyphaga* hasta 60 días (Axelsson-Olsson *et al.*, 2005). Durante este tiempo también se observó multiplicación intracelular de la bacteria y lisis amibiana. Además, se ha descrito que el co-cultivo con *A. castellanii* prolonga el tiempo de sobrevivencia de *C. jejuni*, por lo que se cree que esta interacción puede facilitar la transmisión de la bacteria en aves usadas para consumo humano (Vieira *et al.*, 2015).

Otros endocitobiontes usuales son cepas del género *Mycobacterium*. Por ejemplo *Mycobacterium avium* se replica dentro de *A. castellanii* y las bacterias que internalizadas resultan más virulentas, *M. avium* escapa la vacuola amibiana y sobrevive en el citosol (Cirillo *et al.*, 1997). Para llevar a cabo este proceso utiliza el sistema de secreción tipo VII que le permite inyectar efectores para evitar su degradación amibiana (Guimaraes *et al.*, 2016).

*Arcobacter butzleri* puede sobrevivir en co-cultivo con *A. castellanii* hasta 10 días mientras que *Yersinia enterocolitica* puede sobrevivir por lo menos 14 días y replicarse dentro del citoplasma (Cateau *et al.*, 2014; Guimaraes *et al.*, 2016). *Salmonella typhimurium*, por otro lado, se replica dentro de la vacuola contráctil de *A. polyphaga* y se han encontrado de 100 a 200 bacterias por vacuola (Gaze *et al.*, 2003). Debido a su alta capacidad de replicación dentro de la amiba se considera que es un reservorio natural de esta bacteria (Gaze *et al.*, 2003). Tanto *S. typhimurium* como *Salmonella dublin* aumentan su virulencia después de ser internalizadas por *A. rhyssodes* (Tezcan-Merdol *et al.*, 2004).

Con base en los reportes previos se concluye que pueden existir una gran cantidad de microorganismos capaces de sobrevivir dentro de *Acanthamoeba* spp. Sin embargo, las interacciones entre ellos varían dependiendo del microorganismo. Así mismo, las implicaciones en la virulencia amibiana permanecen poco conocidas por

lo que son necesarios más estudios para entender los mecanismos de patogenicidad generados por las interacciones amiba-bacteria.

## **1.2 *Escherichia coli***

### **1.2.1 Generalidades**

*E. coli* es una bacteria perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae* dentro del filo *Proteobacteria* descubierta en 1885 por Theodor Escherich. Tiene forma ovalada y mide aproximadamente 2.0-6.0  $\mu\text{m}$  de longitud y 1.1-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho. No forma esporas y mayormente se mueve a través de filamentos. Algunas cepas de *E. coli* presentan cápsulas compuestas de polisacáridos y fimbrias o pili de carácter hidrofóbico que proporcionan capacidad de adhesión (Percival & Williams, 2014).

Esta bacteria es Gram-negativa y como todos los integrantes de su familia, está compuesta por una doble membrana conteniendo una capa fina de peptidoglicanos entre ellas (Raetz & Whitfield, 2002). La membrana externa contiene una bicapa lipídica y varias moléculas en su superficie como lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, porinas, fimbrias y adhesinas. El LPS está compuesto a su vez por un el lípido A, un núcleo interno y uno externo (Figura 4 Esquema de la estructura de *E. coli* K-12 (modificada de Raetz y col. 2002).

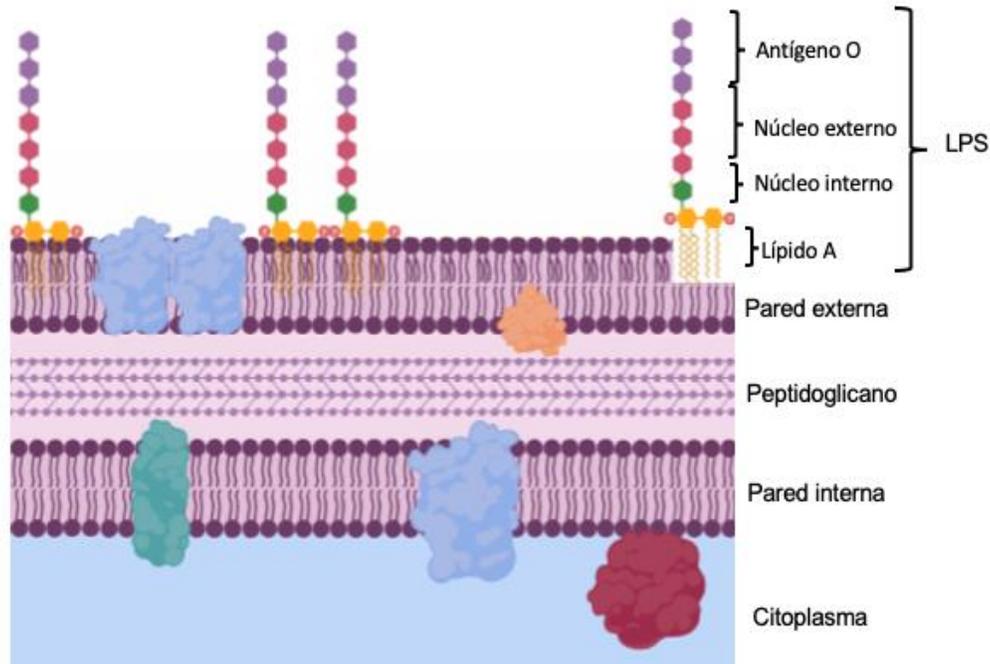
).

Sobre la superficie bacteriana se encuentran tres clases de antígenos: los somáticos (O), los flagelares (H) y los capsulares (K) (Tenaillon *et al.*, 2010). Los antígenos O son cadenas de polisacáridos únicos para cada microorganismo mientras que los antígenos H están ubicados en los flagelos de las bacterias que tienen movilidad y los antígenos K tienen estructuras específicas de cada serotipo (Raetz & Whitfield, 2002).

*E. coli* comúnmente se clasifica en serotipos por el método de Kauffman con base en sus antígenos de superficie. También se puede agrupar de manera filogenética en 5 grupos principales: A, B1, B2, D y E (Leimbach *et al.*, 2013).

Además, algunas cepas de *E. coli* pueden fermentar lactosa por lo que se ha usado la técnica del crecimiento en agar de MacConkey para identificarlas.

*E. coli* es un componente crucial de la microbiota humana la cual es adquirida durante el parto. También se puede encontrar en animales de sangre caliente como son los bovinos. Adicionalmente, se puede encontrar en diversos ambientes como el suelo, agua y alimentos. Al evolucionar para adaptarse a un gran rango de condiciones,



**Figura 5** Esquema de la estructura de *E. coli* K-12 (modificada de Raetz y col. 2002).

algunas de las cepas desarrollaron características patógenas (Croxen & Finlay, 2010). *E. coli* puede causar infecciones en las vías urinarias, sepsis y enteritis por lo que su estudio es de relevancia médica.

### 1.2.2 *E. coli* como bacteria comensal

En el humano *E. coli* es una de las primeras bacterias en colonizar el intestino y se encuentra en una concentración de  $10^{10}$ - $10^{11}$  células por gramo de contenido del intestino grueso (Leimbach *et al.*, 2013). Dependiendo de las propiedades de los distintos reservorios de *E. coli*, su prevalencia varía. En humanos se ha reportado una prevalencia intestinal de más del 90%, pero en otros mamíferos este valor es

mucho menor (Tenailon *et al.*, 2010). En aves se ha reportado una prevalencia del 23% y en reptiles del 10% (Gordon & Cowling, 2003).

Normalmente *E. coli* se encuentra en el intestino grueso, de manera específica en el ciego y en el colon. Coloniza la capa de moco que cubre las células epiteliales del intestino y son excretadas por las heces. Esta bacteria se ha adaptado para sobrevivir a las condiciones del intestino ya que tiene un metabolismo micro-aeróbico y anaerobio dentro del intestino, resultando en tiempos cortos de duplicación, aproximadamente de 30 min (Leimbach *et al.*, 2013).

Las cepas de *E. coli* que comúnmente se encuentran en el intestino y no causan enfermedad se consideran especies comensales ya que tanto el hospedero como la bacteria se benefician de la relación. El hospedero le provee a *E. coli* nutrientes, protección y diseminación, mientras que la bacteria previene la colonización de patógenos en el intestino gracias a la producción de bacteriocinas y diversos otros mecanismos (Tenailon *et al.*, 2010).

### **1.2.3 *E. coli* HS**

*E. coli* HS es una bacteria comensal que fue aislada en el instituto de investigación Walter Reed Army. Este aislado es del serotipo O9, motil, competente y susceptible a manipulaciones genéticas. Fue recuperada por primera vez en 1958 de un voluntario humano sano. Desde entonces, se ha utilizado en laboratorios como un control no patógeno por su capacidad de colonizar el intestino sin generar ningún daño. Se ha reportado que puede colonizar al humano con hasta  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por g de heces sin causar enfermedad (Levine M. *et al.*, 1978). Sin embargo, mucho sobre la biología del aislado permanece sin conocerse.

En el 2008 se hizo un análisis genómico del aislado y se comparó con cepas patógenas de *E. coli*. Los autores encontraron genes funcionales únicos para *E. coli* HS que codifican para el lipopolisacárido del serogrupo O9. Además, se reportó que la bacteria comensal comparte un gran número de genes con las cepas patógenas. Por ejemplo, cuenta con la mayoría de los genes que codifican para el pili y los componentes de la fimbria de *E. coli* EDL933. También posee los genes que

codifican para el sistema de secreción tipo II y un sistema de secreción tipo III no funcional conocido como ETT2 (Rasko *et al.*, 2008). Estos sistemas también son encontrados en algunas cepas virulentas de *E. coli* (Slater *et al.*, 2018). A partir de este análisis los autores sugieren que existe un alto grado de mosaicismos entre *E. coli* HS y las cepas virulentas de *E. coli* ya que se encontraron varios genes en común que previamente se pensaba eran exclusivos para el uno u otro grupo (Rasko *et al.*, 2008).

De igual manera, se ha reportado que la pre-colonización con *E. coli* HS en conjunto con otro asilado comensal (*E. coli* Nissle), evita la infección de la cepa patógena *E. coli* EDL933 (Maltby *et al.*, 2013). Los autores sugieren que el efecto es debido a que compiten por los mismos nutrientes. *E. coli* HS es capaz de metabolizar distintos azúcares entre los cuales destacan galactosa, arabinosa, gluconato, N-acetilglucosamina, lactosa y ribosa. Cuando la cepa es mutada para no poder utilizar arabinosa y galactosa sufre una importante disminución en su crecimiento y es la única cepa de *E. coli* comensal que tiene la misma capacidad de degradación de N-acetilglucosamina que *E. coli* EDL933. Adicionalmente, es la el único aislado de la bacteria que utiliza lactosa para su colonización (Maltby *et al.*, 2013).

Un estudio reciente ha identificado una molécula de adhesión en la superficie de *E. coli* HS conocida como molécula de adhesión multivalente de HS (MAM<sup>HS</sup>). Esta molécula se puede unir a una variedad de lípidos, sin embargo, presenta una mayor afinidad por lípidos sulfatados. MAM<sup>HS</sup> puede interactuar con mucina-2 y componentes del epitelio celular como fibronectina, colágeno tipo IV y laminina (Al-Saedi *et al.*, 2017).

#### **1.2.4 *E. coli* como bacterias patógenas**

Se cree que las cepas patógenas de *E. coli* resultaron a partir de cepas comensales que adquirieron factores de virulencia a través de la ganancia y la pérdida de elementos móviles. La transferencia horizontal de genes permite la obtención de grandes grupos de genes asociados a la virulencia conocidos como islas de

patogenicidad, las cuales se pueden encontrar en plásmidos o integrados en los cromosomas (Croxen, 2010). Estas nuevas características pueden proveer de elementos que le permiten a la bacteria adaptarse con nuevos hospederos o sobrevivir en el ambiente.

Existen distintas cepas de *E. coli* que pueden causar enfermedades y se han agrupado en intestinales y extra-intestinales. Dentro del grupo de *E. coli* causantes de enfermedades intestinales existen 6 patotipos distintos: enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y difusa adherente (DAEC). Cada uno tiene mecanismos de patogenicidad diferentes que le permiten adherirse, manipular mecanismos de señalización e invadir y colonizar de manera eficiente distintas partes del intestino; causando una diversidad de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004).

### **1.2.5 EHEC**

EHEC es un patotipo de *E. coli* descubierto en 1982 causante de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. El serotipo más común es O157:H7 (Nguyen & Sperandio, 2012). Esta bacteria es de relevancia médica ya que brotes de la infección han causado múltiples problemas de salud pública, principalmente en niños. Anualmente, se presentan alrededor de 63,153 casos de infecciones por EHEC en Estados Unidos (EUA) y se estima que se genera un gasto de aproximadamente 405 millones de dólares (Page & Liles, 2013). EHEC es altamente virulenta ya que se necesita un inóculo muy bajo (<100 UFC) para causar una infección de relevancia clínica (Page & Liles, 2013). Este patotipo puede ser identificado en la clínica por medio de su crecimiento en agar MacConkey sorbitol ya que fermentan sorbitol produciendo colonias transparentes en la placa.

La transmisión de la bacteria se da normalmente por vía oral-fecal a través del consumo de alimentos y agua contaminada. Sin embargo, también se han reportado en menor medida la transmisión por medio de persona a persona (Rangel *et al.*, 2005). EHEC puede sobrevivir tanto en reservorios animales como en el suelo, el agua y en alimentos. Se ha reportado que puede sobrevivir en hasta un año en el suelo (Jiang *et al.*, 2002) y hasta 8 meses en agua (LeJeune *et al.*, 2001).

Los animales como el ganado bovino, las ovejas, los bisontes y las cabras son algunos de los reservorios más comunes para esta bacteria (Lim *et al.*, 2010). EHEC se aloja principalmente en el íleon y el intestino grueso. Para colonizar el intestino de los rumiantes EHEC cuenta con tres mecanismos de resistencia a pH ácido: uno inhibido por glucosa, uno dependiente de glutamato y uno dependiente de arginina (Nguyen & Sperandio, 2012). Una vez localizada en el intestino, EHEC forma lesiones conocidas como de adherencia y eliminación (A/E). Estas lesiones implican un contacto íntimo entre la bacteria y la célula que ocasiona la remodelación de actina del hospedero (Lim *et al.*, 2010).

Otros métodos de adhesión que utiliza EHEC incluyen la utilización del pili común y la del pili hemorrágico (Croxen & Finlay, 2010). La lesión A/E se forma tanto en los reservorios de la bacteria como en los humanos. Sin embargo, en humanos es uno de los factores que causa enfermedad mientras que en ganado el efecto no parece ser dañino para la salud del animal (Lim *et al.*, 2010). Una vez infectado, el ganado puede diseminar a la bacteria a través de sus heces hasta por un mes y se ha reportado que puede transmitir de  $10^5$ - $10^6$  UFC de la bacteria (Lim *et al.*, 2010).

### **1.2.6 Mecanismos de patogenicidad**

EHEC contiene distintos factores de virulencia que le permiten generar daño en el humano. Las lesiones A/E causan un desequilibrio en el balance iónico del intestino, la pérdida de agua y ocasionan diarrea. Esto es debido tanto a la pérdida de las microvellosidades del intestino debido a las proteínas secretadas durante el proceso de adhesión de la bacteria, las cuales actúan sobre los transportadores iónicos y las aquaporinas de la célula blanco (Croxen & Finlay, 2010) (Figura 5 Mecanismos de patogenicidad de EHEC. (Modificado de Croxen & Finlay, 2010).

y

).

El mecanismo de la generación de lesiones A/E consiste principalmente en la inyección de diversos efectores a la célula que interfieren con la señalización de proteínas organizadoras del citoesqueleto. En EHEC, el sistema de secreción tipo III (SSTT) es el involucrado en transportar a las proteínas bacterianas directo al citoplasma de la célula. Entre lo efectores más importantes se encuentran el receptor Translocado de Intimina (TIR) y la proteína secretada tipo F (EspFu). TIR

Factor de virulencia	Efecto causado en el humano
Stx	Inhibición de síntesis proteica, inducción de la apoptosis
EspP	Serin proteasa que escinde el factor de coagulación V
Cif	Bloquea mitosis en fase G2/M, resulta en la inactivación de Cdk1
EspF	Induce la apertura de las uniones estrechas y apoptosis
EspH	Modula la formación de filopodios y de pedestales de actina
Map	Altera el potencial de membrana mitocondrial
Tir	Une proteínas remodeladoras del citoesqueleto y genera la pérdida de microvellosidades intestinales
Ehx	Genera lisis celular de leucocitos y eritrocitos
LifA/Efa	Inhibe activación de linfocitos
EspG	Alteran la organización de los microtúbulos afectando el intercambiador Cl <sup>-</sup> -OH <sup>-</sup>
NleA	Interrumpe las uniones estrechas y reduce el tráfico proteico

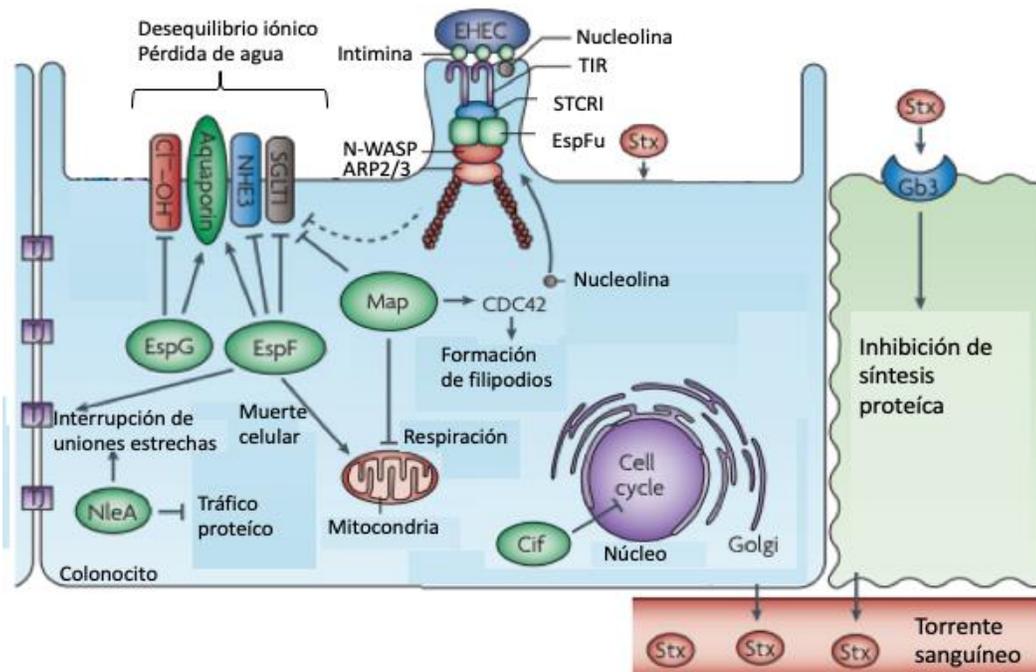
**Tabla 2: Principales factores de virulencia de EHEC**

se inserta en la membrana celular con su dominio central expuesto sobre la superficie, el cual detecta y ancla la intimina bacteriana a la célula. EspFu se une a las proteínas re-modeladoras de actina del hospedero, N-WASP y ARP2/3 (Croxen & Finlay, 2010) generando una acumulación de actina en forma de pedestal debajo de los contactos con la bacteria.

