

Diferenciación en *Acanthamoeba*: Estudio de su caracterización bioquímica y morfológica

Acanthamoeba differentiation: biochemical characterization and morphological study

Gabriela Esmeralda Sánchez Calderón¹, Juan Magaña Martínez¹, Erick Duran López¹, Christian Sujham Silva Rodríguez¹, Saraí Jezabel Barrientos Alejo¹, Lérica Liss Flores Villavicencio¹, Julio César Villagómez Castro^{1*}

¹Departamento de Biología, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
castroj@ugto.mx^{1*}

Resumen

Las amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* se han aislado de diferentes ambientes. Las infecciones por *Acanthamoeba* (encefalitis amebiana granulomatosa, EGA; queratitis amebiana, QA; o infecciones locales o diseminadas) representan un elevado riesgo para la salud, especialmente en individuos inmunocomprometidos, ya que ocasionan una elevada tasa de letalidad, no obstante, su baja incidencia. En su ciclo de vida se observan dos estadios morfológicos, los trofozoítos (forma vegetativa e invasiva), que bajo condiciones de estrés pueden diferenciarse en quistes (forma de resistencia e infectiva) para garantizar la supervivencia del parásito en ambientes no favorables. La pared quística es doble, con un exoquiste compuesto de proteínas, polisacáridos y carbohidratos; y, un endoquiste compuesto de celulosa. En este proyecto, se estudió la diferenciación de *Acanthamoeba* basado en la caracterización morfológica y bioquímica; para ello se determinó el porcentaje del proceso de diferenciación amebiano (trofozoíto-quiste-trofozoíto). El porcentaje de enquistamiento referido a la cantidad de células totales de *A. castellanii* y *A. polyphaga*, fue de 10 y 7 % a las 24 horas, 56 y 40 % a las 48 horas y el máximo de enquistamiento se obtuvo a las 72 horas con un 90 y 67 % respectivamente. En el caso del proceso de desenquistamiento, los resultados indican que a partir de las 4 horas empieza el proceso de diferenciación, mientras que a las 24 horas se alcanza un 98 % de desenquistamiento para ambas especies, con un 100 % de viabilidad celular. Por otra parte, proponemos que la participación de hidrolasas en la diferenciación amebiana es clave para estudios posteriores como blanco de antiparasitarios.

Palabras clave: Quistes; Trofozoítos, Desenquistamiento, Glicosidasas.

Acanthamoeba

Las amibas de vida libre son microorganismos eucariotas ubicuos y anfizoicos. Entre estas amibas se encuentran los géneros: *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* y *Acanthamoeba*; siendo este último, el género más abundante en la naturaleza (Visvesvara *et al.*, 2007). El análisis filogenético de *Acanthamoeba*, basado en el análisis del gen 18S rARN indica que existen 12 linajes diferentes (T1-T12), siendo el genotipo T4 el más frecuentemente aislado y patógeno (Stothard *et al.*, 1998; Risler *et al.*, 2013). Recientemente, se ha incrementado el interés en el estudio de este parásito debido a su distribución ubicua en el medio ambiente y su condición de "caballo de Troya"; ya que alberga una gran cantidad de patógenos como bacterias (géneros *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, principalmente), virus (Minivirus, Megavirus, Pandoravirus) y hongos (*Candida albicans*, *Candida auris*); protegiéndolos de los efectos adversos del ambiente, desinfectantes y las terapias farmacológicas (Siddiqui *et al.*, 2020). Asimismo, se ha sugerido la transmisión del virus SARS-CoV-2 por *Acanthamoeba* y su propagación en los sistemas de aire acondicionado y el medio ambiente, así como las implicaciones de la infección por estos patógenos (Fouque *et al.*, 2012; Rayamajhee *et al.*, 2021, Siddiqui & Khan, 2020; Siddiqui *et al.*, 2021).

Acanthamoeba es el agente causal de la queratitis amebiana (QA) una infección de la córnea que es causada por al menos ocho especies de *Acanthamoeba*: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. rhysodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, y *A. griffini* (Arnalich-Montiel F., *et al.*, 2014; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015, Niederkorn JY., 2021). En aislados clínicos de pacientes con QA, se ha observado que la mayoría de las infecciones humanas se asocian al genotipo T4 (más del 90% de los casos) (Ledee, 2009; Visvesvara *et al.*, 2007). Aunque el genotipo T4, se presenta comúnmente en las infecciones por *Acanthamoeba* (Maciver *et*

al., 2013), se ha reportado que la QA producida por genotipos diferentes a T4, es severa y tiene una baja respuesta a la terapia farmacológica (Arnalich-Montiel *et al.*, 2014), comprometiendo la pérdida de la visión del ojo infectado (Fig. 1). Adicionalmente, la QA se ha reportado en animales como peces, reptiles, perros, toros, canguros y equinodermos (Lorenzo-Morales J., *et al.*, 2013).

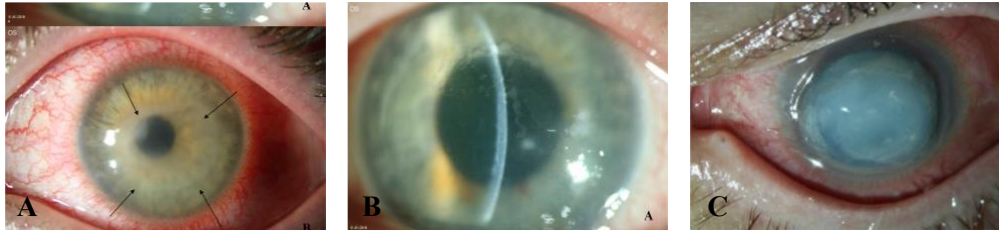


Figura 1. Signos clínicos de la queratitis por *Acanthamoeba*. "Epitelio sucio" (A), infiltrado en anillo (flechas) (B), Severa QA: escleritis, úlcera corneal, atrofia del iris, midriasis persistente y catarata madura (C) (Tomado y modificado de Szentmáry *et al.*, 2019)

La encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) es una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) en pacientes inmunocomprometidos, con un porcentaje de mortalidad superior al 95 % (Fig. 2) (Anwar *et al.*, 2018; Marciano-Cabral y Cabral, 2003). *Acanthamoeba* tiene como principal vía de entrada al organismo la mucosa nasal, si bien, también puede desarrollarse a partir de lesiones pulmonares o ulceraciones cutáneas infectadas con él parásito, que al diseminarse por vía del nervio olfatorio o vía hematogena, llegan al cerebro ocasionando la EGA.

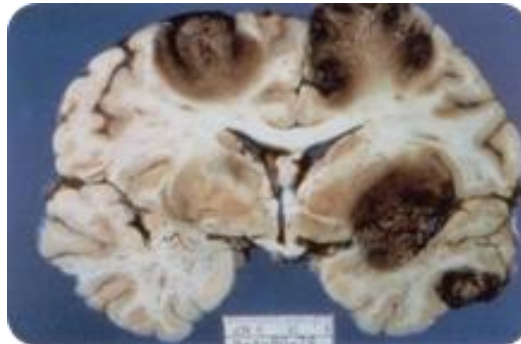


Figura 2. Caso de encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) producida por *Acanthamoeba* spp. Sección coronal de hemisferios cerebrales, que presentan necrosis cortical y subcortical. Se observa necrosis y hemorragia. (Tomado de Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Ciclo de vida

El ciclo de vida del género *Acanthamoeba* comprende dos estadios morfológicos (Fig. 3): el trofozoíto (forma de vida vegetativa e infectiva), es pleomórfico y mide entre 15-50 μm , con un solo núcleo y proyecciones filamentosas llamadas acantopodios (del griego "acantos" que significa espinas). Por otro lado, en condiciones ambientales desfavorables (temperatura, pH, nutrientes, desecación, estrés osmótico, etc.) los trofozoítos se transforman en quistes resistentes a condiciones físicas y químicas extremas. La forma de resistencia es un quiste esférico o poligonal de 10-25 μm de diámetro, el cual, una vez maduro, posee dos paredes, una externa o exoquiste y, otra interna o endoquiste (Moon & Kong, 2012; Fouque *et al.*, 2012).

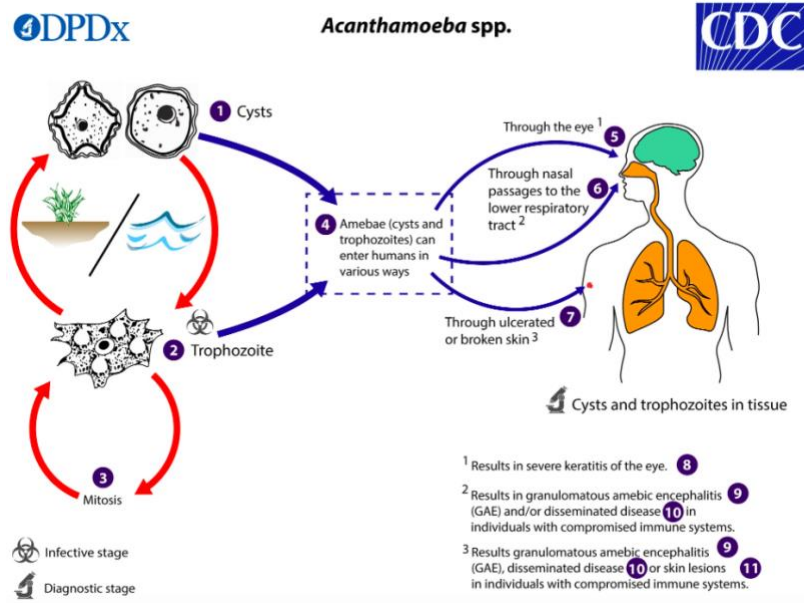


Figura 3. Ciclo biológico de *Acanthamoeba spp.* Tomado de DPDx/CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx>)