Factor de virulencia	Efecto causado en el humano
Stx	Inhibición de síntesis proteica, inducción de la apoptosis
EspP	Serin proteasa que escinde el factor de coagulación V
Cif	Bloquea mitosis en fase G2/M, resulta en la inactivación de Cdk1
EspF	Induce la apertura de las uniones estrechas y apoptosis
EspH	Modula la formación de filopodios y de pedestales de actina
Map	Altera el potencial de membrana mitocondrial
Tir	Une proteínas remodeladoras del citoesqueleto y genera la pérdida de microvellosidades intestinales
(Modificado de Kaper <i>et al.</i> , 2004)	
LifA/Efa	Inhibe activación de linfocitos
EspG	Alteran la organización de los microtúbulos afectando el intercambiador Cl <sup>-</sup> -OH <sup>-</sup>
NleA	Interrumpe las uniones estrechas y reduce el tráfico proteico

Varios de estos factores se encuentran codificados en una isla de patogenicidad llamada *locus* de eliminación del enterocito (LEE). Este locus codifica para el SSTT, TIR, EspFu y otros efectores como la proteína asociada a las mitocondrias (MAP) y la proteína secretada G (EspG) (Kaper *et al.*, 2004). Sin embargo, el principal factor de virulencia de EHEC es la toxina de Shiga (Stx) que no es codificada en LEE sino que se encuentra en el genoma de la bacteria forma de profago (Croxen & Finlay, 2010).

Stx, también conocida como verocitotoxina, es dividida en dos subgrupos: Stx 1 y Stx 2; y EHEC puede contener uno o ambos subgrupos de la proteína. Esta toxina es del tipo AB<sub>5</sub> y consiste en una subunidad A y una subunidad B pentamérica. Stx se libera a través de la lisis mediada por fago en respuesta a algún daño o estrés externo como la presencia de antibióticos (Croxen & Finlay, 2010). Una vez liberada, Stx se une a su receptor, Gb3 y es endocitada por la célula del hospedero. Después de la internalización, la proteína se une a la subunidad ribosomal 28S rRNA y remueve residuos de adenina, generando errores en la síntesis proteica, necrosis y muerte celular. Esta proteína es la causa del síndrome urémico hemolítico (Melton-Celsa *et al.*, 2012).



**Figura 7** Mecanismos de patogenicidad de EHEC. (Modificado de Croxen & Finlay, 2010).

Adicionalmente, existen otros factores de virulencia no codificados por LEE, sino en el plásmido pO157 de EHEC. En este elemento se encuentran los genes que codifican para hemolisina (Ehx), catalasa-peroxidasa y metaloproteasa E (stcE), entre otras proteínas que también contribuyen al efecto citopático de la bacteria (Lim *et al.*, 2010).

En resumen, EHEC es una bacteria patógena de alta importancia médica, ya que brotes de la infección siguen causando problemas de salud pública. La bacteria cuenta con distintos mecanismos que le permite sobrevivir en el agua, tierra y alimentos por lo que puede encontrarse en nichos comunes de *Acanthamoeba* spp. y es posible que interactúe con la amiba. Por lo tanto, puede dar lugar a que las interacciones tengan implicaciones en las enfermedades que causan tanto EHEC como *A. castellanii* y puedan exacerbar las patologías asociadas por ambas entidades.

## 2. Antecedentes Directos

En la actualidad, existen pocos estudios que describan la relación entre *Acanthamoeba* spp. y *E. coli*, por lo que se requiere aún más investigación sobre el tema. En 1999, Barker y colaboradores reportaron que EHEC es capaz de sobrevivir en co-cultivo con *A. polyphaga* (Barker *et al.*, 1999) beneficiando el crecimiento amibiano, aunque los detalles de la interacción no fueron explorados. También se ha documentado la sobrevivencia de otras patotipos de *E. coli* dentro de distintas cepas del género *Acanthamoeba*. Se observó que la cepa de *E. coli*, K1, causante de meningitis bacteriana, puede sobrevivir dentro de *A. castellanii*, mientras que la cepa no patógena K12 no sobrevive dentro de la amiba. Posteriormente, se construyeron varias mutantes de K1 y nuevamente se evaluó la sobrevivencia intracelular. Los autores concluyeron que la proteína externa conocida como OmpA y el LPS de la bacteria son cruciales para la asociación y sobrevivencia dentro de la amiba, ya que al ser modificadas la bacteria no era capaz de sobrevivir dentro de *A. castellanii* (Alsam *et al.*, 2006). Más recientemente, se estudió con mayor detalle el papel de distintas islas genómicas en las interacciones con *A. castellanii*. Se determinó, que *E. coli* mutada en las islas genómicas

relacionadas con genes de adhesinas, sistemas de secreción, síntesis de la capsula y secreción de péptidos tóxicos disminuyeron la capacidad de sobrevivencia dentro de la amiba (Yousuf *et al.*, 2014).

Otro grupo de investigación comparó las interacciones entre dos cepas de *E. coli* (K1 y K5) con *A. castellanii* (Jung *et al.*, 2007). Ambas bacterias tienen el mismo antígeno capsular pero distintos antígenos somáticos. Se observó que la cepa K5 se asocia y sobrevive dentro de *A. castellanii* significativamente menor que K1, indicando que el antígeno somático de K1 podría contribuir a la sobrevivencia y asociación con *A. castellanii* (Jung *et al.*, 2007). En este estudio también se observó un efecto similar en su sobrevivencia dentro del quiste. Otro elemento de la cepa K1 que puede ser de importancia es el SSTT ya que se ha visto que las mutantes de la cepa que generan defectos en este sistema disminuyen su capacidad de sobrevivencia intracelular (Siddiqui *et al.*, 2011). Este es un importante factor de virulencia compartido por un gran número de bacterias, entre ellas EHEC.

Se conoce poco sobre las interacciones entre EHEC y *Acanthamoeba spp.* sin embargo, existe un reporte que indica que *A. castellanii* reconoce componentes del LPS de la bacteria usando el receptor de unión a manosa para internalizarla (Arnold *et al.*, 2016). Sin embargo, el mecanismo exacto de esta interacción es desconocida ya que el LPS de EHEC no contiene residuos de manosa. Aun así, cuando se bloquea el receptor en *A. castellanii*, la internalización de la bacteria disminuye por lo que permanece poco claro que residuos del componente de la superficie bacteriana están siendo reconocidos (Arnold *et al.*, 2016).

También se han reportado distintos efectos de EHEC sobre *A. castellanii*. Existen algunos reportes que indican que Stx afecta la internalización de EHEC EDL933 en la amiba ya que las mutantes de la bacteria que no producen Stx se encuentran en mayor número dentro de *A. castellanii* después de la interacción (Chekabab, 2013). De igual manera, se ha reportado que *A. castellanii* puede sobrevivir en co-cultivo con EHEC, por largos plazos de tiempo, hasta de 21 días (Chekabab, 2012). En otro estudio se estableció un co-cultivo entre EHEC y *A. castellanii* y se observaron diferencias en los genes transcritos por bacterias

internalizadas comparadas con las bacterias control. Los genes modificados incluyen algunos involucrados en procesos metabólicos y de virulencia. Por ejemplo, se reportó un aumento en la transcripción de Stx y algunos componentes del SSTT (Carruthers, 2010).

A partir de estos antecedentes se puede concluir que *E. coli* puede interaccionar con *Acanthamoeba* spp. e incluso internalizarse. Sin embargo, el mecanismo exacto y las condiciones para que se generen estos fenómenos no están completamente estudiados. De manera adicional, los efectos sobre la virulencia de la amiba aún no son conocidos; por lo que es importante estudiar las interacciones de manera más profunda con énfasis en los cambios producidos en las amibas los cuales tienen un impacto directo en el daño producido al hospedero.

### 3. Justificación

*A. castellanii* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza e interactúa con una gran cantidad de microorganismos, con los que comparte su nicho ecológico. Asimismo, forma asociaciones ya sea estables o transitorias con distintos géneros bacterianos, entre ellos *E. coli*. En estudios previos se ha reportado que las interacciones entre EHEC y *A. castellanii* resultan en cambios transcripcionales sobre los genes de virulencia de la bacteria. Sin embargo, el impacto en la amiba permanece desconocido. Por lo tanto, es de nuestro interés determinar los cambios ocurridos en *A. castellanii* producidos por la interacción con EHEC con el fin de determinar el efecto de la interacción sobre la virulencia amibiana y las implicaciones potenciales sobre la gravedad en la queratitis amibiana.

#### **4. Hipótesis**

El co-cultivo entre *A. castellanii* y EHEC resulta en la internalización de la bacteria y en la modificación de los factores de virulencia amibianos lo cual impacta en el efecto citopático producido por la amiba tanto *in vitro* como *ex vivo*.

#### **5. Objetivo General**

Determinar los cambios en los mecanismos de patogenicidad de *A. castellanii* producidos por la interacción con EHEC.

#### **6. Objetivos Específicos**

1. Establecer las condiciones de interacción entre *A. castellanii* y EHEC para la internalización de la bacteria.
2. Determinar los cambios morfológicos, el patrón de proteínas y proteasas producidas en *A. castellanii* debido al co-cultivo con EHEC.
3. Determinar los cambios en la virulencia de *A. castellanii* sobre córneas de hámster posterior al co-cultivo con EHEC.

## **7. Material y métodos**

### **7. 1 Cultivo de *A. castellanii***

En todos los ensayos se usaron trofozoítos de *A. castellanii* las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Simon Kilvington (Laboratorio de Salud Pública, Bath, Inglaterra). Las amibas fueron cultivadas axénicamente a temperatura ambiente (25°C) en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY) con medio Chang (peptona-biotriptasa 16.6 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/L; dextrosa 2.7 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.9 g/L, pH 6.8), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Equitech Bio, TX). Los trofozoítos se recuperaron en fase logarítmica de crecimiento, después de 72 h de cultivo.

### **7. 2 Cultivo de cepas de *E. coli***

Se crecieron dos cepas de *E. coli*: EDL933 y *E. coli* HS las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Fernando Navarro del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN. Ambas cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (10 g/L NaCl; 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l Bactotripton) a 37°C en agitación y en condiciones aeróbicas. Previo a las infecciones la cantidad de bacterias fue ajustada por medio de la lectura de la densidad óptica a 600 nm.

### **7. 3 Transformación de bacterias**

Las dos cepas utilizadas fueron transformadas con el plásmido pDS-Red2 (Clonetech, CA) proporcionado por el Dr. Fernando Navarro para los ensayos de microscopía confocal. Las bacterias fueron re-suspendidas en MgCl<sub>2</sub> 0.1 M frío, posteriormente fueron re-suspendidas en CaCl<sub>2</sub> frío por 1 h para la obtención de células competentes. Finalmente, las bacterias se transformaron por la técnica de choque térmico con el plásmido pDsRed2, que expresa la proteína roja fluorescente (RFP). Para su selección, las bacterias transformadas se sembraron en placas LB con ampicilina (100 µg/ml), ya que el vector contiene una resistencia a este antibiótico.

#### **7. 4 Establecimiento del co-cultivo entre *E. coli* y *A. castellanii***

Se crecieron trofozoítos de *A. castellanii* a confluencia en cajas de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY) los cuales se infectaron con EHEC o con *E. coli* HS a una MOI de 100 por 3 h en medio Chang sin SFB. Posterior al tiempo de infección, las amibas se lavaron para eliminar a las bacterias no internalizadas y se recuperaron para los subsecuentes experimentos.

#### **7. 5 Cuantificación de bacterias internalizadas**

Se establecieron co-cultivos en cajas de cultivo de 12 pozos a una MOI de 100 por 15, 30, 60, 120 y 180 min. Posterior al co-cultivo, las amibas fueron incubadas con gentamicina (200 µg/ml) (Schering-Plough, NJ) por 1 h con el fin de eliminar a las bacterias extracelulares. Después, la gentamicina se eliminó con lavados de PBS y las amibas fueron lisadas con SDS (Sigma-Aldrich, MS) 0.5% por 20 min. El lisado se plaqueo en medio LB y 14 h después se contaron las UFC crecidas.

#### **7. 6 Observación de bacterias internalizadas**

Se sembraron trofozoítos de *A. castellanii* en cubreobjetos previamente esterilizados y silanizados (Sigma-Aldrich, MS). Se co-cultivaron con EHEC o *E. coli* HS expresando RFP por 3 h a una MOI de 100. Posterior a la interacción, las amibas se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) por 20 min. Las muestras se lavaron con PBS y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con 5 µl de Vectashield (Vector laboratories, CA). Las muestras fueron observadas por microscopía confocal (Carl Zeiss LMS 700).

#### **7. 7 Determinación de la viabilidad amibiana**

Las amibas se recuperaron después del co-cultivo con EHEC o con *E. coli* HS a una MOI de 100 por 3 h y se incubaron con azul de tripano al 0.4%. Las amibas fueron cargadas (10 µl) en una cámara de Neubauer. Las células vivas (transparentes refringentes) y muertas (azules) fueron contadas en 8 campos distintos.

## **7. 8 Cuantificación de amibas adheridas**

Los co-cultivos entre *A. castellanii* y *E. coli* fueron establecidos, como anteriormente se mencionó, en cajas de cultivo de 12 pozos (Corning, NY) a una MOI de 100 por 15, 30, 60, 120 y 180 min. Posterior a la incubación, tanto los sobrenadantes con amibas despegadas como las amibas adheridas a las cajas de cultivo fueron recuperadas y el número de amibas en cada grupo se cuantificó por medio de conteo en cámara de Neubauer. Se contaron 8 campos distintos y la viabilidad fue evaluada por el método de azul de tripano.

## **7. 9 Tinción con faloidina rodaminada**

Los trofozoítos de *A. castellanii* se sembraron en cubreobjetos estériles previamente cubiertos con fibronectina (50 mg/mL). Las amibas fueron co-cultivadas con EHEC y *E. coli* HS por 3 h a una MOI de 100. Posterior a la interacción, las muestras se fijaron con PFA al 4% por 20 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, MS) al 0.5% por 15 min. El citoesqueleto fue teñido con faloidina rodaminada (Sigma-Aldrich, MS) (1:100) por 1 h y los núcleos con DAPI (Sigma-Aldrich, MS) (1:1000) por 40 min. Las muestras se montaron con Vectashield (Vector laboratories, CA) para su observación mediante microscopía confocal (Carl Zeiss LMS 700).

## **7.10 Ensayos de sobrevivencia de *E. coli* internalizada en *A. castellanii***

El co-cultivo entre *E. coli* y *A. castellanii* fue establecido como mencionado previamente, a una MOI de 100 por 3 h. Las amibas se incubaron con gentamicina por 1 h (Schering-Plough, NJ) (200 µg/ml) y se lavaron con PBS. Posteriormente, las amibas se re-suspendieron en medio Chang sin suero por 3, 6, o 10 horas. Al término de estos tiempos las amibas se lisaron con SDS (Sigma-Aldrich, MS) al 0.5% por 20 min. El lisado se plaqueo en medio LB y se incubó por 14 h a 37°C. Finalmente, se cuantificaron las UFC.

## **7.11 Evaluación de los cambios ultraestructurales en *A. castellanii***

El co-cultivo entre *A. castellanii* y *E. coli* HS o EHEC fue establecido a una MOI de 100 por 3 h y las amibas interaccionadas fueron recuperadas por medio de

incubación en hielo por 40 min. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 15 min y el paquete celular se fijo en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio (Electron Microscopy Sciences, PA) al 0.1 M (pH 7.4) durante 1 h. Las amibas fueron post-fijadas con tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Sciences, PA) 0.3% en cacodilato de sodio al 0.1 M (pH 7.4) durante 1 h y deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 90 y 100%). Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina epóxica (Electron Microscopy Sciences, PA) y se obtuvieron cortes semifinos (0.5  $\mu\text{m}$ ) teñidos con azul de toluidina. Posteriormente, se seleccionaron muestras para la realización de cortes finos (70 nm), las cuales se colocaron sobre rejillas de cobre y contrastadas con acetato de uranilo (Electron Microscopy Sciences, PA) y citrato de plomo (Electron Microscopy Sciences, PA). Los cortes se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM-910).

#### **7.12 Productos de secreción de *A. castellanii***

Seis millones de trofozoítos fueron previamente co-cultivados con *E. coli* HS o EHEC a una MOI de 100 por 3 h. Posterior a la interacción, las amibas se incubaron en 5 ml de medio Chang libre de SFB por 14 h a temperatura ambiente. El medio fue recolectado, se centrifugó a  $375 \times g$  por 15 min a 4°C y se filtró con a través de una membrana con poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, MA). La muestra se precipitó con etanol al 100% por 2 horas a -20°C, se centrifugó a  $8000 \times g$  por 30 min y la pastilla fue re-suspendida en PBS (300  $\mu\text{l}$ ).

#### **7.13 Extractos totales de *A. castellanii***

Seis millones de trofozoítos previamente co-cultivados con *E. coli* HS o EHEC a una MOI de 100 por 3 h fueron recuperados. Las amibas fueron despegadas con PBS en agua-hielo por 40 min. Las amibas se centrifugaron a  $375 \times g$  por 15 min. Posteriormente, la pastilla se re-suspendió en 300  $\mu\text{l}$  de PBS. Las muestras fueron lisadas por medio de 10 ciclos de congelamiento y descongelamiento en nitrógeno líquido y agua hirviendo. La lisis se confirmó por medio de la observación en un microscopio de campo claro (Nikon, NY). Finalmente, la concentración de proteínas se cuantificó por medio del método de Bradford.

#### **7.14 Inhibidores de proteasas**

Para la caracterización de proteasas se usaron inhibidores de serín, cisteín y metaloproteasas. Cada inhibidor se incubó por 1 h con el extracto total o el medio condicionado previo a la zimografía. Las concentraciones e inhibidores usados fueron los siguientes: PMSF (Sigma-Aldrich, MS) 5 mM (para serín proteasa), E-64 (Sigma-Aldrich, MS) 10 $\mu$ M (para cisteín proteasas) y EDTA (J.T Baker, NJ) 2mM (para metaloproteasas)

#### **7.15 Perfiles proteícos**

Se elaboraron geles SDS-PAGE al 10% para los extractos totales y productos de secreción de *A. castellanii* previamente interaccionada con EHEC y con *E. coli* HS. Las muestras fueron incubadas con inhibidores de proteasas y (EDTA 2 mM, PMSF 5 mM y E-64 10  $\mu$ M ) cargadas (30  $\mu$ g de extracto total y 20  $\mu$ l de productos de secreción) en el gel con 10  $\mu$ l de amortiguador de carga 4x. Todas las muestras fueron hervidas por 15 min y la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 100 V durante 2 h. Posteriormente las muestras fueron teñidas con plata usando el kit Silver Stain Plus (Bio-Rad, CA).

#### **7.16 Perfiles proteolíticos (Zimografía)**

Se realizaron geles de acrilamida al 10% co-polimerizadas con gelatina porcina (Sigma-Aldrich, MS) al 0.1% y las muestras fueron cargadas (15  $\mu$ g de extracto total y 20  $\mu$ l de productos de secreción) con 10  $\mu$ l de amortiguador de carga 4x. La electroforesis fue realizada en hielo a 4°C a un voltaje de 100 V por 2 h. Los geles fueron lavados dos veces en agitación por 15 min con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, MS) al 2.5% y se incubaron en amortiguador de activación a pH 7 (Tris-OH 100mM y 2 mM de CaCl<sub>2</sub>) a 37°C por 14 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich, MS) al 0.5% por 1 h y fueron desteñidas con una solución de metanol (J.T Baker, NJ): ácido acético (J.T Baker, NJ): agua 45:10:50 hasta la aparición de bandas proteolíticas, las cuales se visualizaron como bandas claras en un fondo azul.

### **7.17 Ensayo proteolítico sobre Azocoll**

Para cuantificar la actividad proteolítica de las proteasas de *A. castellanii* se utilizó Azocoll (Millipore, MA), el cual es un sustrato cromogénico para proteasas. Para ello, se agregaron 2 mg de Azocoll a 250 µg de extracto total o a 250 µl de productos de secreción. El volumen final se ajustó a 500 µl con el amortiguador de activación de pH 7 previamente descrito. Las muestras se incubaron a 37°C por 16 h y la reacción enzimática fue detenida con ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich, MS) al 10%. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a  $375 \times g$  por 5 min y el sobrenadante fue leído en un espectrofotómetro a 520 nm (BioTek, VT).