Participación de las glicosidasas en el desarrollo de *Acanthamoeba*

La estructura de la pared del quiste es compleja, la celulosa es uno de los componentes primordiales del endoquiste, por lo que su síntesis y degradación es un proceso esencial durante la diferenciación. En este sentido, se ha estudiado la importancia de la celulosa sintasa en *Acanthamoeba*, sin embargo, no existe una clara evidencia de la presencia o posible papel para enzimas del tipo endoglucanasa y exoglucanasa, en quistes o trofozoitos, si bien, se ha sugerido la presencia de α y β -glucosidasas de forma basal y en extractos de trofozoitos del parásito (Deichmann & Jantzen, 1977; Lasman, 1975). Por otra parte, se ha demostrado la expresión diferencial de varios genes posiblemente relacionados al proceso diferenciativo amebiano, observándose en los quistes la expresión de genes de xilosa isomerasa, una endoglucanasa extracelular, de celulasas y una celobiosidasa, pero no el de β -glucosidasa (Anderson *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2007, 2011, 2012). Cabe hacer notar que los genes que codifican para α y β -glucosidasas y para xilosidasa, se encuentran anotados en el genoma de *A. castellanii* (Clarke *et al.*, 2013), sin que se haya descrito aún su expresión en el ciclo vital de este parásito.

Material y Métodos

Cultivos de *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*

Los trofozoitos de *A. polyphaga* y *A. castellanii* fueron mantenidos en cultivo axénico en medio líquido de Chang (Peptona-biotriptasa 16.6 g/L; Na_2HPO_4 1.5 g/L; dextrosa 2.7 g/L; KH_2PO_4 0.9 g/L) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10 % v/v (GIBCO, Grand Island, NY). Los trofozoitos se incubaron a 30 °C en botellas de cultivo celular de 25 cm² (Corning, NY) hasta su fase logarítmica de crecimiento (72 h).

Enquistamiento y desenquistamiento *in vitro* de *A. polyphaga* y *A. castellanii*

Enquistamiento. El protocolo para inducir el enquistamiento de las especies de *Acanthamoeba*, se llevó a cabo conforme lo reportado por Sohn *et al.* (2017) y Amezola-Rivera (2021). Para ello, se colocaron 2.5×10^5 trofozoitos/mL en medio de enquistamiento (NaCl, 95 mM; KCl, 5 mM; MgSO_4 , 8 mM; NaHCO_3 , 1 mM; CaCl_2 , 0.4 mM; Tris-HCl, 20 mM pH 9.0) y se incubaron, sin agitación, a 37 °C por 24-72 h. Cada 24 h se revisaron las botellas hasta observar confluencia celular y la aparición de quistes refringentes mediante un microscopio invertido (Primo Vert, ZEISS).

Desenquistamiento. Posterior a la incubación de 72 h en medio de enquistamiento, se recuperaron los quistes y el total de células se trató con Tritón X-100, 0.05 % p/v, en PAS (Page's modified Neff's amoeba saline), pH 7.1 a temperatura ambiente por 5 min para lisar los trofozoítos. Los quistes recuperados se inocularon en medio PYG (Peptona Biotriptasa, Extracto de Levadura, Dextrosa) y se incubaron a 37 °C sin agitación. Cada 24 h se revisaron los cultivos para determinar el desenquistamiento, determinado por la aparición de trofozoítos, utilizando un microscopio invertido (Primo Vert, ZEISS). Se registraron los cambios morfológicos durante la fase de diferenciación: trofozoíto - quiste - trofozoíto y se determinaron los parámetros del proceso de enquistamiento y desenquistamiento, mencionados a continuación.

Porcentaje de quistes y trofozoítos

Se determinó la eficiencia de enquistamiento (24-72 h) y desenquistamiento (12h y 24 h), mediante el recuento celular de alícuotas provenientes de los diferentes tiempos del proceso de diferenciación. Para ello, se cuantificó el número de quistes y trofozoítos en cámara de Neubauer y el porcentaje se realizó con base al total de células recuperadas.

Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular, tanto de quistes como de trofozoítos, se determinó mediante la tinción con azul de tripano al 0.4 % (Sigma) empleando el criterio de exclusión del colorante por las células vivas. Se recuperaron las células, se adicionaron con el colorante en relación 1:1 v/v y se cuantificaron en cámara de Neubauer, para determinar el porcentaje de viabilidad.

Análisis morfológico

Durante el proceso de enquistamiento se analizó la morfología celular mediante microscopía de campo claro y contraste de fases (Microscopio invertido, Primo vert, Carl ZEISS). Finalmente, la integridad de la pared quística se evaluó mediante una tinción con el colorante fluorescente Calcofluor W2R (0.2 % p/v, Sigma) observando la adsorción del colorante en la pared quística, mediante microscopía de epifluorescencia (filtro UV, λ excitación, 400 nm; y λ emisión, 420 nm) utilizando el microscopio de epifluorescencia, Leica DMLS acoplado a una cámara AxioCam ICc1 (Carl ZEISS).

Determinación de la actividad de glicosidasa

Se determinaron las actividades totales de las siguientes glicosidasas: β -glucosidasa, β -xilosidasa y celobiohidrolasa (glucanasa), para analizar su participación durante el proceso de diferenciación. Se utilizaron sustratos acoplados a 4-metilumbeliferona (4-MU-glucósido, 4-MU-celobiosido y 4-MU xilósido). La 4-MU liberada del sustrato se cuantificó en condiciones alcalinas (λ Ex/Em, 350/440 nm) y se utilizó como estándar una curva de calibración con 4-MU. En ambos casos, las reacciones se realizaron de acuerdo con las técnicas estándar establecidas en el laboratorio (Hernández-Guzmán, 2016).