### **7.18 Western blot (WB)**

Se realizaron ensayos de WB contra TIR para determinar su presencia en los lisados y productos secretados de *A. castellanii* interaccionada con EHEC. Así, los lisados y productos de secreción tratados como previamente se describió para el perfil proteico se separaron por SDS-PAGE al 12%. Entonces, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF de 0.2 µm (Immobilon-P, Millipore, MA). La electrotransferencia se realizó por 120 min a 320 mA a 4°C. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% (Svelty) en PBS-Tween 0.05% por 2 horas. Posteriormente, las membranas fueron lavada 3 veces con PBS-Tween por 10 min e incubada con el anticuerpo primario policlonal anti-TIR hecho en conejo (1:300) e incubado toda la noche (Donado por el Dr. Fernando Navarro del Departamento de Biología Celular). Al día siguiente, las membranas fueron lavada 7 veces con PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (Zymed-Invitrogen, CA) (1:1000) por 1 h a 37°C. Se lavó nuevamente 7 veces con PBS-Tween y la inmunodetección se reveló por medio de una solución de luminol-peroxidasa (1:1) (Santa Cruz Biotechnology, TX) en un visualizador de fluorescencia Odyssey (LI-COR, Alemania). La misma metodología fue seguida para control de carga con el anticuerpo primario anti-actina (1:100) hecho en ratón (Zymed-Invitrogen, CA) y el anticuerpo secundario anti-ratón (1:2000) (Zymed-Invitrogen, CA) con excepción de que en este caso los lavados entre incubaciones con los anticuerpos fueron únicamente 3 en vez de 7.

### **7.19 Evaluación de la virulencia amibiana en córneas de hámster**

Se utilizaron hámsteres machos adultos (*Mesocricetus auratus*) provenientes del bioterio del CINVESTAV-IPN, los cuales fueron obtenidos usando el protocolo 0280-18M-80 aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, en concordancia con la NOM-062-ZOO-1999 basada en la guía del uso y cuidado de animales de laboratorio. Los hámsteres fueron anestesiados con pentobarbitol sódico (Anestosal) a una dosis de 4.72 mg por cada 100 g de peso. Cada hámster fue sangrado por punción cardiaca y las córneas fueron recuperadas. Las córneas se colocaron en cajas de 96 pozos (Corning, NY) y co-cultivadas por 6 h con *A. castellanii* ( $1 \times 10^6$  trofozoítos) previamente interaccionadas con *E. coli* HS o EHEC en medio D-MEM sin SFB. Después del tiempo de interacción, las córneas fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS por 48 h. Se procesaron para su inclusión en parafina y posteriormente fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Las muestras se observaron por microscopía de luz (Optiphot; Nikon, Japón).

## 8. Resultados

### ***E. coli* HS y EHEC se internalizan en *A. castellanii* posterior a 3 horas de co-cultivo**

Se estableció un co-cultivo entre *A. castellanii* y EHEC a una MOI de 100 por 15, 30, 60, 120 y 180 min. Después de los tiempos de interacción, se realizó un ensayo de exclusión por gentamicina (200 µg/ml). Brevemente, se eliminaron las bacterias extracelulares con gentamicina y luego las amibas se lisaron a las amibas para liberar a las bacterias que sobrevivieron a la fagocitosis amibiana. El lisado fue plaqueado para cuantificar a las bacterias internalizadas. En estos ensayos se observó que EHEC se internaliza y sobrevive dentro de la amiba a partir de las 3 h de co-cultivo mientras que *E. coli* HS se empieza a internalizar a tiempos más tempranos, 60 min. Es probable que la cepa no patógena sea más susceptible a la degradación por las amibas, ya que, aunque aumentó el número de bacterias recuperadas a lo largo de los tiempos de co-cultivo, también, se cuantificaron menos UFC que EHEC a las 3 horas de co-interacción (Figura 6). De igual manera, en ensayos de microscopía confocal, usando bacterias que expresan la proteína roja fluorescente, se pudo observar tanto a EHEC como *E. coli* HS internalizadas en *A. castellanii* a partir de las 3 horas de interacción (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) detectándose una menor internalización de *E. coli* HS en relación a EHEC. Estos resultados sugieren que tanto la cepa no virulenta como la patógena pueden internalizarse en *A. castellanii* a partir de las 3 horas de co-cultivo, sin embargo, ambas bacterias no sobreviven de la misma manera dentro de ella.

### **El co-cultivo de *A. castellanii* con *E. coli* HS y EHEC no afecta la viabilidad, pero sí la adherencia de las amibas**

Durante las interacciones de *A. castellanii* con las dos cepas de *E. coli* se observó que conforme aumentó el tiempo de interacción, las amibas se despegaron de los pozos de cultivo. Para cuantificar la pérdida de adherencia, tanto las amibas adheridas como las amibas despegadas se recuperaron y se cuantificaron (Figura 8-A y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.-A**). Además, la viabilidad

de las amibas se evaluó por el método de azul de tripano (Figura 8-B y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.-B**). Los resultados mostraron que las amibas interaccionadas con las dos cepas pierden adherencia a los pozos de cultivo de una manera dependiente del tiempo y que esta adherencia se ve más afectada cuando las amibas se interaccionaron con EHEC (Figura 8-A y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.-A**). A las 3 h de co-cultivo aproximadamente el 60% de las amibas interaccionadas con EHEC se despegaron mientras que solo el 38% de las amibas co-incubadas con *E. coli* HS se desprendieron. Sin embargo, la viabilidad de las amibas despegadas permaneció sin modificación

### **El co-cultivo *A. castellanii* con *E. coli* HS y EHEC afecta la distribución del citoesqueleto amibiano**

Debido a que se observaron cambios en la adhesión amibiana, se evaluaron las posibles alteraciones en el citoesqueleto amibiano por medio de microscopía confocal durante la interacción con las bacterias. Para ello se visualizaron los filamentos de actina por medio de la tinción con faloidina rodaminada y los núcleos con DAPI. Los resultados mostraron una relocalización del citoesqueleto de actina cuando las amibas fueron incubadas tanto con *E. coli* HS como con EHEC (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). De igual manera se pudo observar una acumulación de los filamentos actina en algunos puntos de la membrana amibiana en donde se visualizaron bacterias cercanas a la membrana. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual se genera este fenómeno aún es desconocido. Estos resultados sugieren que las interacciones con las bacterias causan modificaciones en el citoesqueleto que podrían explicar la pérdida de la adherencia amibiana.

### ***E. coli* HS y EHEC no sobreviven a tiempos prolongados posterior a su internalización en *A. castellanii***

Una vez establecido el co-cultivo con las bacterias, se determinó si EHEC o *E. coli* HS son capaces de multiplicarse intracelularmente en de las amibas y sobrevivir a

largo plazo dentro de los trofozoítos de *A. castellanii*. Así, las amibas se recuperaron después del co-cultivo inicial (3 h) y fueron tratadas con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. Posteriormente, fueron re-suspendidas en medio Chang sin SFB por 3, 6 y 9 horas adicionales, los lisados de los cultivos se plaquearon y cuantificaron las UFC. En estos ensayos, no se observó que ninguna formación de colonias de *E. coli* a las 9 h (Figura 11).

Sin embargo, EHEC pudo sobrevivir más tiempo dentro de *A. castellanii*, hasta 6 horas más posterior a las 3 horas iniciales de co-cultivo mientras que *E. coli* HS no puede sobrevivir más de 3 horas posterior a la interacción inicial. Estos resultados indican que ninguna de las dos cepas es capaz de mantenerse internalizada por largos periodos de tiempo para generar un endosimbionte estable. Sin embargo, es posible que el co-cultivo produzca cambios en la virulencia de la amiba, por lo que se prosiguió a evaluar las alteraciones en virulencia producidas en *A. castellanii* después de las 3 horas de co-cultivo con las bacterias.

### **La interacción entre EHEC y *A. castellanii* causa alteraciones morfológicas en la ultraestructura de las amibas**

Se analizaron los cambios ultraestructurales de las amibas posterior al co-cultivo a una MOI de 100 a 1.5 y 3 horas con EHEC. Los resultados indicaron que existen cambios evidentes en la morfología amibiana desde 1.5 horas de interacción. En la MET (Figura 12) se pudo observar la morfología típica de *A. castellanii*, es decir sin alteraciones causadas por EHEC (Figura 12-A). En algunos trofozoítos se pudieron observar las mitocondrias sin cambios aparentes (Figura 12-B). Es importante señalar que se pudieron observar la presencia de gotas lipídicas (Figura 12-C). En la figura 13-A se muestra una amiba sin interaccionar con EHEC (control). A las 3 horas de co-cultivo se aprecian bacterias internalizadas dentro de las amibas (Figura 13-B). De igual manera, se identificaron a algunas mitocondrias rodeadas de retículo endoplásmico rugoso e incluso algunas con una doble membrana (Figura 13-C). Además, se pueden observar áreas electrón-densas en los puntos de contacto de las bacterias con la membrana amibiana, indicando un posible re-arreglo del citoesqueleto en las áreas de contacto con las bacterias (Figura 13-D).

### **La interacción entre *E. coli* HS y *A. castellanii* causa alteraciones en la ultraestructura amibiana**

De igual manera se estudiaron los cambios ultraestructurales en *A. castellanii* expuesta a la cepa no patógena *E. coli* HS. A las 1.5 h de interacción se observó que las mitocondrias no presentaron alteraciones importantes, se observaron varias bacterias internalizadas (Figura 14-A). A mayor aumento se observó la presencia de algunas gotas lipídicas (Figura 14-B) semejante a los co-cultivos con EHEC. Las amibas también presentaron zonas de contactos entre *E. coli* HS y *A. castellanii* a las 3 horas de co-cultivo; sin embargo, estas zonas no presentaron densidad electrónica como en las zonas de contactos con EHEC (Figura 14-C).

En el caso de *E. coli* HS se pudieron apreciar bacterias internalizadas desde las 1.5 (Figura 14-A) y hasta las 3 h de co-cultivo (Figura 15-A). Posterior a las 3 h de co-cultivo, a mayor aumento, no se observaron cambios en las mitocondrias y en el citoplasma amibiano (Figura 15-B). Es importante mencionar que las bacterias *E. coli* HS parecen encontrarse en vacuolas mientras que cuando EHEC es internalizada se encuentra libre en el citoplasma.

Al comparar los dos co-cultivos se pudo determinar que ambas bacterias son internalizadas dentro de *A. castellanii*, sin embargo, *E. coli* HS presenta una mayor internalización que EHEC a las 1.5 h de manera similar a los resultados de plaqueo. De igual manera, tanto en el ensayo de plaqueo como en la MET se observó la internalización de EHEC a las 3 h de co-cultivo.

### **Existen cambios en el perfil proteico de los extractos totales y medios condicionados de *A. castellanii* en co-cultivo con *E. coli* HS y EHEC**

Después de observar los cambios ultraestructurales en las amibas, se realizó un gel SDS-PAGE al 10% para determinar si pudieran existir cambios en la expresión proteica de las amibas a causa del co-cultivo con las bacterias. Se observaron algunos cambios sutiles en la expresión de proteínas de los extractos totales entre los cuales destacan en el caso de *E. coli* HS la aparición de bandas que aparecen

alrededor de un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. En el extracto total amibiano en co-cultivo con EHEC parece existir la aparición de proteínas de pesos moleculares de alrededor de 150 kDa y, adicionalmente, posiblemente también exista la pérdida de bandas de aproximadamente 90, 80 y 75 kDa (Figura 16-A). Sin embargo los cambios no son tan marcados y sería necesario realizar ensayos de geles en 2 dimensiones para asegurar cambios en la expresión proteica.

En el caso de los medios condicionados, de se pueden observar cambios más evidentes en los productos de secreción de *A. castellanii* en co-cultivo con EHEC y en las interaccionadas con *E. coli* HS. Cuando *A. castellanii*, es co-cultivada con *E. coli* HS se observó una disminución en la expresión de una proteína de 150 kDa y otra de 37 kDa. Por otro lado, en *A. castellanii* co-cultivada con EHEC se observó la aparición de una banda de 150 kDa y el aumento de bandas de 80, 50 y 20 kDa (Figura 16-B).

### **El co-cultivo de *A. castellanii* con EHEC y *E. coli* HS modifica la actividad proteolítica amibiana**

Se evaluaron los cambios en el perfil proteolítico de las amibas en co-cultivo con las bacterias por medio de zimogramas. En el caso de los extractos totales, cuando fueron tratados sin inhibidores de proteasas se pudo observar una disminución en la actividad proteolítica de *A. castellanii* con EHEC, mientras que con *E. coli* HS pareció ser similar al control (amibas sin interaccionar) (Figura 17 y Figura 19); Al utilizar inhibidores de proteasas, se determinó que todos los cultivos de *A. castellanii* contienen una mayor cantidad de serina proteasas, ya que su actividad fue casi totalmente inhibida con PMSF, mientras que con E-64 y EDTA no presento cambios notables de actividad (Figura 17 y Figura 19). En los productos de secreción la actividad de EHEC fue similar al control (amibas sin interaccionar), mientras que se observó una disminución cuando los trofozoítos fueron interaccionados con *E. coli* HS. Al igual que para los extractos totales, la actividad proteolítica se inhibió con PMSF, pero no con E-64 o EDTA.

Para cuantificar la actividad proteolítica se utilizó el método de degradación de Azocoll, observándose de igual manera una disminución significativa en la

actividad proteolítica del extracto total y de los productos de secreción de las amibas co-cultivada con *E. coli* HS (Figura 18 y Figura 20). Cuando se analizó la interacción con EHEC de ambas muestras, se observó una disminución en la actividad proteolítica únicamente en los extractos totales, mientras que en los productos de secreción fueron similares al control (Figura 18 y Figura 20).

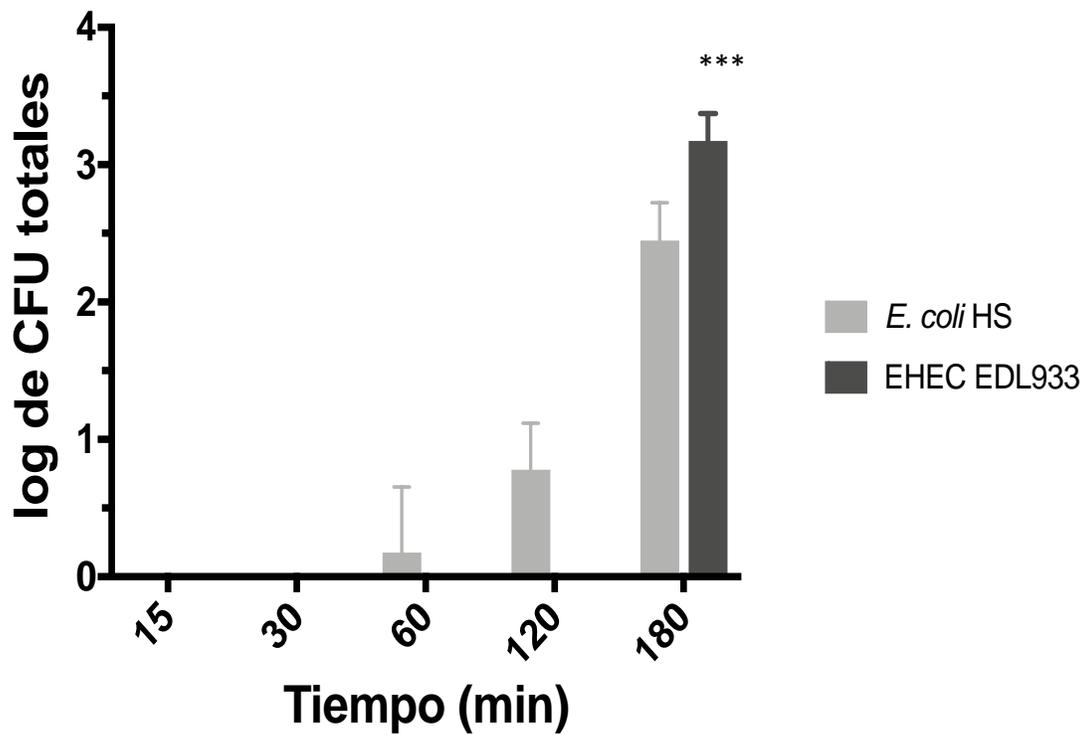
### **El efector de EHEC, TIR no se encontró en los trofozoítos de *A. castellanii* a las 3 h de co-cultivo ni en los productos de secreción**

Debido a los cambios presentados en los perfiles proteicos de las amibas, se realizó un WB para detectar la presencia de una las principales proteínas efectoras de EHEC, TIR, dentro de *A. castellanii*. Los ensayos se realizaron tanto en extractos totales como en los productos de secreción de las amibas previamente interaccionadas con EHEC. En ninguna de las muestras provenientes de la interacción se detectó a TIR, mientras que en los cultivos lisados de EHEC cultivadas solas y en los sobrenadantes el anticuerpo policlonal específico identificó a la proteína TIR; aunque también detectó algunas proteínas inespecíficas de bajo peso molecular (Figura 21). Esto sugiere que EHEC es capaz de producir y secretar a TIR; sin embargo, la proteína no fue detectada en las amibas co-cultivadas con EHEC. Lo anterior indica que es probable que los cambios en el citoesqueleto no se deban en su totalidad a la inyección de proteínas bacterianas modificadoras de la síntesis de actina en la amiba. La disminución en la adherencia y en la reorganización del citoesqueleto puede deberse a múltiples mecanismos bioquímicos, hasta ahora desconocidos, que inicia *A. castellanii* al detectar a *E. coli* cuando interacciona con su membrana. Sin embargo, también es posible que la técnica no sea lo suficientemente sensible para detectar a la proteína en los co-cultivos con las amibas. Adicionalmente este resultado sugiere fuertemente que los cambios en los perfiles proteicos de secreción pertenecen a productos amibianos ya que proteínas bacterianas como TIR no fueron detectadas en el WB.