Determinación de proteína

La proteína en las muestras se determinó por el método de Lowry (1951), utilizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA).

Análisis estadístico

Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno con una $n=3$ y los resultados paramétricos (ANOVA, $*p \leq 0.05$) se reportaron como la media \pm la desviación estándar (SD). Además, se realizó un análisis de medias por el Método de Tukey (Software Minitab 20). Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 7.

Resultados

Acanthamoeba spp.

En este estudio se utilizaron dos especies clínicas patógenas de *Acanthamoeba*: *A. castellanii* y *A. polyphaga*, para analizar el desarrollo morfogénico que da lugar al cambio de trofozoítos a quistes lo cual se conoce como enquistamiento y el de quistes a trofozoítos, o desenquistamiento. El análisis del proceso de diferenciación se inició con cultivos de trofozoítos en fase logarítmica, los cuáles mostraron las características típicas del género *Acanthamoeba*, como son una forma indefinida o amorfa, uninucleados, y con abundantes

vacuolas y sus estructuras de locomoción típicas, llamadas acantopodios (del griego, “acanth” espigas/espinas) (Fig. 4). La viabilidad celular en nuestros cultivos fue del 100 % en todos los casos.

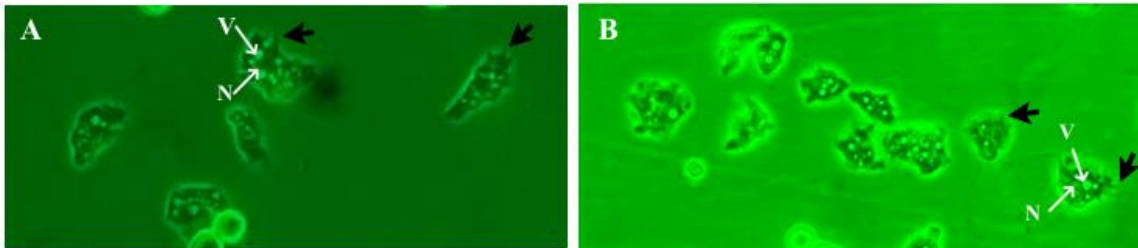
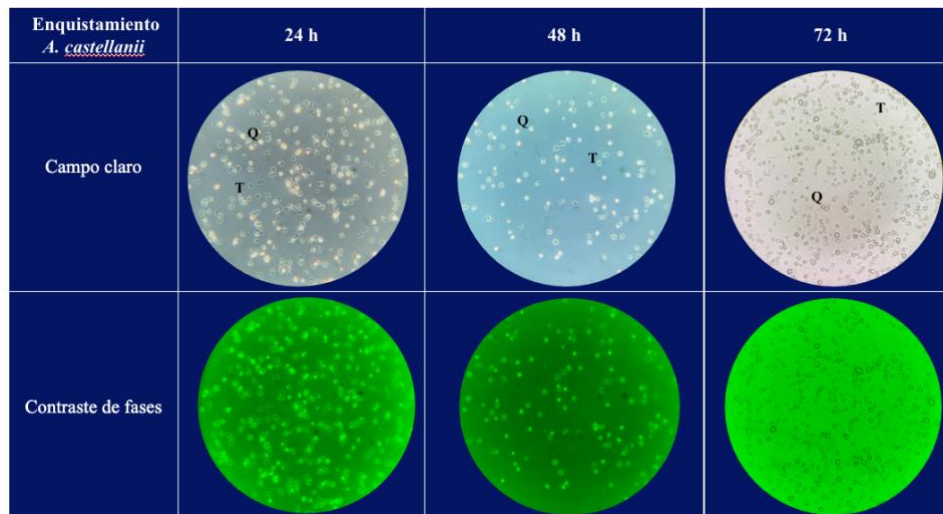


Figura 4. Morfología de trofozoitos de *A. castellanii* (A) y *A. polyphaga* (B). Se observan las estructuras de los acantopodios (flecha negra), el núcleo (N) y las vacuolas (V).

Diferenciación de *A. polyphaga* y *A. castellanii*

- **Enquistamiento**

Durante el proceso de enquistamiento en ambas especies de *Acanthamoeba*, se observaron evidentes cambios en la morfología del trofozoíto (Fig. 5), desde las 24 horas se observaron los prequistes o quistes inmaduros, los cuales tienen una forma redonda y por ende la pérdida de los acantopodios. Además, los quistes refractan la luz al ser vistos al microscopio debido a la presencia de la pared celular; sin embargo, a partir de las 48 horas es más evidente la refracción de la luz por la aparición de quistes maduros, los cuales presentan una doble pared, denominadas como ectoquiste (pared externa) y endoquiste (pared interna) (Fig. 6).