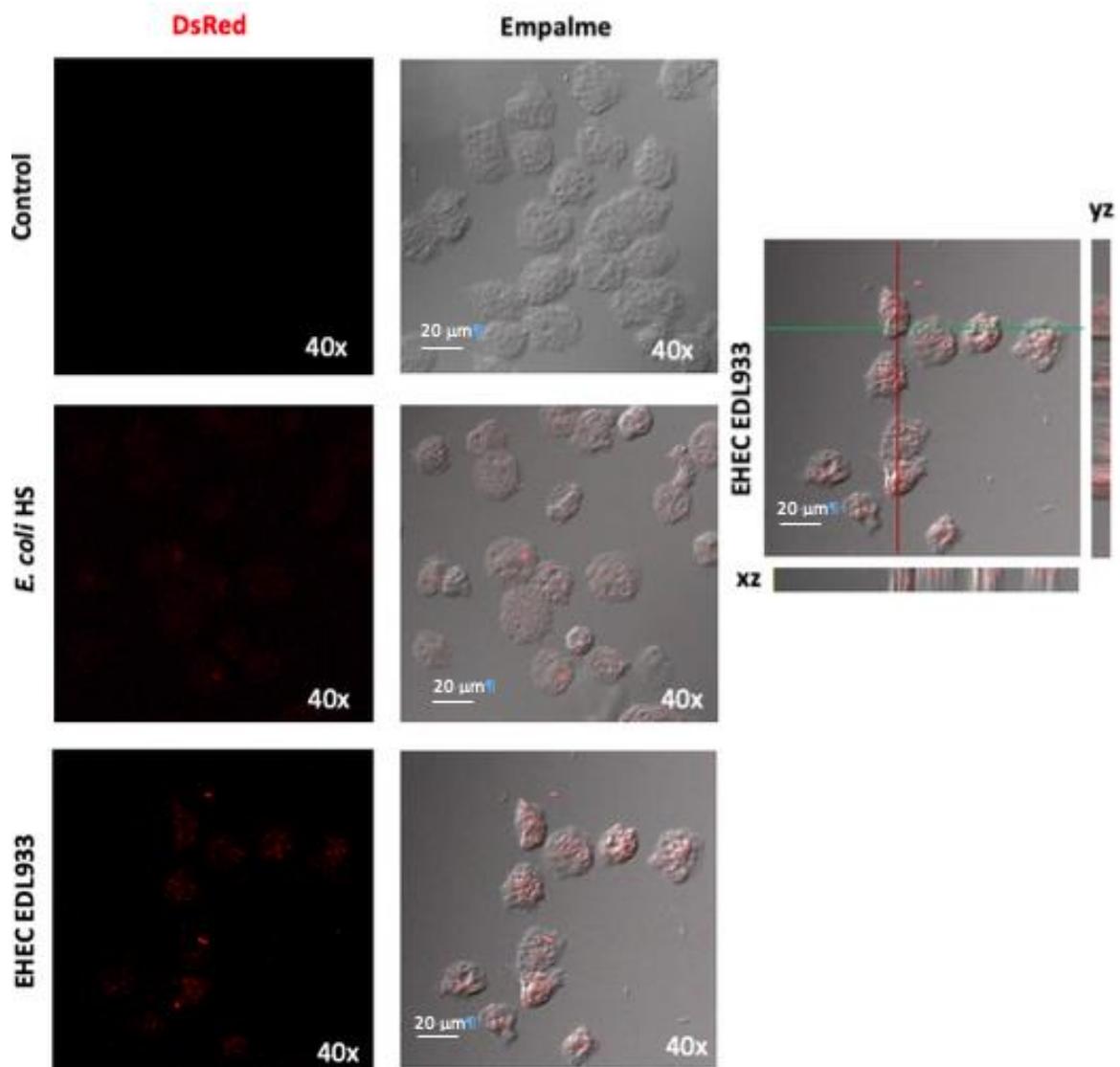
### ***A. castellanii* posterior al co-cultivo con EHEC genera mayor daño en la córnea**

Para conocer si el daño a la córnea se puede exacerbar con el co-cultivo con las bacterias *E. coli* HS y EHEC, se realizaron ensayos sobre córneas extraídas de hámsteres machos para determinar los cambios en la virulencia de la amiba sobre este órgano. Las córneas fueron infectadas con *E. coli* HS, EHEC o *A. castellanii* solas como controles y con las amibas previamente co-incubadas con *E. coli* HS y con EHEC en medio MEM. Los resultados mostraron que los daños causados por las amibas fueron mayores en las córneas cuando se utilizaron trofozoítos de *A. castellanii* previamente co-cultivadas con EHEC. El daño se caracterizó por la desorganización del epitelio corneal con desprendimiento intercelular y pérdida de la membrana de Bowman (Figura 22-F).

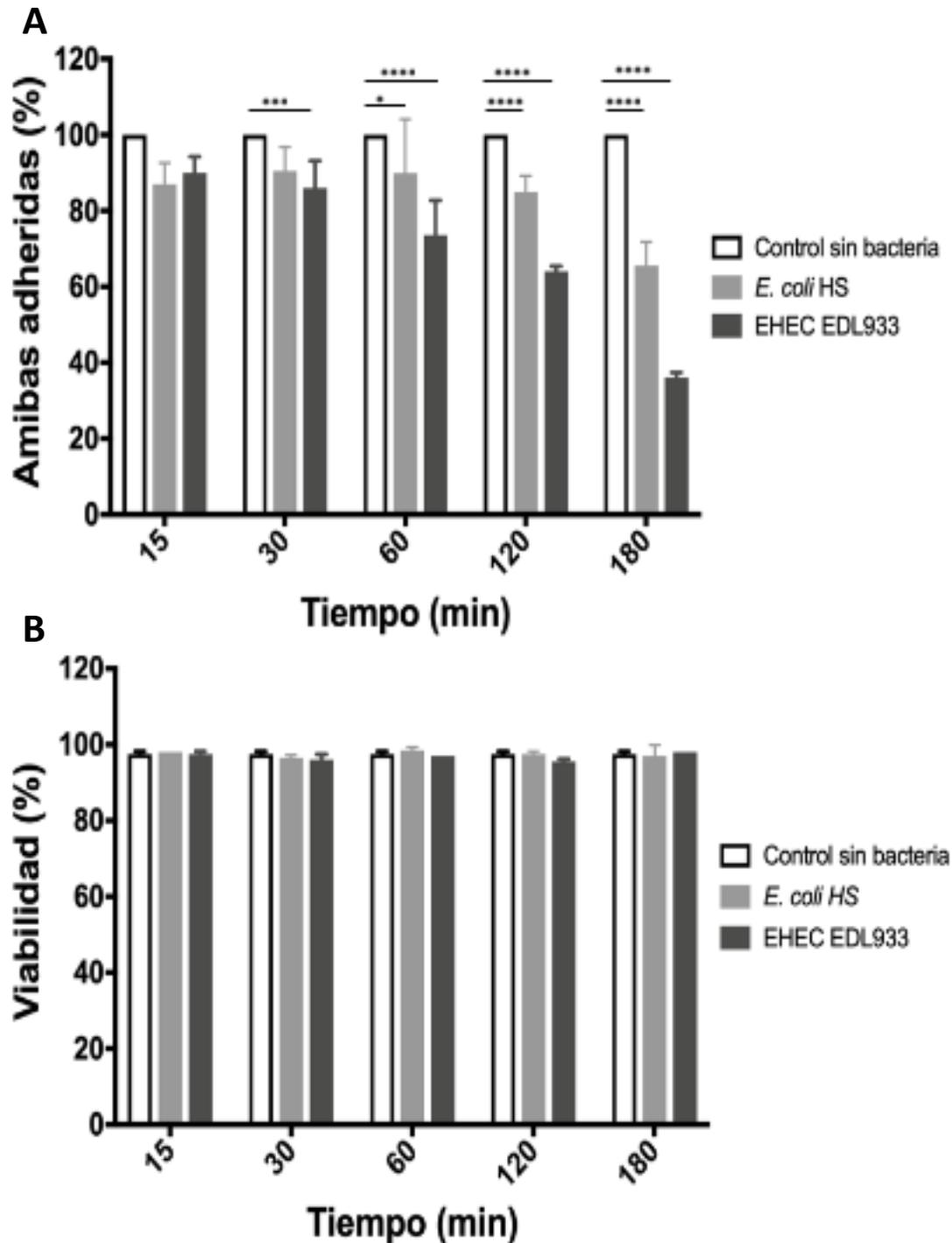
A las 10 horas de interacción se puede observar que en la co-incubación con *A. castellanii* sin previa interacción con las bacterias existe una desorganización de las capas de la córnea observándose algunas amibas en las capas más profundas del epitelio corneal (Figura 22-B); las amibas se pudieron identificar por sus acantópodos característicos. Por otro lado, la bacteria EHEC sola también causó un daño al epitelio corneal. Se visualizó un estroma más laxo y la apertura de espacios entre las células indicando daño al tejido. A diferencia de EHEC, *E. coli* HS sola no generó un daño sobre la córnea y las amibas co-cultivadas con *E. coli* HS generaron un daño más superficial en el epitelio (Figura 22-E). Sin embargo, el daño más notorio se observó en las córneas co-cultivadas con *A. castellanii* interaccionada con EHEC. En este caso, además de una desorganización en las capas de la córnea se puede observar un daño más severo caracterizado por el desprendimiento total del estroma (Figura 22-F). A partir de este resultado, se puede determinar que el co-cultivo con la bacteria EHEC aumenta la capacidad de la amiba para producir daño a la córnea, incrementándose la virulencia de *A. castellanii*. Con estos resultados se puede concluir que en los casos humanos de QA se pueden incrementar en asociación con otros microorganismos como es el caso de EHEC.



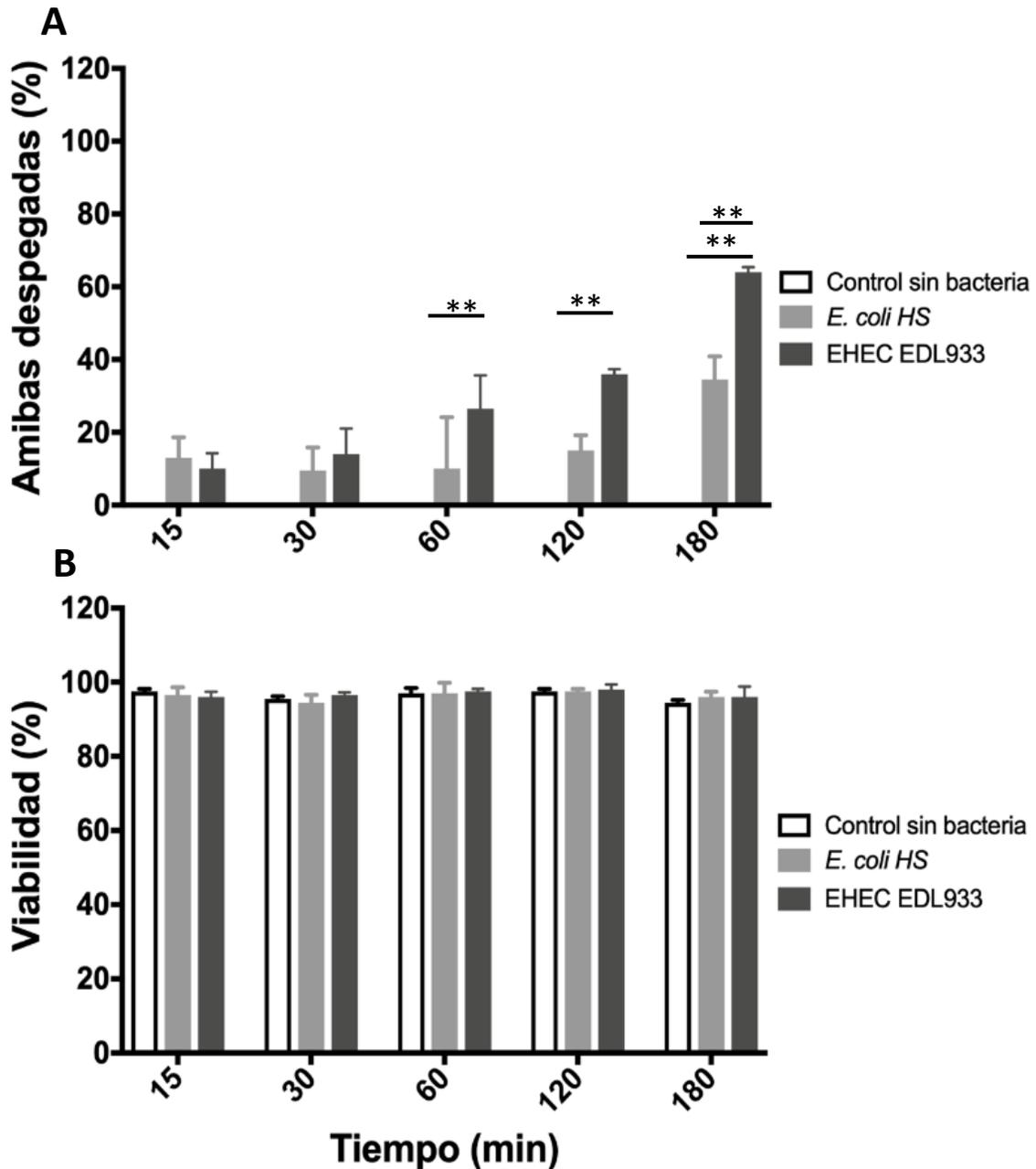
**Figura 9.** Bacterias internalizadas a partir de los co-cultivos de *A. castellanii* con *E. coli*. Se muestran las bacterias obtenidas a diferentes tiempos de co-cultivo con EHEC (gris oscuro) y *E. coli* HS (gris claro) a una MOI de 100. Existe internalización de *E. coli* HS a partir de los 60 min y de EHEC a partir de los 180 min. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías (\*\*p<0.0001).



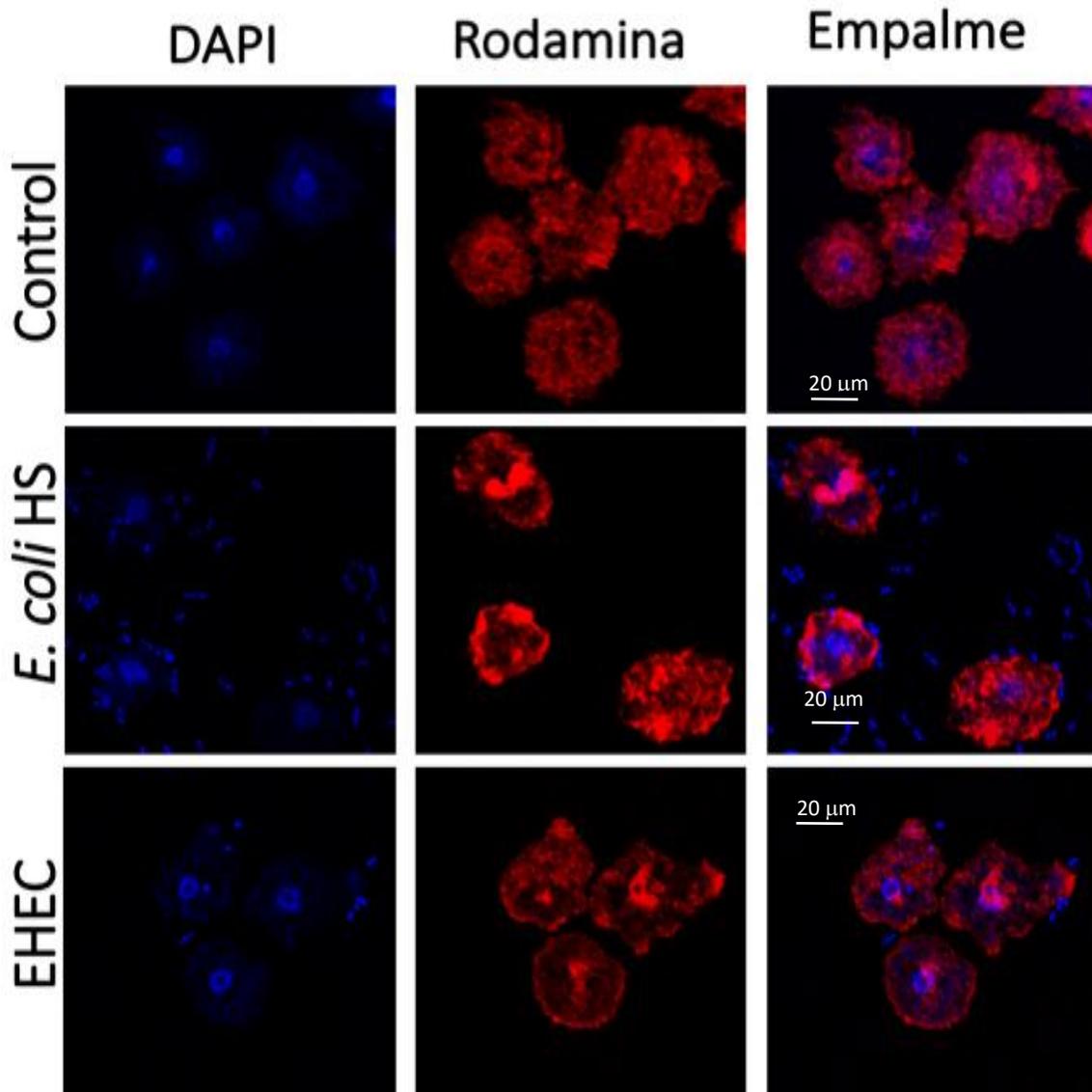
**Figura 10.** Internalización de *E. coli* en *A. castellanii*. Se observan a las bacterias transformadas con la proteína roja fluorescente dentro de la ameba a las 3 h de interacción utilizando una MOI de 100. Los cortes en yz y xz confirman la internalización de EHEC en *A. castellanii*. Se puede observar una menor internalización de *E. coli* HS a comparación del co-cultivo con EHEC. Barra de escala= 20  $\mu\text{m}$ .



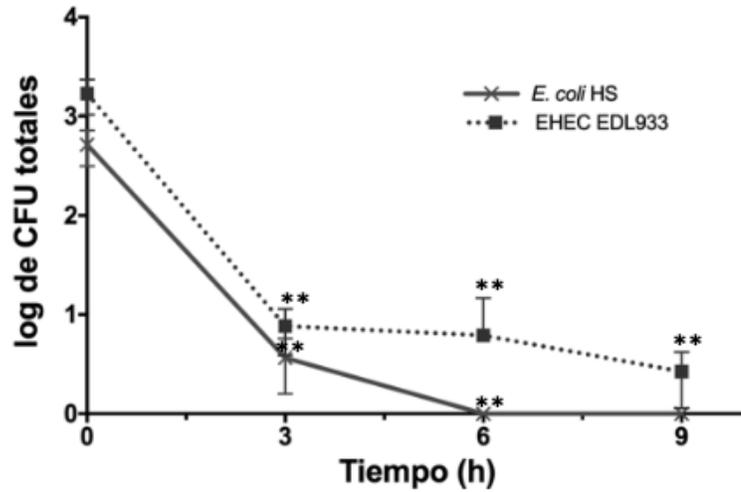
**Figura 12.** Viabilidad de *A. castellanii* adheridas en co-cultivo con *E. coli*. **(A)** *A. castellanii* co-cultivada con EHEC (gris oscuro) y con *E. coli* HS (gris claro). Se cuantificaron las amibas adheridas por medio de conteos en cámara de Neubauer. Se observó una disminución significativa del número de amibas adheridas con respecto a *A. castellanii* sin interaccionar (blanco). **(B)** Se cuantificó la viabilidad de *A. castellanii* en co-cultivo por el método de azul de tripano. Las viabilidad de la amiba permanece sin cambios y arriba del 90% en todos los casos. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías (\*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ).



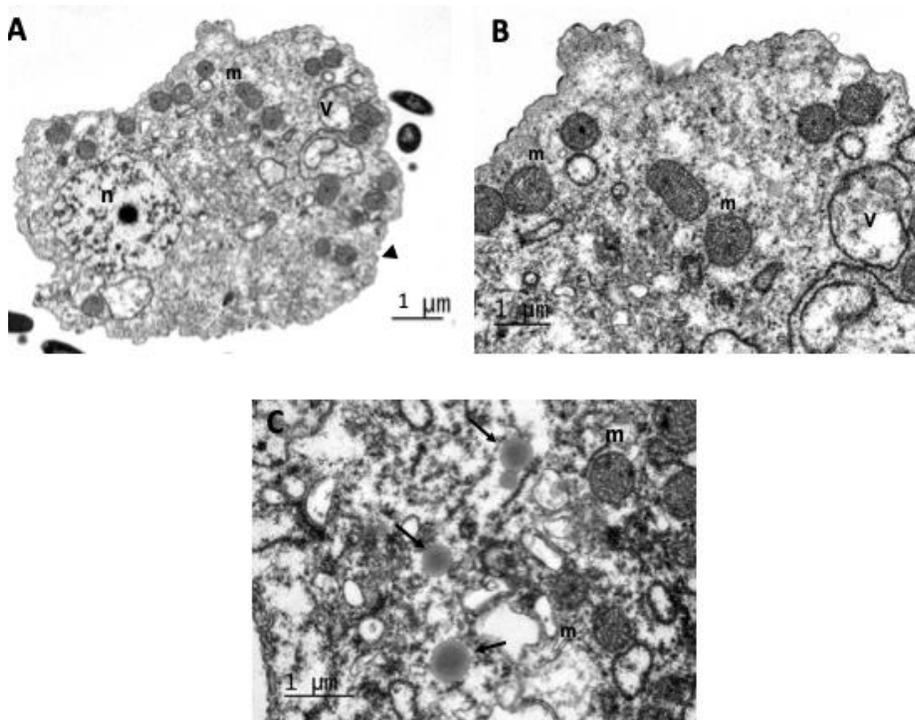
**Figura 13.** Porcentaje y viabilidad de *A. castellanii* despegados a diferentes tiempos de co-cultivo con *E. coli*. **(A)** *A. castellanii* fue co-cultivada con EHEC (gris oscuro) y con *E.coli* HS (gris claro) y se cuantificaron las amibas no adheridas por medio de conteos en cámara de Neubauer. El co-cultivo con EHEC (gris oscuro) y con *E.coli* HS (gris claro) generó la falta de adherencia de la amiba significativo con respecto a *A. castellanii* sin interaccionar (blanco). **(B)** Se cuantificó la viabilidad de *A. castellanii* despegadas en co-cultivo con las bacterias por el método de exclusión de azul de tripano. Se observó que la viabilidad amibiana permaneció sin cambios y arriba del 90% en todos los casos. El análisis estadístico fue realizado con un ANOVA de dos vías (\*\*\*) $p < 0.001$ .



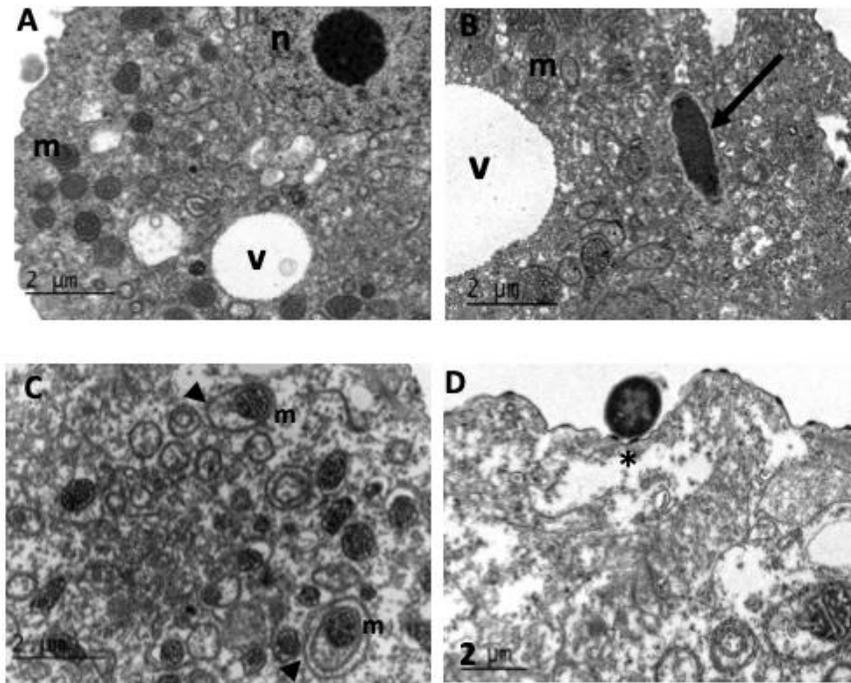
**Figura 15.** Localización de filamentos de actina. Se puede observar a los filamentos de actina amibiana teñidos con faloidina rodaminada (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) de *A. castellanii* después del co-cultivo con EHEC y con *E. coli* HS. Se determinó que existen modificaciones en la distribución de los filamentactina a causa de los co-cultivos con *E. coli* HS y con EHEC. Barra= 20  $\mu\text{m}$  . Las flechas blancas indican contactos entre la bacteria y la membrana amibiana.



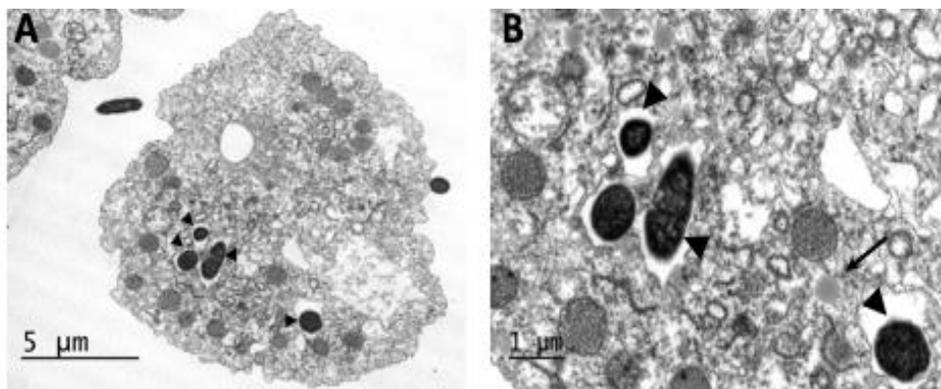
**Figura 16.** Sobrevivencia de cepas de *E. coli* dentro de *A. castellanii*. Posterior al co-cultivo inicial, el número de bacterias viables recuperadas de los trofozoítos decayó drásticamente. Ninguna de las bacterias sobrevivió más de 9 horas adentro de las amibas. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de dos vías (\*\* $p < 0.01$ ).



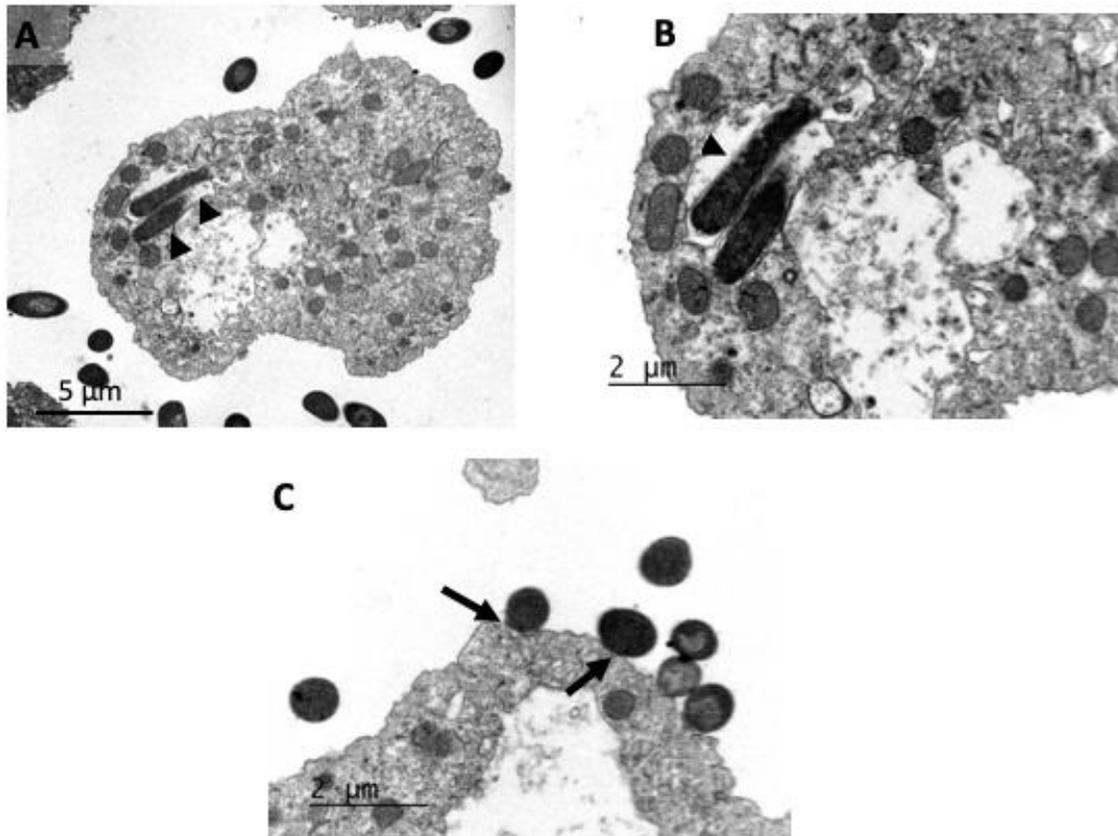
**Figura 17.** Microscopía electrónica de transmisión (MET) de *A. castellanii* interaccionada con EHEC por 1.5 h. **(A)** En los trofozoítos co-cultivados se observaron amibas sin alteraciones morfológicas (cabeza de flecha), mitocondrias (m), vacuola (v) y un núcleo característico (n). Barra= 2 µm. **(B)** Se observaron las mitocondrias de las amibas sin daño (m). Barra = 1 µm. **(C)** Se presentaron gotas lipídicas en *A. castellanii* debido a la interacción con EHEC (flechas). Barra = 1 µm.



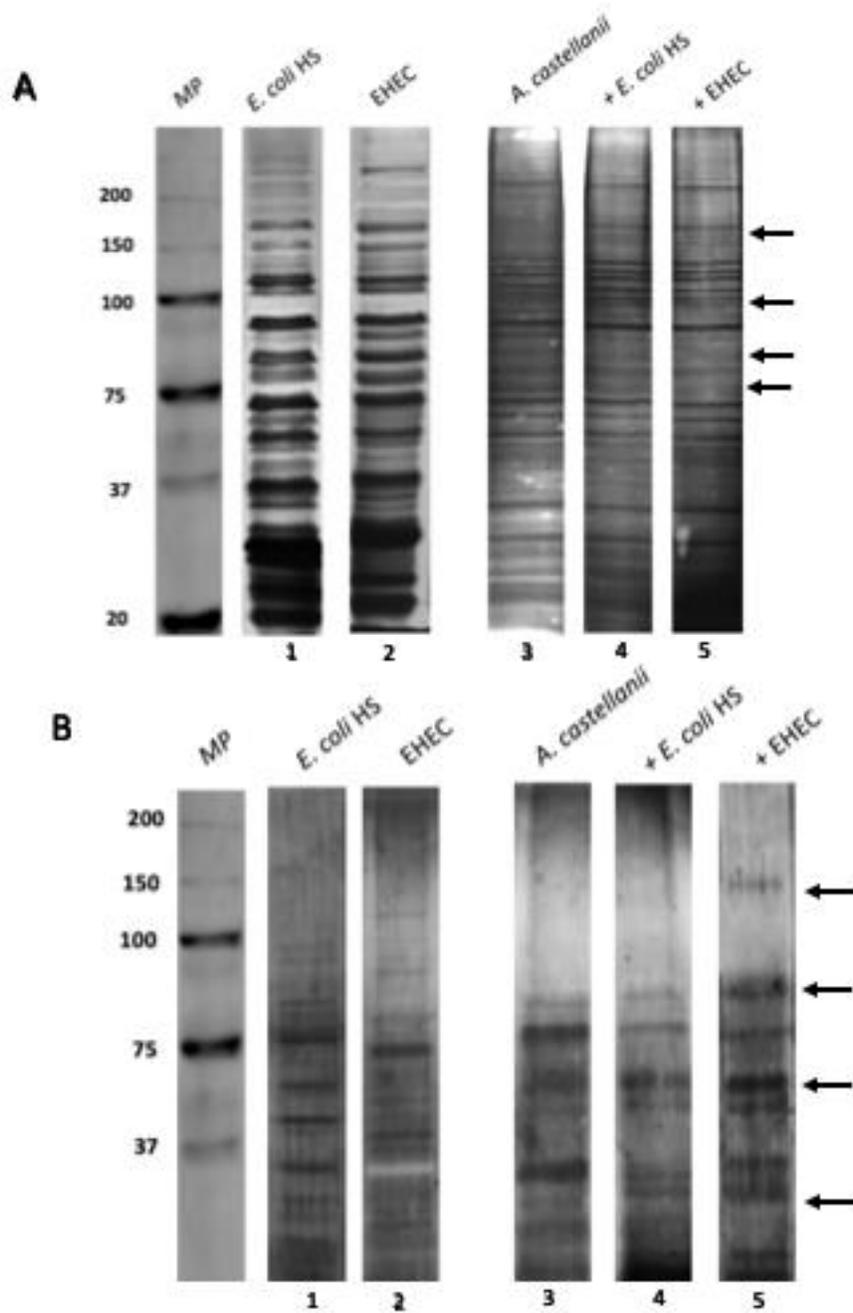
**Figura 18.** Microscopía electrónica de transmisión (MET) de *A. castellanii* interaccionada con EHEC por 3 h. **(A)** *A. castellanii* sin interacción (control). Se observa a la amiba sin alteraciones en su membrana ni sus organelos citoplasmáticos, presenta un núcleo típico (n), mitocondrias (m) y vacuolas (v). **(B)** Bacterias internalizadas en *A. castellanii* co-cultivada con EHEC (flecha). **(C)** Mitocondrias rodeadas de retículo endoplásmico rugoso (cabezas de flecha) en *A. castellanii* posterior al co-cultivo con EHEC. **(D)** Se observan zonas electrón-densas en los contactos entre amiba-bacteria (asteriscos). Barra= 2 µm.



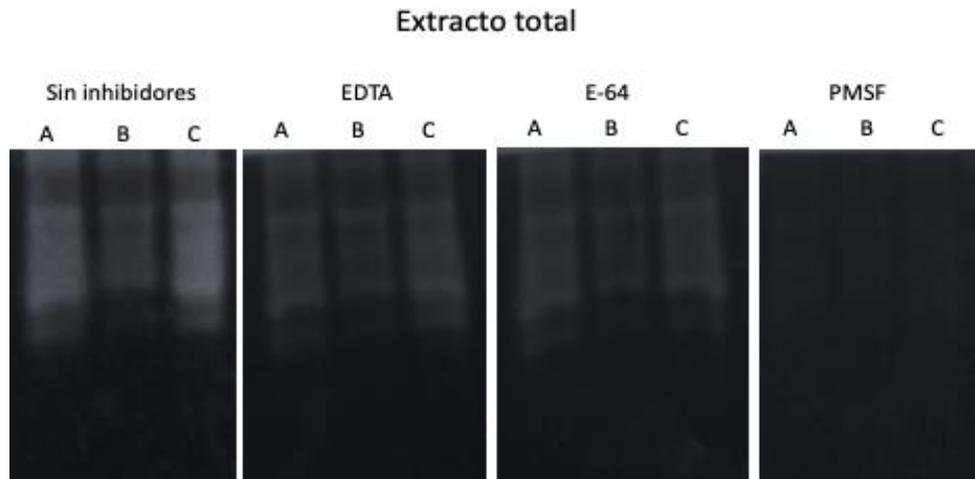
**Figura 19.** Microscopía electrónica de transmisión (MET) de *A. castellanii* interaccionada con *E. coli* HS por 1.5 h. **(A)** Se pueden observar varias bacterias internalizadas en la amiba (cabezas de flecha). Barra = 5 µm **(B)** A un mayor aumento se puede observar que *E. coli* HS se encuentra dentro de vacuolas (cabezas de flecha) y la presencia de gotas lipídicas (flecha). Barra de escala = 1 µm



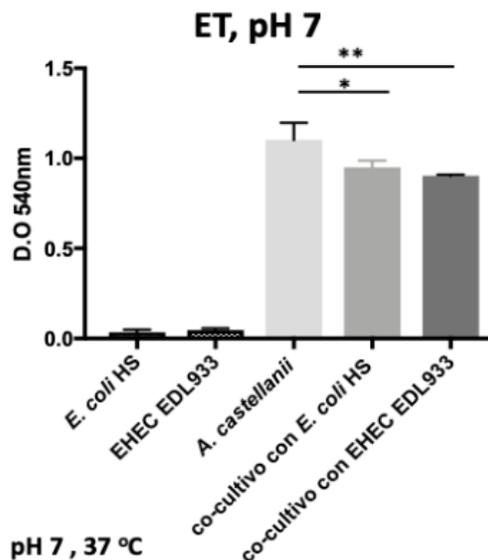
**Figura 20.** Microscopía electrónica de transmisión (MET) de *A. castellanii* interaccionada con *E. coli* HS por 3 h. **(A)** Se observan bacterias internalizadas en vacuolas (cabeza de flecha). Barra = 5 µm. **(B)** A un mayor aumento también se observaron las bacterias internalizadas (cabeza de flecha). Barra= 2 µm. **(C)** En otra amiba, se apreciaron zonas de contacto entre amiba y bacteria (flechas). Sin embargo, no se observan zonas electrón-densas a diferencia del co-cultivo con EHEC. Barra= 2 µm.



**Figura 21. (A)** Perfil proteico de los extractos totales. **(B)** Perfil proteico de los medios condicionados de *A. castellanii*. Amibas sin interactuar (carril 4), en co-cultivo con *E. coli* HS (carril 5) y con EHEC (carril 6). Los extractos totales (A) y productos secretados (B) de las bacterias fueron incluidos como controles adicionales (carril 1 y 2). Los cambios aparentes se encuentran marcados por flechas y se encuentran en los pesos aproximados de 150, 100 y 80 KDa para los extractos totales y de 100, 85 y 20 KDa para las productos secretados.

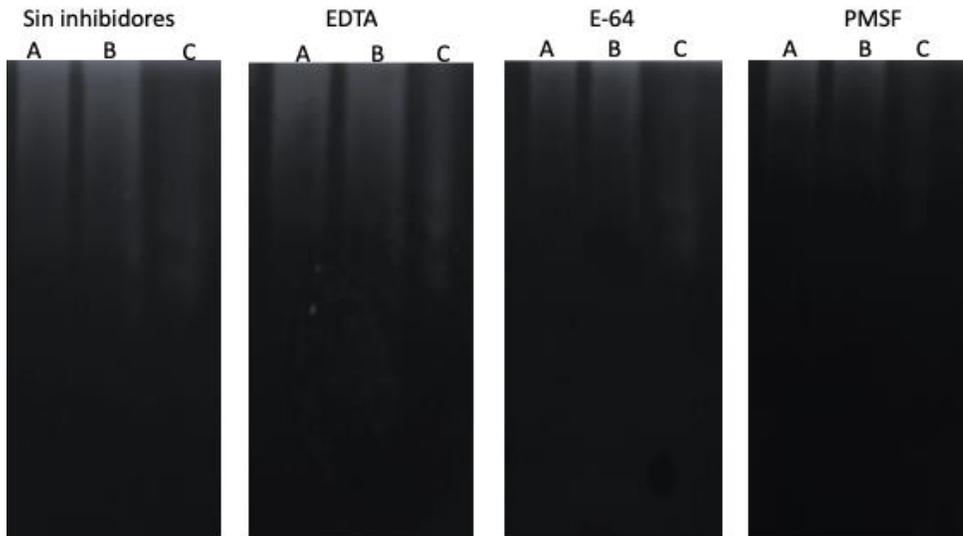


**Figura 22.** Perfiles proteolíticos de los extractos totales de *A. castellanii*. (Carril A) Ambas sin interactuar, (Carril B) interaccionadas con con EHEC, y (Carril C) interaccionadas con *E. coli* HS. Las muestras fueron incubadas con inhibidores de metaloproteasas (EDTA), cisteína proteasas (E-64) y serina proteasas (PMSF). Las proteasas fueron activadas a un pH de 7 y 37°C. Se observó una inhibición casi total de la actividad proteolítica con el inhibidor de serina proteasas y una leve disminución en la expresión de proteasas cuando la *A. castellanii* fue interaccionada con EHEC y con *E. coli* HS.