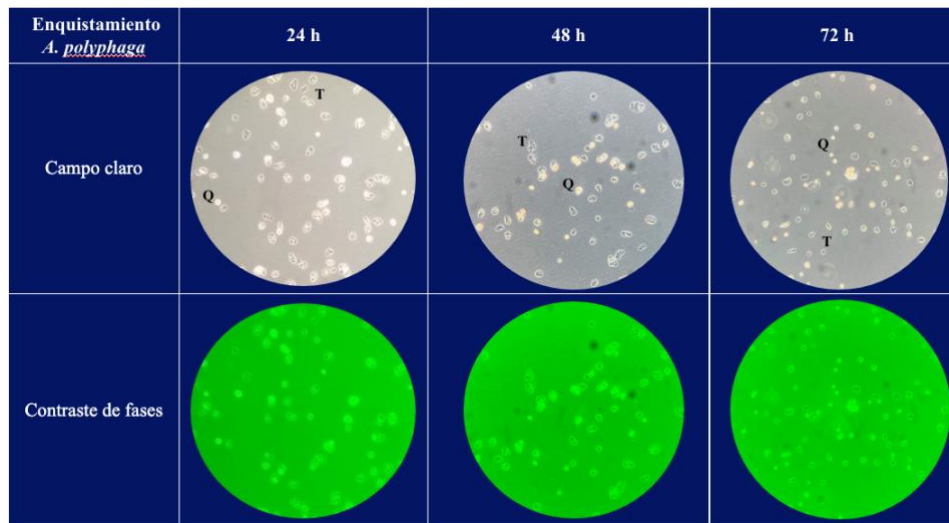


Figura 5. Análisis morfológico de *A. castellanii* y *A. polyphaga* durante el proceso de enquistamiento. El cambio morfológico de trofozoíto (T) a quiste (Q) se visualiza con microscopía de campo claro y contraste de fases (20X), se observa la presencia de quistes inmaduros en ambas especies de *Acanthamoeba* a las 24 h, mientras que se aprecia a las 48 y 72 h la aparición de quistes maduros y disminución de trofozoítos con respecto al tiempo.

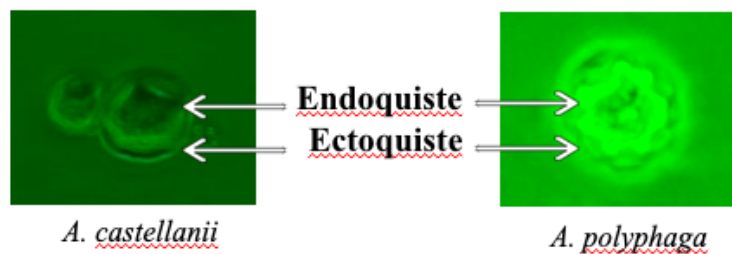


Figura 6. Morfología del quiste maduro de *A. castellanii* y *A. polyphaga*.

Por otra parte, la integridad de la pared celular en los quistes fue evaluada con el colorante blanco de Calcoflúor (calcoflúor W2R), el cual se une a la celulosa, componente primordial de la pared celular del endoquiste (Fig. 7A). Los resultados muestran una marca fluorescente continua, indicando la integridad en la pared quística. Además, se observó en los quistes maduros, la característica morfológica de la doble pared; es decir la presencia del endoquiste y ectoquiste (Fig. 7B).

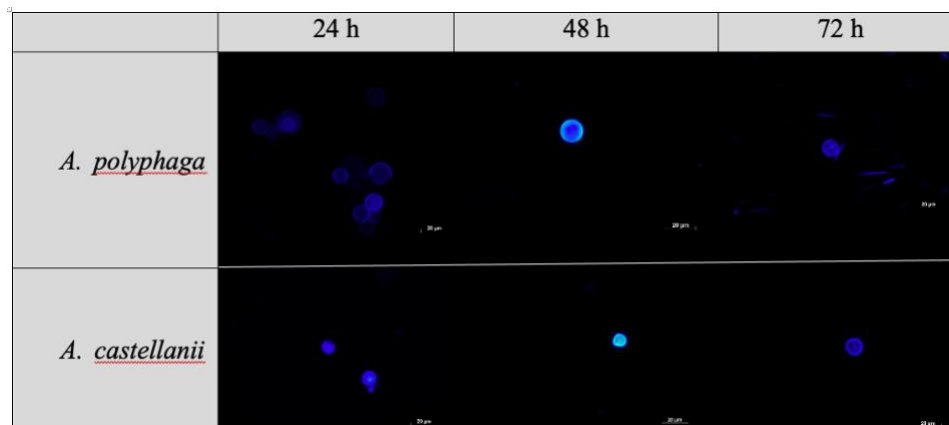


Figura 7A. Quistes de *A. castellanii* y *A. polyphaga* durante el proceso de enquistamiento (40x).