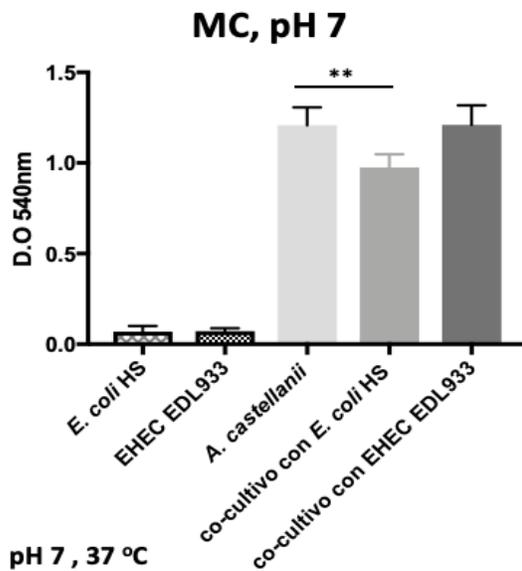


**Figura 23.** Ensayos de Azocoll de los extractos totales de *A. castellanii* sin interactuar (gris claro), interaccionadas con *E. coli* HS (gris) y con EHEC (gris oscuro). Las muestras fueron incubadas a pH de 7 y a 37°C. Los extractos totales de las bacterias fueron utilizados como controles adicionales (relleno con patrón). El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía (\*\*p<0.01, \*p<0.05). Se observó una disminución en la actividad proteolítica de *A. castellanii* interaccionada con tanto con EHEC como con *E. coli* HS.

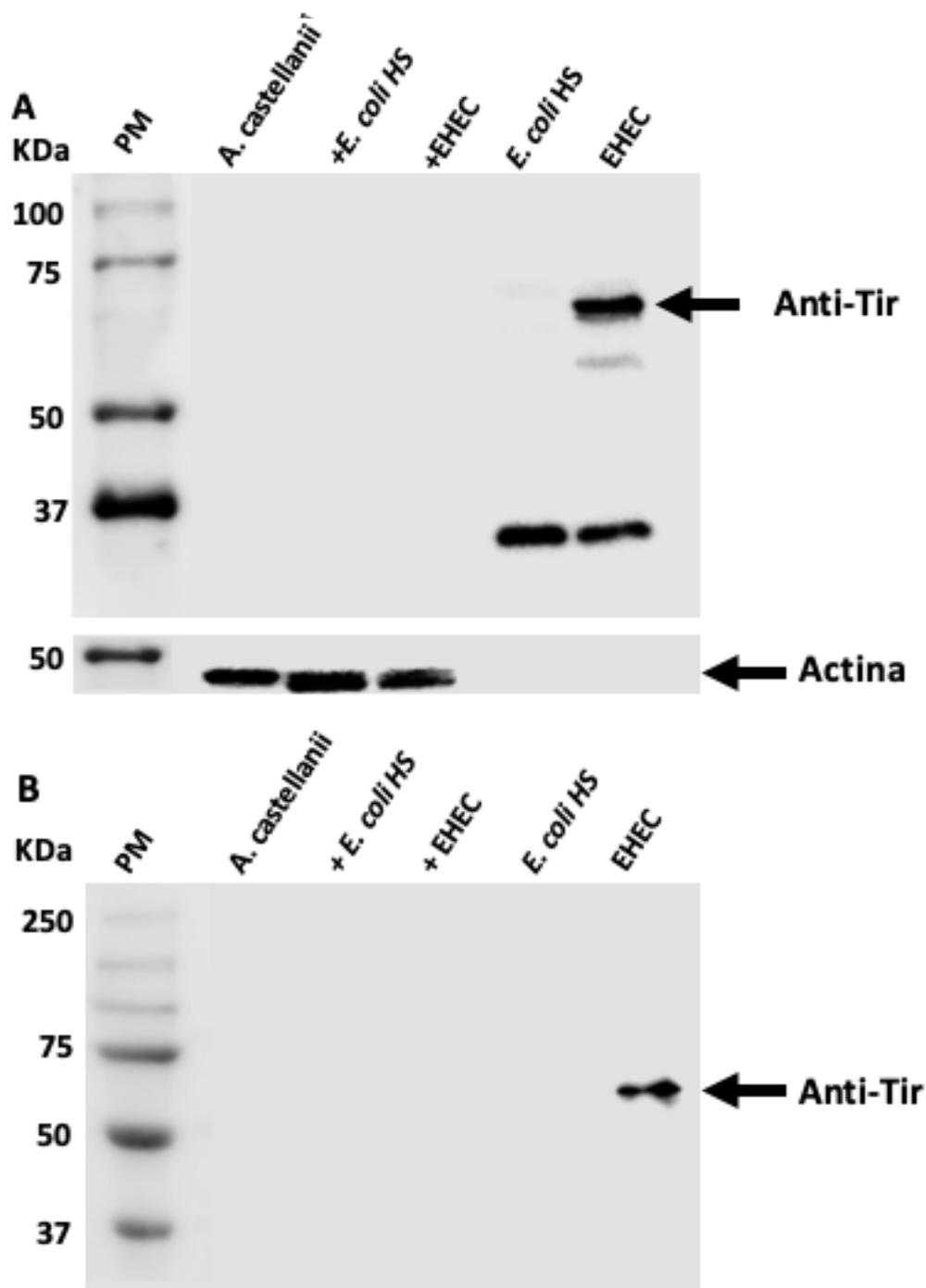
### Medio condicionado



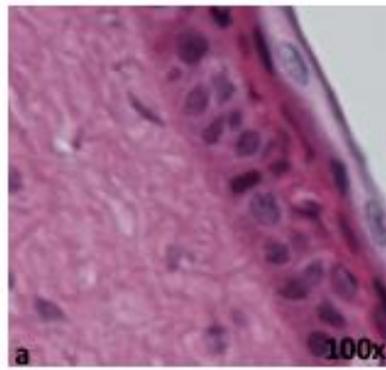
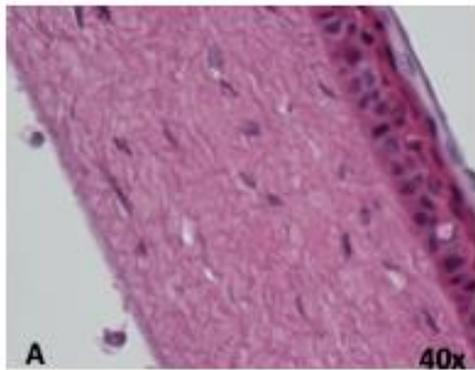
**Figura 24.** Perfiles proteolíticos de los productos de secreción de *A. castellanii*. (Carril A) Amibas sin interactuar, (Carril B) interaccionadas con EHEC y (Carril C) interaccionadas con *E. coli* HS (C). Las muestras fueron incubadas con inhibidores de metaloproteasas (EDTA), cisteín proteasas (E-64) y serin proteasas (PMSF). Las protasas fueron activadas a un a pH de 7 y 37°C. Se observó una inhibición casi total de la actividad proteolítica con el inhibidor de serin proteasas y una leve disminución en la expresión de proteasas cuando la *A. castellanii* fue interaccionada con *E. coli* HS.



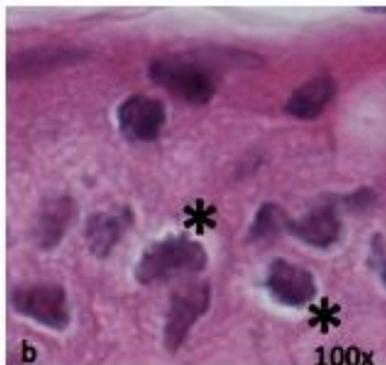
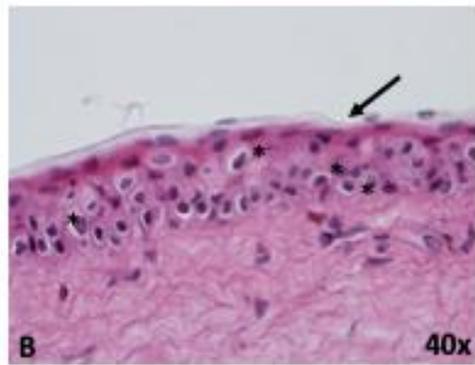
**Figura 25.** Ensayos de Azocoll de los productos de secreción de *A. castellanii* sin interactuar (gris claro), interaccionadas con *E. coli* HS (gris) y con EHEC (gris oscuro). Las muestras fueron incubadas a pH de 7 y a 37°C. Los productos de secreción bacteriana fueron utilizados como controles adicionales (relleno con patrón). El análisis estadístico fue realizado con un ANOVA de una vía (\*\*p<0.01). Se observó una disminución en la actividad proteolítica de *A. castellanii* interaccionada con *E. coli* HS.



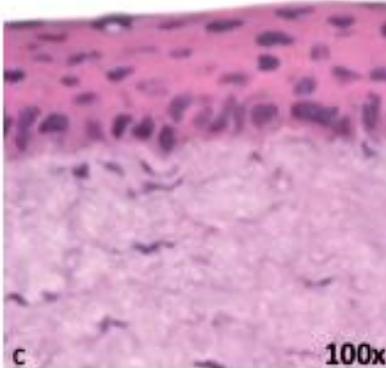
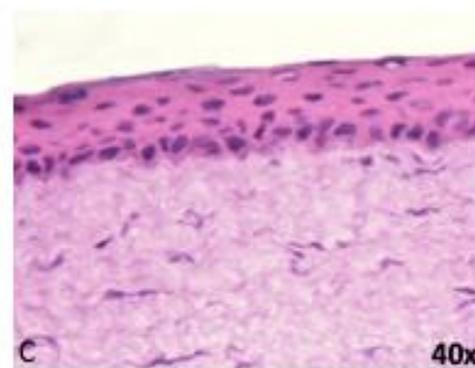
**Figura 26.** Western blot para la detección de TIR. **(A)** Extractos totales y **(B)** medios condicionados de *A. castellanii*. (Carril 1) *A. castellanii* sin interactuar, (Carril 2) interaccionadas con *E. coli* HS y (Carril 3) interaccionadas con EHEC por 3 h a una MOI de 100. Como controles adicionales se incluyeron los extractos totales (A) y medios condicionados (B) de las bacterias. (Carril 4) *E. coli* HS y (Carril 5) EHEC. No se detectó TIR en las interacciones. Se identificó únicamente en el caso del control positivo, es decir, en el extracto y productos de secreción de EHEC en el peso esperado de 71 KDa. Las bandas de bajo peso molecular corresponden al reconocimiento de otras proteínas debido a que el anticuerpo utilizado es policlonal.



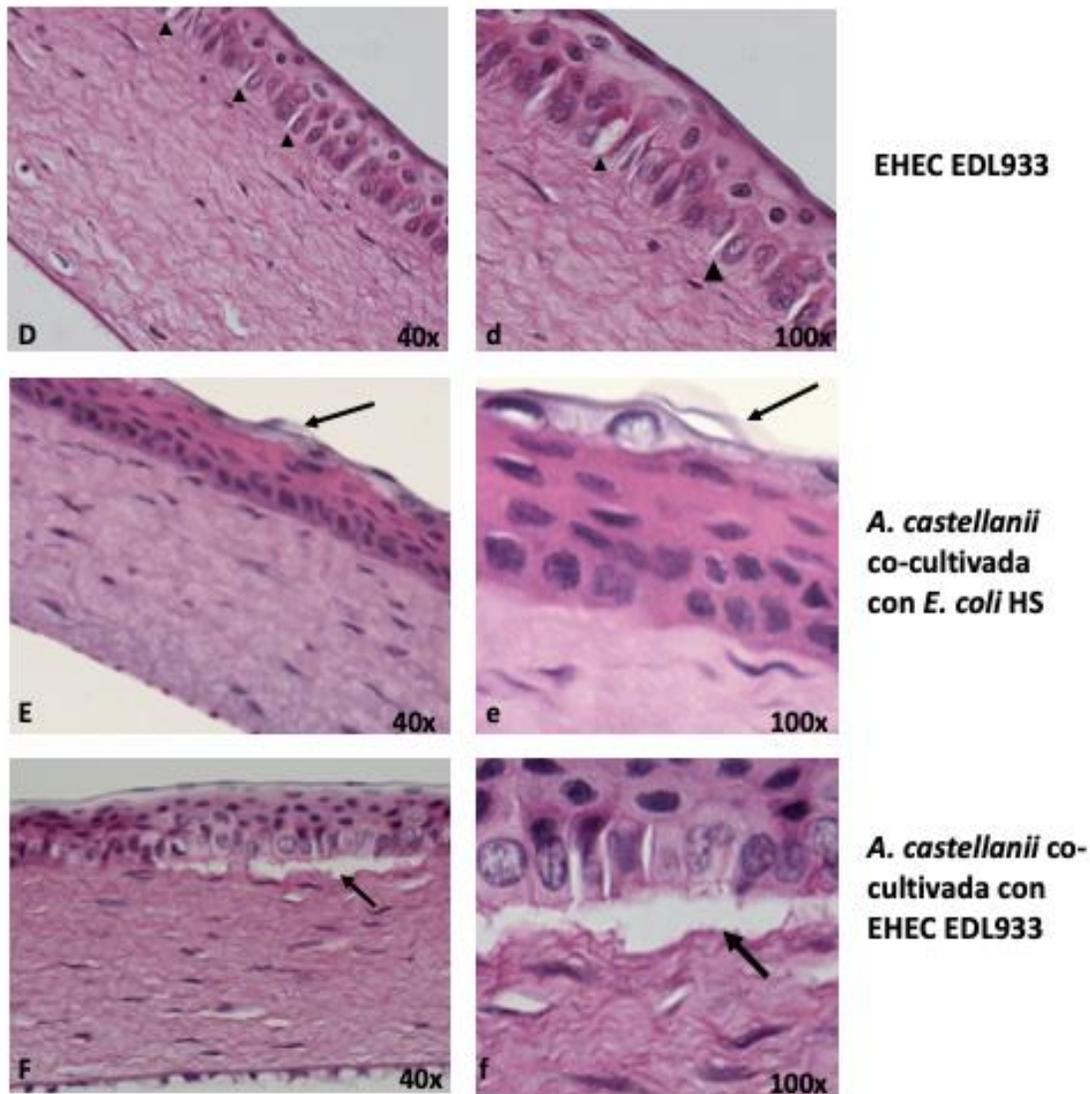
**Control**



***A. castellanii***



***E. coli* HS**



**Figura 27.** Tinción de hematoxilina y eosina de córneas de hámsteres interaccionadas con *A. castellanii*. **(A)** Córneas de hámster sin infectar (control). 40x. **(a)** A mayor aumento se observó un epitelio corneal intacto. 100x. **(B)** Córneas con *A. castellanii* sin co-cultivar con las bacterias. Se observó el desprendimiento de la capa externa (elongadas) de la córnea (flecha) y desorganización del epitelio corneal. 40x. **(b)** A mayor aumento se observaron amibas (asteriscos) entre las capas del epitelio corneal. 100x. **(C)** Córneas co-cultivadas con *E. coli* HS. 40x. **(c)** A mayor aumento no se observó ningún daño evidente en el tejido. 100x. **(D)** Córneas co-cultivadas con EHEC. Se observó la presencia de aperturas entre las células basales de la córnea (cabezas de flecha). 40x. **(d)** A mayor aumento se observó con mayor detalle la apertura entre las células basales de la córnea (cabeza de flecha). 100x. **(E)** Córneas con *A. castellanii* previamente co-cultivadas con *E. coli* HS. Se observa daño superficial en el epitelio y desprendimiento de las células elongadas de la córnea (flecha). 40x. **(e)** A mayor aumento se observó con mayor detalle el desprendimiento de las células elongadas (flecha). 100x. **(F)** Córneas de hámster con *A. castellanii* previamente co-cultivadas con EHEC. Se observa un gran daño en el epitelio corneal así como el desprendimiento entre el epitelio y el estroma (flecha). 40x. **(f)** A mayor aumento el daño es más evidente (flecha). 100x.

## 9.0 Discusión

En este trabajo se evaluaron las interacciones entre distintas cepas de *E. coli* como endocitobionte de *A. castellanii*. Se observó que tanto la cepa patógena EHEC EDL933 como la no patógena *E. coli* HS fueron capaces de internalizarse dentro de las amibas después de ser co-cultivadas por 3 h. Ninguna de las cepas estudiadas corresponden a bacterias intracelulares por lo que su internalización debió de ser mediada por la amiba. Anteriormente se reportaron co-cultivos de EHEC con *A. castellanii* en donde la bacteria fue internalizada en una proporción similar a la del presente trabajo (Chekabab *et al.*, 2013). Sin embargo, la sobrevivencia de la cepa no patógena *E. coli* HS en *A. castellanii* no había sido reportado previamente. Los mecanismos que le permiten a ambas bacterias internalizarse y sobrevivir de manera temporal dentro de las amibas permanecen desconocidos. EHEC cuenta con distintos mecanismos que le permiten sobrevivir en ambientes adversos. Éstos podrían estarse activando cuando es interaccionada con *A. castellanii*. En un estudio reciente se determinaron los cambios transcripcionales ocurridos en la bacteria enterohemorrágica una vez que fue internalizada en *A. castellanii* (Carruthers, 2010). Se identificó un amplio número de genes que se sobre-expresaron incluyendo algunos involucrados en la virulencia y otros que participan en la sobrevivencia a estrés oxidativo (Carruthers, 2010). Por ejemplo, se encontraron sobre-expresados los genes que codifican para la enzima superóxido dismutasa, adicionalmente también se incrementó la expresión de genes de respuesta al daño de DNA bacteriano, conocidos como genes SOS, ambos capaces de disminuir el posible daño causado por las amibas tratando de fagocitar a las bacterias; de manera similar, estos cambios se han reportado cuando EHEC es internalizada por macrófagos (Poirier *et al.*, 2008). Se ha reportado que la fagocitosis de *A. castellanii* tiene algunas similitudes con la fagocitosis por células mononucleares. Por ejemplo, se genera un ambiente oxidativo similar a algunas células del sistema inmunológico (Brooks & Schneider, 1985) . Si bien no se han estudiado a fondo los mecanismos de sobrevivencia de *E. coli* en las amibas, existe información de los eventos que suceden en la fagocitosis de macrófagos. Algunas

colonias de EHEC pueden sobrevivir dentro de la línea celular de macrófagos humanos THP-1, de igual manera los genes que se sobre-expresan en la bacteria tienen que ver con la respuesta al estrés oxidativo y genes SOS (Etienne-Mesmin *et al.*, 2011). Recientemente se ha descrito que EHEC tiene un sistema de secreción tipo VI funcional, por el cual secreta una proteína conocida como KatN que disminuye la cantidad de especies reactivas del oxígeno (Wan *et al.*, 2017). Este transcrito también aumenta cuando EHEC es internalizada por los macrófagos tanto humanos como de origen murinos (Wan *et al.*, 2017). Es posible que KatN y la regulación del ambiente oxidativo sean algunos de los mecanismos que le permitan a EHEC sobrevivir dentro de *A. castellanii* durante las primeras 3 horas de interacción.

De igual manera, se observó que *E. coli* HS es capaz de sobrevivir por periodos cortos de tiempos en *A. castellanii*, sugiriendo que la internalización y evasión de la fagocitosis puede ser independiente de los factores de virulencia. Mucho menos se sabe acerca de los mecanismos que le permiten a *E. coli* HS sobrevivir intracelularmente en *A. castellanii*. Sin embargo, al igual que EHEC, su internalización y sobrevivencia por tiempos cortos también ha sido reportado en macrófagos (De la Fuente *et al.*, 2014). Similarmente a lo observado en este trabajo *E. coli* HS sobrevive a la fagocitosis inicial por 3 h en macrófagos, sin embargo, no sobrevive más de 24 horas en co-cultivo. En el presente trabajo se observó que las bacterias *E. coli* HS no sobrevivieron más allá de 6 horas cuando fueron internalizadas en *A. castellanii*. Un estudio transcripcional mostró que *E. coli* HS posee algunos elementos similares a las cepas de *E. coli* patógenas, por ejemplo, el sistema de secreción tipo II que comparte con EHEC y un sistema de secreción tipo III no funcional. Sin embargo, el papel de éstos o cualquiera de los componentes de esta bacteria comensal dentro de los macrófagos o amibas permanecen sin conocerse (Rasko *et al.*, 2008).

También se observó la pérdida de la adhesión amibiana a causa del co-cultivo con ambas cepas del *E. coli*. Este efecto fue brevemente mencionado en un estudio previo con EHEC y *A. castellanii* (Chekabab *et al.*, 2013) sin embargo, no fue cuantificada la adhesión. En co-cultivos con *L. pneumophila* y

*A. castellanii* se determinó que la interacción genera la pérdida de la adhesión causando un 60% de amibas despegadas a las 24 h de interacción. Los mismos autores reportaron en otro estudio una disminución en la extensión de los acantópodos de *A. castellanii* resultando en la disminución de la motilidad amibiana (Mengue *et al.*, 2017; Mengue *et al.*, 2016). En este trabajo se demostró que a pesar de tener una gran cantidad de amibas despegadas la viabilidad del cultivo se mantuvo elevada. Para estudiar más a fondo este fenómeno decidimos analizar los cambios en el citoesqueleto por medio del marcaje de actina filamentosa con faloidina rodaminada. Los resultados mostraron un cambio en la distribución del citoesqueleto de las amibas co-cultivadas tanto con EHEC como con *E. coli* HS. Se ha reportado que *A. castellanii* reconoce e internaliza a EHEC por medio de la MBP (Arnold *et al.*, 2016). La MBP está ampliamente involucrada en la inducción de los demás factores de virulencia de la amiba, por lo que la pérdida de la adhesión se puede considerar como una modulación de la virulencia. Es posible que las lectinas de las amibas se saturan con la interacción de la bacteria y pierdan su capacidad de anclarse a la superficie de las monocapas celulares. Esto a su vez, generaría una re-organización del citoesqueleto de actina ya que se sabe que las modificaciones en la MBP pueden generar cambios en la organización de actina (Soto-Arredondo *et al.*, 2014). Se ha descrito ampliamente que la MBP reconoce residuos de manosa (Kim *et al.*, 2012). De igual manera, se ha reportado que la lectina se une al LPS de EHEC (Arnold *et al.*, 2016), sin embargo, el sitio de reconocimiento permanece sin ser definido ya que la superficie de la bacteria no contiene manosa, por lo que se puede inferir que debe de existir un residuo estructuralmente parecido al azúcar que interactúe con la proteína, a la fecha este fenómeno se desconoce (Arnold *et al.*, 2016). No se sabe si existen elementos del LPS de *E. coli* HS que son reconocidos por *A. castellanii*, ni si los LPS de la bacteria comensal y la patógena tienen elementos en común. Es necesario conocer más sobre la estructura de *E. coli* HS ya que se observó un efecto similar al causado por el co-cultivo con EHEC sobre la adhesión de *A. castellanii*.

Por otro lado, se pudieron observar cambios en la morfología ultraestructural amibiana en los co-cultivos con EHEC y con *E. coli* HS. Entre estos cambios

destacan la generación de dobles membranas de retículo endoplásmico rugoso que rodean algunas mitocondrias a las 3 horas de co-cultivo con EHEC. Fenómenos similares han sido detectados con endosimbiontes de *Acanthamoeba* spp. En bacterias del género *Alphaproteobacteria* se observaron membranas rodeando a las mitocondrias (Chan *et al.*, 2018). De igual manera, estructuras similares a las observadas en este estudio se han encontrado cuando la amiba es expuesta a Anfotericina B (Taravaud *et al.*, 2017) en donde las membranas se describieron como estructuras parecidas a autofagosomas inducidas por el estrés oxidativo causado por el fármaco. Sin embargo, en ninguno de los estudios anteriores se estudió más a fondo la autofagia mediante el uso de marcadores. Se sabe que el proceso de fagocitosis genera un estrés oxidativo (Davies *et al.*, 1991), y es posible que se induzca la generación de las dobles membranas de retículo endoplásmico rodeando las mitocondrias. Se ha reportado que las membranas de autofagia probablemente sean generadas a partir del retículo endoplásmico rugoso (Duszenko *et al.*, 2011; Hamacher-Brady & Brady, 2016; Lamb *et al.*, 2013) y además se ha identificado a este organelo en autofagosomas por medio del marcaje con calnexina en estudios de MET (Nixon *et al.*, 2005).

De igual manera, es posible que la bacteria patógena, pero no la no patógena, también contribuya al estado oxidativo que la cepa no patógena, ya que estas estructuras solo se observaron en *A. castellanii* en co-cultivo con EHEC a las 3 h, mientras que en co-cultivo con *E. coli* HS las mitocondrias permanecieron sin cambio. Es posible que las diferencias entre co-cultivos se deban a que EHEC cuenta con más mecanismos para sobrevivir a ambientes adversos que *E. coli* HS, por lo cual es más difícil la fagocitosis de la bacteria causante de la colitis enterohemorrágica. También es posible que debido a la degradación de EHEC, *A. castellanii* tenga que generar un mayor estrés oxidativo que con *E. coli* HS y esto resulte en el daño a las membranas mitocondriales. De manera adicional EHEC contiene algunos efectores que actúan sobre las mitocondrias del hospedero dentro de las que destacan la proteína asociada a mitocondria (MAP) y la hemolisina (EHEC-Hly) (Bielaszewska *et al.*, 2014; Garmendia *et al.*, 2005). MAP es un efector que se encuentra tanto en EHEC como en otra cepa virulenta, EPEC. La proteína

daña a las mitocondrias, modificando su potencial de membrana (Bielaszewska *et al.*, 2014). EHEC-Hly es una toxina que puede actuar de distintas maneras. Al ser secretada genera la lisis de distintos tipos celulares como son los eritrocitos, sin embargo, cuando se encuentra asociada con las vesículas externas de la membrana (OMV) de EHEC es dirigida hacia las mitocondrias del hospedero. Una vez en el organelo la proteína induce la liberación del citocromo c y la inducción de la apoptosis por medio de la vía de la caspasa-9 (Bielaszewska *et al.*, 2014). Aunque no se ha reportado en ningún tipo celular, es posible que las dobles membranas observadas sean un mecanismo de adaptación a los efectores de EHEC con el fin de eliminar a las mitocondrias dañadas y preservar la integridad de la amiba. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar si existe un fenómeno de autofagia en el co-cultivo e identificar a los efectores específicos que están interviniendo en este proceso.

Por otro lado, en el análisis ultraestructural también se observaron algunas zonas electrón-densas en las áreas de contacto entre las bacterias y las amibas que sólo ocurrieron en las interacciones con EHEC. La bacteria patógena EHEC cuenta con mecanismos para remodelar la actina, lo que hace posible que los efectores de EHEC causen la remodelación del citoesqueleto de las amibas lo cual puede servirle para adherirse a la superficie y evitar ser fagocitadas. Sin embargo, algunas bacterias sí pueden ser internalizadas, por lo que deben existir dos eventos que rigen la distribución de la actina de *A. castellanii* en el co-cultivo. Por un lado, los efectores de EHEC sobre las amibas generan zonas íntimas de contacto con la bacteria en donde posiblemente se acumule actina polimerizada mientras que, por otro lado, la amiba modifica su propio citoesqueleto para iniciar el proceso de fagocitosis.

En el hospedero humano, EHEC es capaz de inducir la formación de pedestales en las zonas de contactos con la célula blanco. Esto lo hace por medio del SSTT el cual inyecta una variedad de efectores al citosol de la célula, entre ellos TIR (Nguyen & Sperandio, 2012). Se realizó un WB para determinar si TIR se podía encontrar en los extractos totales de las amibas co-cultivadas con EHEC o bien en los productos de secreción. En este ensayo no se encontró al efector en los co-

cultivos. Es posible que esto se deba a que la cantidad de proteína bacteriana dentro y en contacto con las amibas sea muy poca y pueda no ser detectada por esta metodología. Es probable que si se realiza un inmunomarcaje de TIR pueda ser observado por microscopía confocal o por MET con marcaje con oro coloidal. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento no es posible afirmar si EHEC utiliza sus efectores para alterar el citoesqueleto de *A. castellanii*. Adicionalmente, también se podrían detectar otros efectores de EHEC involucrados en la alteración del citoesqueleto de actina como EspFu.

Al observar las muestras por MET, en las amibas interaccionadas con EHEC, las bacterias internalizadas se observaron principalmente en el citoplasma, mientras que en la interacción con *E. coli* HS, éstas se observaron más frecuentemente dentro de vacuolas. En estudios previos con otros microorganismos, se han encontrado bacterias en vacuolas, en el citoplasma, e incluso en la vacuola contráctil de *Acanthamoeba* spp. (Bozue, 1996; Van der Henst *et al.*, 2016). *L. pneumophila* evita la acidificación de las vacuolas para sobrevivir intracelularmente (Isberg *et al.*, 2009). A la fecha no se ha reportado ningún mecanismo de sobrevivencia de *E. coli* HS. Es posible que *E. coli* HS se degrade dentro de las vacuolas y sea eliminada eficientemente. Los estudios de protección a gentamicina concuerdan con esta observación ya que la bacteria no patógena no sobrevive en la misma proporción ni el mismo tiempo internalizado que EHEC. Por otro lado, EHEC parece no encontrarse en vacuolas, por lo que su fagocitosis resulta más lenta por parte de las amibas. La aparente evasión para ser internalizadas de EHEC por *A. castellanii* podría ser uno de los mecanismos que le permiten sobrevivir dentro de la amiba.

Una vez observados los cambios ultraestructurales de estas interacciones, se procedió a determinar si existían cambios en la expresión de proteínas de *A. castellanii* co-cultivadas con EHEC o con *E. coli* HS. Los resultados mostraron cambios en el perfil de proteínas en los productos de secreción mientras que en los extractos amibianos los cambios no fueron tan aparentes. Es posible que las proteínas que desaparecen en los perfiles proteicos podrían pertenecer a proteínas involucradas en adhesión ya que ésta es una de las principales propiedades que

se pierden durante la interacción. La proteína de unión a manosa contiene subunidades de 130 KDa. En este peso molecular de los geles teñido con plata no se observaron cambios notables en los experimentos realizados, sin embargo, *A. castellanii* contiene otras proteínas de adhesión poco estudiadas que se encuentran dentro de los pesos moleculares de 77 y 84 KDa (Soto-Arredondo *et al.*, 2014) la cual corresponde al rango de pesos en donde probablemente exista la disminución de bandas proteicas de los co-cultivos realizados con EHEC.

En cuanto a las proteínas que se encuentran sobre-expresadas, es posible que sean proteínas que participen en el estrés oxidativo generado durante la fagocitosis. Sin embargo, es necesario realizar geles en dos dimensiones y analizar las bandas por espectrometría de masas para confirmar las proteínas que son expresadas diferencialmente.

La expresión de proteasas, otro de los principales factores de virulencia de *A. castellanii* también fue analizada. Se obtuvieron perfiles proteolíticos de trofozoítos de *A. castellanii* sin interaccionar similares los reportados previamente (Serrano-Luna *et al.*, 2006). La actividad fue inhibida casi totalmente por PMSF, un inhibidor de serina proteasa y esto concuerda con experimentos de otros grupos que confirman que el género *Acanthamoeba* presenta principalmente serina proteasas. La actividad de los productos de secreción también fue similar a los trabajos previamente reportados (Serrano-Luna *et al.*, 2006). En cuanto a los zimogramas, se puede observar una disminución en la expresión de proteasas de bajo peso molecular a causa del co-cultivo con EHEC, sin embargo, no existe una disminución en la expresión de proteasas en la interacción con *E. coli* HS. En los ensayos con Azocoll se observó una disminución de proteasas en ambas interacciones. Con estos resultados podemos especular que las diferencias observadas entre la técnica del Azocoll y los zimogramas se debió a que la primera es una técnica más sensible y cuantificable para determinar la actividad proteolítica total. Además, es posible que la disminución en la actividad de proteasas sea debido a los cambios metabólicos que ocurren en la amiba al tratar de degradar a las bacterias. Se ha reportado que cuando *A. castellanii* se encuentra bajo estrés, aumenta la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo oxidativo y

metabolismo de aminoácidos (Gonçalves *et al.*, 2018). También se ha reportado que cuando la amiba es expuesta a estrés debido a un ambiente altamente oxidativo hay un probable daño en la sintasa de ATP y la ruta respiratoria de la amiba sin aparente daño en la integridad de la mitocondria (Woyda-Ploszczyca *et al.*, 2011). El gasto energético para *A. castellanii* podría ser demasiado alto al tener que fagocitar a las bacterias y las amibas podrían dejar de producir algunas proteasas. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual existen diferencias en el patrón proteolítico de las interacciones con EHEC y *E. coli* HS permanecen sin entenderse completamente. EHEC contiene distintas proteasas, principalmente, la serina proteasa EspP (Kuo *et al.*, 2016) y la metaloproteasa StcE (Grys *et al.*, 2006), sin embargo, la cantidad de proteasas expresadas por *A. castellanii* es mucho mayor a la de las bacterias. Tanto en los experimentos con Azocoll como en los de zimografía no se detectaron actividades proteolíticas en las bacterias solas. Esto pudo haberse debido a que las proteasas de EHEC que se encuentran en la bacteria son mucho menores y tienen sustratos mucho más específicos y diferentes a los de las proteasas de *A. castellanii*. Por ejemplo, en el caso de EspP, la proteína escinde específicamente factores los factores de coagulación V, VII, VIII y XII mientras que no tiene actividad sobre los factores IX, X y XI (Kuo *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha reportado que StcE actúa sobre la mucina 7 y la proteína C1-INH. Sin embargo, no tiene actividad sobre MUC2 o MUC5 (Grys *et al.*, 2006). Es posible que usando un sustrato de mucina o uno específico para alguna proteasa de EHEC se pueda observar la actividad no observada con la gelatina porcina.

Los estudios *ex vivo*, cuando se interaccionaron a las amibas con las córneas de los hámsteres, sugieren fuertemente que el co-cultivo entre EHEC y *A. castellanii* aumentó la virulencia amibiana. Se observó más daño en la capa epitelial, destrucción de la membrana de Bowman, llegándose a observar daño hasta el estroma. Estos resultados fueron más severos en las córneas cuando se compararon con las amibas solas, con la bacteria no patógena y con EHEC sola. Este resultado coincide con un estudio previo en donde se obtuvieron muestras clínicas de *Acanthamoeba* spp. encontrando una correlación entre las amibas que portaban bacterias en su interior y el aumento en el efecto citopático generado a un

cultivo de células corneales (Iovieno *et al.*, 2010). El uso de este modelo experimental previamente reportado (Omaña-Molina *et al.*, 2004) permite simular de una forma más fisiopatológica en la progresión clínica de la QA en los humanos. En resumen, este trabajo representa uno de los primeros hallazgos en donde se explora el impacto de las interacciones de EHEC con *A. castellanii* en la virulencia amibiana. Los datos que se obtuvieron en el presente estudio indicaron que la bacteria patógena, que comparte varios de los nichos ecológico con las amibas, tiene un impacto en la biología celular de *A. castellanii* y puede potenciar la severidad de los casos de QA resultando en un daño más grave en la córnea.

## 10. Conclusiones

1. En el presente trabajo se generaron dos endocitobiontes de *A. castellanii* con EHEC y *E. coli* HS.
2. La interacción de EHEC y *E. coli* HS con *A. castellanii* induce cambios en la adherencia que se relacionó con la modificación del citoesqueleto amibiano sin afectar la sobrevivencia de la amiba.
3. EHEC induce cambios ultraestructurales en la amiba incluyendo la formación de dobles membranas de retículo endoplásmico rugoso alrededor de las mitocondrias y áreas electrón-densas en los sitios de contacto amiba-bacteria. En la cepa *E. coli* HS no se observó este fenómeno.
4. EHEC y *E. coli* HS causan cambios en la expresión de proteínas de secreción y de proteasas de *A. castellanii*.
5. El co-cultivo con EHEC aumenta la virulencia de *A. castellanii* resultando en un mayor daño a la córnea, implicando una QA más severa.

## 11. Perspectivas

1. Detectar la proteína TIR en ensayos de “dot blot”, microscopía confocal y MET con inmunomarcaje en trofozoítos de *A. castellanii*.
2. Identificar a las proteínas específicas de *A. castellanii* que cambian su expresión después de la interacción con EHEC y *E. coli* HS por medio análisis proteómico.
3. Analizar de los cambios en la expresión de los genes relacionados con la adhesión (MBP) de *A. castellanii* debido a las interacciones con EHEC y *E. coli* HS.
4. Identificar los cambios en la virulencia de EHEC a causa el co-cultivo con *A. castellanii* por medio de ensayos de adherencia y formación de pedestales con un cultivo celular intestinal (Caco-2).

## 12. Referencias

- Al-Saedi, F., Vaz, D. P., Stones, D. H. and Krachler, A. M.** (2017). 3-Sulfogalactosyl-dependent adhesion of *Escherichia coli* HS multivalent adhesion molecule is attenuated by sulfatase activity. *J Biol Chem*, **292**, 19792-19803. doi: 10.1074/jbc.M117.817908.
- Alizadeh, H., Li, H., Neelam, S. and Niederkorn, J. Y.** (2008). Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by the mannose-induced *Acanthamoeba* cytolytic protein. *Exp Eye Res*, **87**, 286-291. doi: 10.1016/j.exer.2008.06.011.
- Alizadeh, H., Neelam, S. and Niederkorn, J. Y.** (2007). Effect of immunization with the mannose-induced *Acanthamoeba* protein and *Acanthamoeba* plasminogen activator in mitigating *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 5597-5604. doi: 10.1167/iovs.07-0407.
- Alsam, S., Jeong, S. R., Sissons, J., Dudley, R., Kim, K. S. and Khan, N. A.** (2006). *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications. *J Med Microbiol*, **55**, 689-694. doi: 10.1099/jmm.0.46497-0.
- Alsam, S., Sissons, J., Dudley, R. and Khan, N. A.** (2005). Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitol Res*, **96**, 402-409. doi: 10.1007/s00436-005-1401-z.

- Arnold, J. W., Spacht, D. and Koudelka, G. B.** (2016). Determinants that govern the recognition and uptake of *Escherichia coli* O157 : H7 by *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Microbiol*, **18**, 1459-1470. doi: 10.1111/cmi.12591.
- Axelsson-Olsson, D., Waldenström, J., Broman, T., Olsen, B. and Holmberg, M.** (2005). Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 987-992. doi: 10.1128/AEM.71.2.987-992.2005.
- Balczun, C. and Scheid, P. L.** (2017). Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses*, **9**. doi: 10.3390/v9040065.
- Barker, J., Humphrey, T. J. and Brown, M. W.** (1999). Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett*, **173**, 291-295.
- Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A. and Karch, H.** (2014). Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *Int J Med Microbiol*, **304**, 521-529. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.05.005.
- Bowers, B. and Korn, E. D.** (1968). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J Cell Biol*, **39**, 95-111.
- Bowers, B. and Korn, E. D.** (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol*, **41**, 786-805.
- Bozue, J. A. and Johnson, W.** (1996). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun*, **64**, 668-673.
- Bozue, J. A. a. J. W.** (1996). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: Uptake by Coiling Phagocytosis and Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion. *Infection and Immunity*, **64**, 668--673.
- Brooks, S. E. and Schneider, D. L.** (1985). Oxidative metabolism associated with phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *J Protozool*, **32**, 330-333.
- Bui, X. T., Qvortrup, K., Wolff, A., Bang, D. D. and Creuzenet, C.** (2012). Effect of environmental stress factors on the uptake and survival of *Campylobacter jejuni* in *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Microbiol*, **12**, 232. doi: 10.1186/1471-2180-12-232.
- Carnt, N. and Stapleton, F.** (2016). Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Ophthalmic Physiol Opt*, **36**, 77-92. doi: 10.1111/opo.12271.
- Carruthers, M. D. a. B. B. H. a. M. F. C.** (2010). Exploring the response of *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 within *Acanthamoeba castellanii* by genome-wide transcriptional profiling. Vol. 312 pp. 15--23.
- Castellani, A.** (1930). An amoeba found in cultures of a yeast Preliminary note-Third note-An amoeba growing in cultures of a yeast Second note-Fourth note. *Journal of Tropical Medicine London*, **33**, 160-160.
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y. and Rodier, M. H.** (2014). Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J Hosp Infect*, **87**, 131-140. doi: 10.1016/j.jhin.2014.05.001.