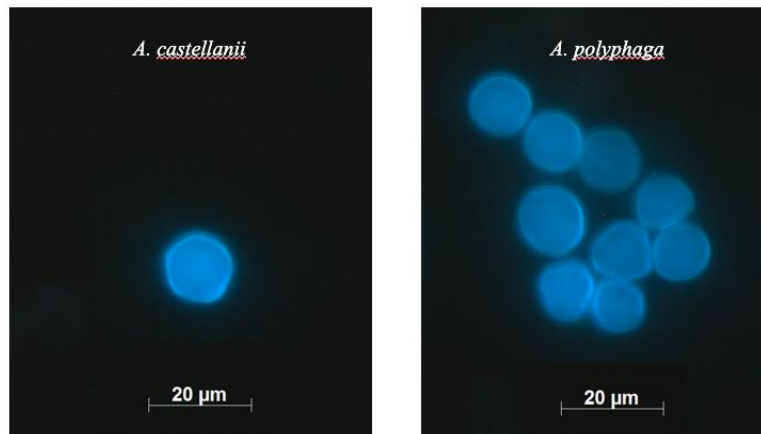
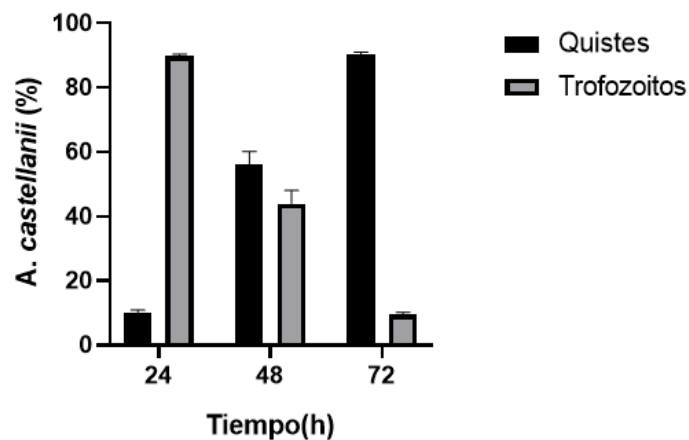


Figura 7B. Quistes de *A. castellanii* y *A. polyphaga* (40x). Se aprecian quistes con la doble pared, el endociste se observa con destacada fluorescencia debido a la tinción con blanco de Calcofluor (W2R)

Aunado al análisis morfológico, se cuantificó el porcentaje de enquistamiento referido a la cantidad de células totales de *A. castellanii* y *A. polyphaga*, recuperadas en cada tiempo de inducción de la diferenciación. Los resultados indican un 10 y 7 % a las 24 horas, 56 y 40 % a las 48 horas y el máximo de enquistamiento se obtuvo a las 72 horas con un 90 y 67 % respectivamente para *A. castellanii* y *A. polyphaga* (Fig. 8). Por otra parte, al evaluar la viabilidad celular por la exclusión del colorante azul de tripano, ésta fue igual o mayor a 97 % para los trofozoítos a través del tiempo analizado, mientras que la viabilidad celular de los quistes fue de 100 % en todos los tiempos.



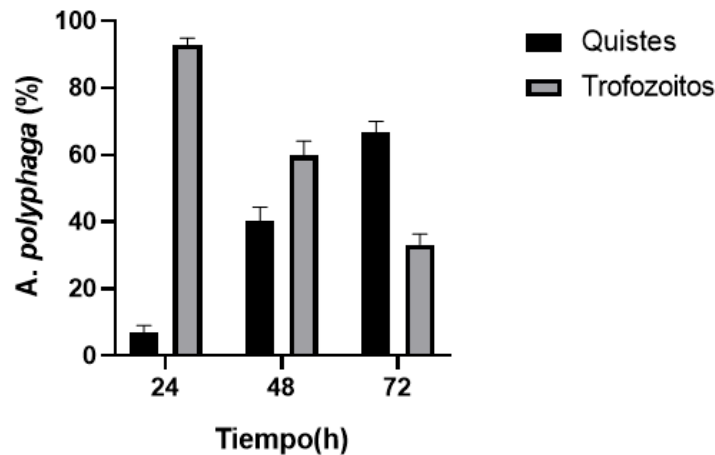


Figura 8. Enquistamiento de *Acanthamoeba* spp.. Trofozoitos (2.5×10^5 /mL) de *A. castellanii* o *A. polyphaga* fueron sembrados en medio de enquistamiento a 37 °C, posteriormente se determinó el porcentaje de quistes y trofozoitos a los diferentes tiempos. Promedio de $n=3 \pm SD$.

• *Desenquistamiento*

Para evaluar el porcentaje de desenquistamiento, se recuperaron las células a las 72 horas de iniciado el enquistamiento y se trataron con el detergente Tritón X-100 al 0.05 % para eliminar los trofozoitos remanentes. Las células recuperadas, quistes, se incubaron a 37 °C en medio PYG para iniciar con el proceso de desenquistamiento. En el análisis morfológico, se observó a partir de las 4 horas, la aparición de los trofozoitos emergiendo a través del ostiolo (Fig. 9), mientras que a las 12 horas se observaron una gran cantidad de trofozoitos.

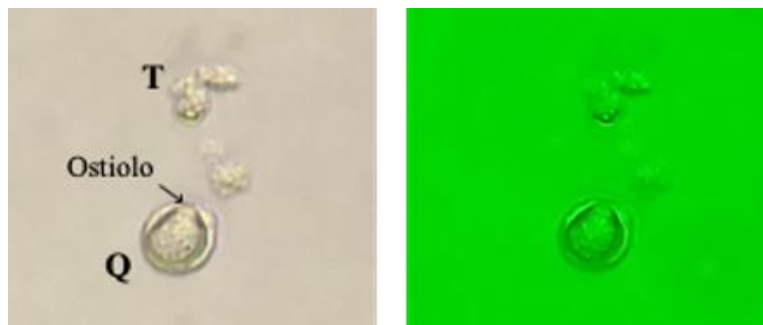


Figura 9. Análisis morfológico del desenquistamiento de *Acanthamoeba* spp., donde se observan desde las 4 h trofozoitos (T) y quistes (Q). En la micrografía de campo claro y contraste de fases (40X), se observa un quiste de *A. castellanii* representativo del evento de la emergencia de los trofozoitos a través del ostiolo.

Los resultados obtenidos del proceso de desenquistamiento (Fig. 10), indican que el porcentaje de trofozoitos presentes en PYG incrementó con respecto al tiempo. Como se había mencionado anteriormente, a las 4 horas se observó la emergencia de los trofozoitos en ambas especies, que al cuantificar corresponden al 25 % y 22 % de desenquistamiento para *A. castellanii* y *A. polyphaga* respectivamente. A las 12 horas el desenquistamiento alcanzó un valor cercano al 90 % en ambas especies, con una viabilidad celular del 100 %, mientras que a las 24 h se alcanzó un máximo de desenquistamiento (98 %) y viabilidad celular del 100 %.

- **Actividades enzimáticas durante la diferenciación amebiana**

Por otra parte, se realizó una determinación preliminar de la actividad de glicosidasas tales como la β -glucosidasa, β -xilosidasa y celobiohidrolasa (glucanasa), para analizar su participación durante el proceso de diferenciación de quiste a trofozoito. En los trofozoítos se ha descrito una actividad basal de α y β -glucosidasas (Deichmann & Jantzen, 1977; Lasman, 1975) y casi indetectable en los quistes (Amezola-Rivera, 2021). Por lo que se inició la determinación de actividades durante el proceso de desenquistamiento y, dada la cantidad de células disponibles en los primeros tiempos de la diferenciación amebiana, solo se realizó el ensayo a las 12 horas de iniciado el desenquistamiento. Los resultados indicaron una actividad total baja de β -glucosidasa en los trofozoítos de 12 horas para ambas especies, mientras que las actividades de β -xilosidasa y celobiohidrolasa no fueron detectadas.

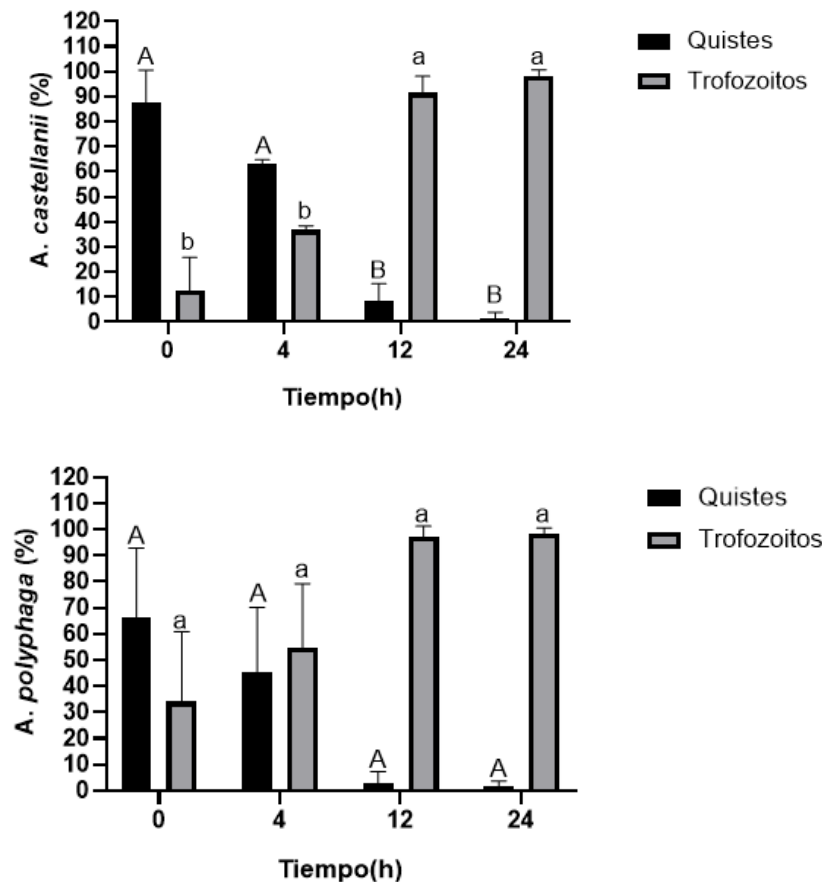


Figura 10. Desenquistamiento de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a 37 °C en medio PYG. Los valores representan la media \pm desviación estándar, Método de Tukey (n=9) *p \geq 0.05. Las medias que no comparten una letra (Trofozoítos a y b, Quistes: A y B) son significativamente diferentes (95% IC para la media).

Conclusión

La diferenciación de *Acanthamoeba* spp., ocurre en dos pasos: el enquistamiento y desenquistamiento. Ambas especies amebianas presentan la formación de quistes maduros a las 48 horas con una viabilidad celular del 100 %, sin embargo, difieren en cuanto al máximo porcentaje alcanzado, que para *A. castellanii* fue del 90 % y para *A. polyphaga* del 67 %. En cambio, el desenquistamiento procedió de manera muy similar

para ambas especies, alcanzando el 98 % con una viabilidad celular del 100 % a las 24 horas de colocados los quistes en medio de desenquistamiento. Este comportamiento sugiere diferencias en la formación de la pared celular entre ambas especies, lo cual se reflejaría en la expresión diferencial de las enzimas sintéticas y una semejanza muy grande en cuanto a las enzimas hidrolíticas que permiten que el desenquistamiento proceda de forma semejante en ambas especies.