- Chan, L. L., Mak, J. W., Ambu, S. and Chong, P. Y.** (2018). Identification and ultrastructural characterization of *Acanthamoeba* bacterial endocytobionts belonging to the *Alphaproteobacteria* class. *PLoS One*, **13**, e0204732. doi: 10.1371/journal.pone.0204732.
- Chekabab, S. M., Daigle, F., Charette, S. J., Dozois, C. M. and Harel, J.** (2013). Shiga toxins decrease enterohaemorrhagic *Escherichia coli* survival within *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Lett*, **344**, 86-93. doi: 10.1111/1574-6968.12158.
- Chekabab, S. M., Daigle, F., Charette, S. J., Dozois, C. M. and Harel, J.** (2012). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of *Acanthamoeba castellanii* and its dependence on Pho regulon. *Microbiologyopen*, **1**, 427-437. doi: 10.1002/mbo3.40.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., González-Robles, A., Bonilla, P. and Martínez-Palomo, A.** (2005). Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J Eukaryot Microbiol*, **52**, 153-158. doi: 10.1111/j.1550-7408.2005.04-3273.x.
- Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., Lagunes-Guillén, A., Omaña-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M. and Martínez-Palomo, A.** (2013). *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol Res*, **112**, 1125-1130. doi: 10.1007/s00436-012-3261-7.
- Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S. and Bermudez, L. E.** (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*, **65**, 3759-3767.
- Clarke, B., Sinha, A., Parmar, D. N. and Sykakis, E.** (2012). Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *J Ophthalmol*, **2012**, 484892. doi: 10.1155/2012/484892.
- Clarke, D. W. and Niederkorn, J. Y.** (2006). The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol*, **22**, 175-180. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.004.
- Croxen, M. A. and Finlay, B. B.** (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. In *Nat Rev Microbiol*, Vol. 8 pp. 26-38. England.
- Croxen, M. A. a. F. B. B.** (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 26--38. doi: 10.1038/nrmicro2265.
- Davies, B., Chattings, L. S. and Edwards, S. W.** (1991). Superoxide generation during phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*: similarities to the respiratory burst of immune phagocytes. *Microbiology*, **137**, 705-710. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-137-3-705>.
- De la Fuente, M., Franchi, L., Araya, D., Díaz-Jiménez, D., Olivares, M., Álvarez-Lobos, M., Golenbock, D., González, M. J., López-Kostner, F., Quera, R., Núñez, G., Vidal, R. and Hermoso, M. A.** (2014). *Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome. *Int J Med Microbiol*, **304**, 384-392. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.01.002.
- Duszenko, M., Ginger, M. L., Brennand, A., Gualdrón-López, M., Colombo, M. I., Coombs, G. H., Coppens, I., Jayabalasingham, B., Langsley, G., de Castro, S. L., Menna-Barreto, R., Mottram, J. C., Navarro, M., Rigden, D. J., Romano, P. S.,**

- Stoka, V., Turk, B. and Michels, P. A.** (2011). Autophagy in protists. *Autophagy*, **7**, 127-158. doi: 10.4161/auto.7.2.13310.
- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Sauvanet, P., Denizot, J., Blanquet-Diot, S., Darfeuille-Michaud, A., Pradel, N. and Livrelli, V.** (2011). Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS One*, **6**, e23594. doi: 10.1371/journal.pone.0023594.
- Fouque, E., Trouilhe, M. C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M. H. and Hechard, Y.** (2012). Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot Cell*, **11**, 382-387. doi: 10.1128/ec.05301-11.
- Fuerst, P. A., Booton, G. C. and Crary, M.** (2015). Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*, **62**, 69-84. doi: 10.1111/jeu.12186.
- Garate, M., Cubillos, I., Marchant, J. and Panjwani, N.** (2005). Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. *Infect Immun*, **73**, 5775-5781. doi: 10.1128/iai.73.9.5775-5781.2005.
- Garate, M., Marchant, J., Cubillos, I., Cao, Z., Khan, N. A. and Panjwani, N.** (2006). *In vitro* pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **47**, 1056-1062. doi: 10.1167/iovs.05-0477.
- Garmendia, J., Frankel, G. and Crepin, V. F.** (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun*, **73**, 2573-2585. doi: 10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005.
- Gaze, W. H., Burroughs, N., Gallagher, M. P. and Wellington, E. M.** (2003). Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb Ecol*, **46**, 358-369. doi: 10.1007/s00248-003-1001-3.
- Gonçalves, D. S., Ferreira, M. D. S., Liedke, S. C., Gomes, K. X., de Oliveira, G. A., Leão, P. E. L., Cesar, G. V., Seabra, S. H., Cortines, J. R., Casadevall, A., Nimrichter, L., Domont, G. B., Junqueira, M. R., Peralta, J. M. and Guimaraes, A. J.** (2018). Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. *Virulence*, **9**, 818-836. doi: 10.1080/21505594.2018.1451184.
- Gordon, D. M. and Cowling, A.** (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, **149**, 3575-3586. doi: 10.1099/mic.0.26486-0.
- Greub, G. and Raoult, D.** (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, **17**, 413-433.
- Grys, T. E., Walters, L. L. and Welch, R. A.** (2006). Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*, **188**, 4646-4653. doi: 10.1128/JB.01806-05.
- Guimaraes, A. J., Gomes, K. X., Cortines, J. R., Peralta, J. M. and Peralta, R. H.** (2016). *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One

- bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res*, **193**, 30-38. doi: 10.1016/j.micres.2016.08.001.
- Hamacher-Brady, A. and Brady, N. R.** (2016). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci*, **73**, 775-795. doi: 10.1007/s00018-015-2087-8.
- Hong, Y. C., Lee, W. M., Kong, H. H., Jeong, H. J. and Chung, D. I.** (2004). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a laminin-binding protein (AhLBP) from *Acanthamoeba healyi*. *Exp Parasitol*, **106**, 95-102. doi: 10.1016/j.exppara.2004.01.011.
- Huang, F. C., Shih, M. H., Chang, K. F., Huang, J. M., Shin, J. W. and Lin, W. C.** (2017). Characterizing clinical isolates of *Acanthamoeba castellanii* with high resistance to polyhexamethylene biguanide in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, **50**, 570-577. doi: 10.1016/j.jmii.2015.10.011.
- Hurt, M., Neelam, S., Niederkorn, J. and Alizadeh, H.** (2003a). Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infect Immun*, **71**, 6243-6255.
- Hurt, M., Niederkorn, J. and Alizadeh, H.** (2003b). Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**, 3424-3431.
- Iovieno, A., Ledee, D. R., Miller, D. and Alfonso, E. C.** (2010). Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. *Ophthalmology*, **117**, 445-452, 452.e441-443. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.08.033.
- Isberg, R. R., O'Connor, T. J. and Heidtman, M.** (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 13-24. doi: 10.1038/nrmicro1967.
- J., S.-L., Cervantes-Sandoval, I., Calderon, J., Navarro-Garcia, F., Tsutsumi, V. and Shibayama, M.** (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Can J Microbiol*, **52**, 16-23. doi: 10.1139/w05-114.
- Jiang, X., Morgan, J. and Doyle, M. P.** (2002). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 2605-2609. doi: 10.1128/aem.68.5.2605-2609.2002.
- Jung, S. Y., Matin, A., Kim, K. S. and Khan, N. A.** (2007). The capsule plays an important role in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Int J Parasitol*, **37**, 417-423. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.10.012.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818.
- Kennett, M. J., Hook, R. R., Franklin, C. L. and Riley, L. K.** (1999). *Acanthamoeba castellanii*: characterization of an adhesin molecule. *Exp Parasitol*, **92**, 161-169. doi: 10.1006/expr.1999.4417.
- Khan, N. A.** (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*, **30**, 564-595. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x.
- Kim, J. H., Matin, A., Shin, H. J., Park, H., Yoo, K. T., Yuan, X. Z., Kim, K. S. and Jung, S. Y.** (2012). Functional roles of mannose-binding protein in the adhesion, cytotoxicity

- and phagocytosis of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Parasitol*, **132**, 287-292. doi: 10.1016/j.exppara.2012.08.007.
- King, C. H., Shotts, E. B., Jr., Wooley, R. E. and Porter, K. G.** (1988). Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol*, **54**, 3023-3033.
- Korn, E. D.** (1967). Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. II. Electron microscopic study of the initial events. *The Journal of cell biology*, **34**, 219--227. doi: 10.1083/jcb.34.1.219.
- Köhler, M., Mrva, M. and Walochnik, J.** (2016). *Acanthamoeba*, Springer-Verlag Wien, Austria.
- Kuennen, R. A., Smith, R. H., Mauger, T. F. and Craig, E.** (2010). Enucleation following treatment with intravenous pentamidine for *Acanthamoeba* sclerokeratitis. *Clin Ophthalmol*, **4**, 1145-1149. doi: 10.2147/OPHT.S13831.
- Kuo, K. H., Khan, S., Rand, M. L., Mian, H. S., Brnjac, E., Sandercock, L. E., Akula, I., Julien, J. P., Pai, E. F. and Chesney, A. E.** (2016). EspP, an Extracellular Serine Protease from Enterohemorrhagic *E. coli*, Reduces Coagulation Factor Activities, Reduces Clot Strength, and Promotes Clot Lysis. *PLoS One*, **11**, e0149830. doi: 10.1371/journal.pone.0149830.
- Köhler, M., Leitsch, D., Fürnkranz, U., Duchêne, M., Aspöck, H. and Walochnik, J.** (2008). *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol Res*, **102**, 1069-1072. doi: 10.1007/s00436-008-0885-8.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T. and Tooze, S. A.** (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **14**, 759-774. doi: 10.1038/nrm3696.
- Leimbach, A., Hacker, J. and Dobrindt, U.** (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol*, **358**, 3-32. doi: 10.1007/82\_2012\_303.
- LeJeune, J. T., Besser, T. E. and Hancock, D. D.** (2001). Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 3053-3057. doi: 10.1128/AEM.67.7.3053-3057.2001.
- Levine M., Nalin A., David R., Hornick A., Richard B., Bergquist B., Erick J. and Rowe A.** (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *The Lancet*, **311**, 1119-1122.
- Lim, J. Y., Yoon, J. and Hovde, C. J.** (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*, **20**, 5-14.
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A. and Walochnik, J.** (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, **22**, 10. doi: 10.1051/parasite/2015010.
- Lorenzo-Morales, J. a. K. N. A. a. W. J.** (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite (Paris, France)*, **22**, 10. doi: 10.1051/parasite/2015010.
- Ly, T. M. and Müller, H. E.** (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol*, **33**, 51-54. doi: 10.1099/00222615-33-1-51.

- Maltby, R., Leatham-Jensen, M. P., Gibson, T., Cohen, P. S. and Conway, T. (2013).** Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One*, **8**, e53957. doi: 10.1371/journal.pone.0053957.
- Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. (2003).** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*, **16**, 273-307.
- Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Valladares, B., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2013).** Evaluation of the *in vitro* activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **251**, 2111-2117. doi: 10.1007/s00417-013-2371-y.
- Melton-Celsa, A., Mohawk, K., Teel, L. and O'Brien, A. (2012).** Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*, **357**, 67-103. doi: 10.1007/82\_2011\_176.
- Mengue, L., Richard, F. J., Caubet, Y., Rolland, S., Héchard, Y. and Samba-Louaka, A. (2017).** *Legionella pneumophila* decreases velocity of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Parasitol*, **183**, 124-127. doi: 10.1016/j.exppara.2017.07.013.
- Mengue, L., Régnacq, M., Aucher, W., Portier, E., Héchard, Y. and Samba-Louaka, A. (2016).** *Legionella pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*. *Sci Rep*, **6**, 36448. doi: 10.1038/srep36448.
- Mitra, M. M., Alizadeh, H., Gerard, R. D. and Niederkorn, J. Y. (1995).** Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. *Mol Biochem Parasitol*, **73**, 157-164. doi: 10.1016/0166-6851(94)00109-z
- Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C. and Kong, H. H. (2008).** Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot Cell*, **7**, 1513-1517. doi: 10.1128/ec.00068-08.
- Naginton, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. R. and Steele, A. D. (1974).** Amoebic infection of the eye. *Lancet*, **2**, 1537-1540. doi: 10.1016/s0140-6736(74)90285-2.
- Navaratnam, J., Utheim, T. P., Rajasekhar, V. K. and Shahdadfar, A. (2015).** Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. *J Funct Biomater*, **6**, 917-945. doi: 10.3390/jfb6030917.
- Nguyen, Y. and Sperandio, V. (2012).** Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2**, 90. doi: 10.3389/fcimb.2012.00090.
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A. and Cuervo, A. M. (2005).** Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**, 113-122. doi: 10.1093/jnen/64.2.113.
- Omaña-Molina, M., Navarro-García, F., Gonzalez-Robles, A., Serrano-Luna Jde, J., Campos-Rodríguez, R., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V. and Shibayama, M. (2004).** Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after *in vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun*, **72**, 3245-3251. doi: 10.1128/iai.72.6.3245-3251.2004.

- Page, A. V. and Liles, W. C.** (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *Med Clin North Am*, **97**, 681-695, xi. doi: 10.1016/j.mcna.2013.04.001.
- Panjwani, N.** (2010). Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf*, **8**, 70-79.
- Percival, S. L. and Williams, D. W.** (2014). *Escherichia coli*, Elsevier Ltd.
- Pickup, Z. L., Pickup, R. and Parry, J. D.** (2007). Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 2631-2634. doi: 10.1128/AEM.02061-06.
- Poirier, K., Faucher, S. P., Béland, M., Brousseau, R., Gannon, V., Martin, C., Harel, J. and Daigle, F.** (2008). *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. *Infect Immun*, **76**, 4814-4822. doi: 10.1128/IAI.00446-08.
- Radford, C. F., Minassian, D. C. and Dart, J. K.** (2002). *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol*, **86**, 536-542. doi: 10.1136/bjo.86.5.536.
- Raetz, C. R. and Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, **71**, 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M. and Swerdlow, D. L.** (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis*, **11**, 603-609. doi: 10.3201/eid1104.040739.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N. R., Chaudhuri, R., Henderson, I. R., Sperandio, V. and Ravel, J.** (2008). The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*, **190**, 6881-6893. doi: 10.1128/JB.00619-08.
- Rocha-Azevedo, B., Jamerson, M., Cabral, G. A. and Marciano-Cabral, F.** (2010). *Acanthamoeba culbertsoni*: analysis of amoebic adhesion and invasion on extracellular matrix components collagen I and laminin-1. *Exp Parasitol*, **126**, 79-84. doi: 10.1016/j.exppara.2009.08.004.
- Rowbotham, T. J.** (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*, **33**, 1179-1183.
- Scheid, P.** (2014). Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol Res*, **113**, 2407-2414. doi: 10.1007/s00436-014-3932-7.
- Schuppler, M.** (2014). How the interaction of *Listeria monocytogenes* and *Acanthamoeba* spp. affects growth and distribution of the food borne pathogen. *Appl Microbiol Biotechnol*, **98**, 2907-2916. doi: 10.1007/s00253-014-5546-5.
- Segal, G. and Shuman, H. A.** (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun*, **67**, 2117-2124.
- Serrano-Luna, Cervantes-Sandoval, I., Calderon, J., Navarro-Garcia, F., Tsutsumi, V. and Shibayama, M.** (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Can J Microbiol*, **52**, 16-23. doi: 10.1139/w05-114.

- Serrano-Luna de, J., Cervantes-Sandoval, I., Calderon, J., Navarro-Garcia, F., Tsutsumi, V. and Shibayama, M.** (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Can J Microbiol*, **52**, 16-23. doi: 10.1139/w05-114.
- Siddiqui, R., Malik, H., Sagheer, M., Jung, S. Y. and Khan, N. A.** (2011). The type III secretion system is involved in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Exp Parasitol*, **128**, 409-413. doi: 10.1016/j.exppara.2011.05.008.
- Sissons, J., Alsam, S., Jayasekera, S. and Khan, N. A.** (2004). Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Microb Pathog*, **37**, 231-239. doi: 10.1016/j.micpath.2004.01.004.
- Slater, S. L., Sångfors, A. M., Pollard, D. J., Ruano-Gallego, D. and Frankel, G.** (2018). The Type III Secretion System of Pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*, **416**, 51-72. doi: 10.1007/82\_2018\_116.
- Soto-Arredondo, K. J., Flores-Villavicencio, L. L., Serrano-Luna, J. J., Shibayama, M. and Sabanero-Lopez, M.** (2014). Biochemical and cellular mechanisms regulating *Acanthamoeba castellanii* adherence to host cells. *Parasitology*, **141**, 531-541. doi: 10.1017/s0031182013001923.
- Szentmáry, N., Daas, L., Shi, L., Laurik, K. L., Lepper, S., Milioti, G. and Seitz, B.** (2019). *Acanthamoeba* keratitis - Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *J Curr Ophthalmol*, **31**, 16-23. doi: 10.1016/j.joco.2018.09.008.
- Taravaud, A., Loiseau, P. M. and Pomel, S.** (2017). In vitro evaluation of antimicrobial agents on *Acanthamoeba* sp. and evidence of a natural resilience to amphotericin B. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **7**, 328-336. doi: 10.1016/j.ijpddr.2017.09.002.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. and Denamur, E.** (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 207-217. doi: 10.1038/nrmicro2298.
- Tezcan-Merdol, D., Ljungström, M., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L. and Rhen, M.** (2004). Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhyodes*. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 3706-3714. doi: 10.1128/AEM.70.6.3706-3714.2004.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. and Ayadi, A.** (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)*, **60**, 399-405. doi: 10.1016/j.patbio.2012.03.002.
- Ulsamer, A. G., Wright, P. L., Wetzel, M. G. and Korn, E. D.** (1971). Plasma and phagosome membranes of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol*, **51**, 193-215. doi: 10.1083/jcb.51.1.193.
- Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C. and Blokesch, M.** (2016). An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *ISME J*, **10**, 897-910. doi: 10.1038/ismej.2015.165.
- Vieira, A., Seddon, A. M. and Karlyshev, A. V.** (2015). *Campylobacter-Acanthamoeba* interactions. *Microbiology*, **161**, 933-947. doi: 10.1099/mic.0.000075.
- Wan, B., Zhang, Q., Ni, J., Li, S., Wen, D., Li, J., Xiao, H., He, P., Ou, H. Y., Tao, J., Teng, Q., Lu, J., Wu, W. and Yao, Y. F.** (2017). Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host

- reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathog*, **13**, e1006246. doi: 10.1371/journal.ppat.1006246.
- Wiley, C. A., Safrin, R. E., Davis, C. E., Lampert, P. W., Braude, A. I., Martinez, A. J. and Visvesvara, G. S.** (1987). *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with AIDS. *J Infect Dis*, **155**, 130-133. doi: 10.1093/infdis/155.1.130.
- Woyda-Ploszczyca, A., Koziel, A., Antos-Krzeminska, N. and Jarmuszkiewicz, W.** (2011). Impact of oxidative stress on *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial bioenergetics depends on cell growth stage. *J Bioenerg Biomembr*, **43**, 217-225. doi: 10.1007/s10863-011-9351-x.
- Yousuf, F. A., Yousuf, Z., Iqbal, J., Siddiqui, R., Khan, H. and Khan, N. A.** (2014). Interactions of neuropathogenic *Escherichia coli* K1 (RS218) and its derivatives lacking genomic islands with phagocytic *Acanthamoeba castellanii* and nonphagocytic brain endothelial cells. *Biomed Res Int*, **2014**, 265424. doi: 10.1155/2014/265424.
- Zhou, X., Elmore, J. and Call, D. R.** (2007). Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). *Environ Microbiol*, **9**, 913-922. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01213.x.