Es necesario investigar el proceso de diferenciación en *Acanthamoeba* spp., en particular el papel de las glicosidasas para el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas para las enfermedades ocasionadas por este organismo.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con el proyecto número 233/2023, otorgado al Dr. Julio César Villagómez Castro en la convocatoria CIIC 2023 de la Universidad de Guanajuato.

Bibliografía

- Anderson IJ, Watkins RF, Samuelson J, *et al.* (2005). "Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome". *Protist*. 156(2):203-214.
- Arnalich-Montiel, F., Lumbreras-Fernández, B., Martín-Navarro, C. M., Valladares, B., Lopez-Velez, R., Morcillo-Laiz, R., & Lorenzo-Morales, J. (2014). Influence of *Acanthamoeba* genotype on clinical course and outcomes for patients with *Acanthamoeba* keratitis in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 52(4), 1213–1216
- Anwar, A.; Siddiqui, R.; Shah, M.R.; Khan, N.A. (2018). Gold Nanoparticle-Conjugated Cinnamic Acid Exhibits Antiacanthamoebic and Antibacterial Properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e00630-18.
- Clarke M, Lohan AJ, Liu B, *et al.* (2013). "Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling". *Genome Biol.*14(2): R11.
- Deichmann, U. y H. Jantzen (1977). "Das Cellulase enzyme system während Wachstum und Entwicklung von *Acanthamoeba castellanii*." *Archives of microbiology* 113(3): 309-313.
- Fouque, E., Trouilhé, M. C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M. H., & Hécharde, Y. (2012). Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryotic Cel.*, 11(4), 382–387.
- Hernández-Guzmán, A., Flores-Martínez, A., Ponce-Noyola, P., & Villagómez-Castro, J. C. (2016). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Sporothrix schenckii*. *FEBS Open Bio*, 6(11), 1067–1077.
- Lasman, M. (1975). "Glucosidase Activity in *Acanthamoeba* (Mayorella) *palestinensis*. The Effect of Glucose and Natural Glucosides on α - and β -Glucosidases." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 22: 435-437.
- Ledee, D.R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., Fell, J. *et al.* (2009). Molecular Identification of T4 and T5 Genotypes in Isolates of *Acanthamoeba* Keratitis Patients. *J. Clin. Microbiol.*, 47(5): 1458-1462.
- Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Piñero, J. E., & Valladares, B. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology*, 29(4): 181–187.
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. (2015) An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 22: 10
- Maciver, S.K.; Asif, M.; Simmen, M.W.; Lorenzo-Morales, J. (2013) A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *Eur. J. Protistol.* 49: 217–221.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16: 273-307.
- Moon, E.-K. y H.-H. Kong (2012). "Short-cut pathway to synthesize cellulose of encysting *Acanthamoeba*." *The Korean journal of parasitology* 50(4): 361-364.
- Moon, EK., Xuan, YH., Chung, DI., Hong Y y Kong HH. (2011). "Microarray analysis of differentially expressed genes between cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*". *Korean J Parasitol.* 49(4):341-347

- Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C y Kong, H. H. (2007). "Differentially expressed genes of *Acanthamoeba castellanii* during encystation". *The Korean journal of parasitology*, 45(4), 283–285.
- Niederhorn JY. (2021). The Biology of *Acanthamoeba* Keratitis. *Exp Eye Res.* 202: 108365.
- Rayamajhee, B., Subedi, D., Peguda, H. K., Willcox, M. D., Henriquez, F. L., & Carnt, N. (2021). A Systematic Review of Intracellular Microorganisms within *Acanthamoeba* to Understand Potential Impact for Infection. *In Pathogens.* 10(2).
- Risler, A., Coupat-Goutaland, B., & Pélandakis, M. (2013). Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Parasitology Research*, 112(11), 3807–3816.
- Siddiqui, R., Khamis, M., Ibrahim, T., & Khan, N. A. (2020). SARS-CoV-2: Disinfection Strategies to Prevent Transmission of Neuro pathogens via Air Conditioning Systems. *ACS chemical neuroscience*, 11(20): 3177–3179.
- Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2020). War on Terror Cells: Strategies to Eradicate "Novel Coronavirus" Effectively. *ACS chemical neuroscience*, 11(9): 1198–1199.
- Siddiqui R., Ridwane Mungroo M. & Khan N.A. (2021). SARS-CoV-2 invasion of the central nervous: a brief review, Hospital Practice, DOI: 10.1080/21548331.2021.1887677
- Stothard, D.R., Schroeder-Didrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A., and Byers, T.J. (1998) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45:45-54.
- Szentmáry N., Daas L., Shi L., Lenke Laurik K., Lepper S., Milioti G., Seitz B. (2019). *Acanthamoeba* keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *J. of Current Ophthalmology.* 31(1): 16-23
- Visvesvara, G.S.; Moura, H.; Schuster, F.L. (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50: 1–26.