



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

AISLAMIENTO DE AMIBAS DE VIDA LIBRE EN AMBIENTES INTRA Y EXTRAMUROS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O  
P R E S E N T A N :

LILIANA (URBAN MONTES  
NORA SORAYA VEGA MARTINEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS



MÉXICO, D. F.

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

**EN ESPECIAL A MIS PADRES POR LA PACIENCIA QUE SIEMPRE ME HAN DEMOSTRADO, POR ENSEÑARME A LUCHAR EN LA VIDA MOSTRÁNDOME QUE TODO SE PUEDE LOGRAR SI UNO SE ESFUERZA Y EN ESPECIAL POR SU GRAN AMOR. MUCHÍSIMAS GRACIAS POR TODO SU CARÍÑO Y COMPRESIÓN.**

**A MIS HERMANOS POR EL APOYO QUE ME BRINDARON DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.**

**A SERGIO POR LOS MOMENTOS DE AMOR Y FELICIDAD QUE ME HAS DADO Y POR TODO LO QUE TODAVÍA NOS FALTA POR COMPARTIR.**

## GRACIAS

Hoy doy las gracias a la vida, a Dios, a mis padres y familia,  
por haberme permitido culminar una de mis metas.

A Dios por concederme la vida hasta este día;  
y por darme los padres tan maravillosos que tengo.

Mis padres Porfirio y Teresa de los que he recibido;  
comprensión, tiempo, apoyo y confianza  
A ellos que han sacrificado su tiempo para nuestra felicidad.

Gracias a mis hermanos Julio, Suriel y karen por todo su apoyo, cariño y  
comprensión desde siempre;

A mis sobrinos: Darinka y Julio que con su alegría me impulsan a seguir adelante.

Y a Jesús mi amigo y esposo por todo su amor,  
apoyo y comprensión en todo momento.

Gracias a mi familia por toda la confianza que depositaron en mí para la culminación  
de este trabajo.

*Nora Soraya*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios por habernos permitido concluir el presente trabajo.

A nuestros compañeros de proyecto CyMA, en particular a nuestra asesora la Dra. Patricia Bonilla Lemus y al Sr. Luis Fernando por su ayuda durante la realización de este trabajo.

A nuestra amiga Luz por brindarnos su apoyo y estímulo para continuar y concluir el presente trabajo.

A nuestros amigos y compañeros de la carrera Leobardo, Alejandro, Juan Carlos, Jahaciél, Manuel.

A la Dra. Irma Rosas, Dr. Ignacio Guerra, Eva y Leticia por su colaboración en la realización del presente trabajo.

A nuestros revisores de tesis: Biól. José Antonio Martínez, Dra. Ma. del Rosario Sánchez, M. en C. Ángel Duran, Biól Ricardo Ortiz por su valiosa asesoría y acertadas sugerencias para mejorarlo.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios por habernos permitido concluir el presente trabajo.

A mis compañeros de proyecto CyMA, en particular a mi asesora la Dra. Patricia Bonilla Lemus y al Sr. Luis Fernando por su ayuda durante la realización de este trabajo.

A nuestra amiga Luz por brindarnos su apoyo y estímulo para continuar y concluir el presente trabajo.

A nuestros amigos y compañeros de la carrera Leobardo, Alejandro, Juan Carlos, Jahaciel, Manuel,

A la Dra. Irma Rosas, Dr. Ignacio Guerra, Eva y Leticia por su colaboración en la realización del presente trabajo.

A mis revisores de tesis: Biól. José Antonio Martínez, Dra. Ma. del Rosario Sánchez, M. en C. Ángel Duran, Biól Ricardo Ortiz por su valiosa asesoría y acertadas sugerencias para mejorarlo.

## CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Ciclos de vida y morfología de AVL.....	7
a) <i>Naegleria fowleri</i> .....	7
b) <i>Acanthamoeba</i> spp.....	9
c) <i>Balamuthia</i> .....	10
2.2. Infecciones por Amibas de Vida Libre.....	11
a) Meningoencefalitis amibiana primaria.....	11
b) Encefalitis amibiana granulomatosa.....	11
c) Queratitis amibiana.....	12
2.3. Ecología.....	14
2.4. Ubicación Taxonómica.....	15
3. ALERGIA.....	17
3.1. Respuesta inmune en la alergia.....	17
3.2. Alérgenos.....	18
4. OBJETIVOS.....	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
5.1. Recolección de muestras.....	23
5.2. Aislamiento y cultivos.....	24
a) Cultivo axénico.....	24
b) Cultivo monoxénico.....	25
5.3. Determinación taxonómica.....	25
a) Morfología.....	25

b) Análisis de Isoenzimas y Proteínas Totales. ....	26
5.4. Pruebas de Patogenicidad. ....	27
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>44</b>
ANEXO A . Preparación de Cultivos.....	50
ANEXO B. Técnica de isoelectroenfoque.....	54



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i> .....	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp .....	9
Figura 3. Aparato Multi-Stage Liquid Impigner.....	23
Figura 4. AVL encontradas en aire y polvo de ambientes intra y extramuros.....	31
Figura 5. Géneros de AVL encontradas en casas-habitación .....	32

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Clasificación taxonómica de las AVL patógenas para el hombre.....	16
Esquema 2. Diagrama de flujo de la metodología .....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro comparativo entre las 3 diferentes enfermedades producidas por AVL.....	13
Tabla 2. Total de AVL aisladas de AI y AE y prueba de tolerancia a la temperatura .....	30
Tabla 3. Total de AVL aisladas de las casas control y prueba de tolerancia a la temperatura.....	31
Tabla 4. Prueba de patogenicidad de las amibas del género <i>Acanthamoeba</i> aisladas .....	33

## RESUMEN

Se llevo un estudio para determinar la presencia de amibas de vida libre (AVL) tanto en ambientes extramuros como intramuros, así como su potencial patógeno. Se muestrearon 27 casas-habitación de niños con asma de la Ciudad de México, de las que se tomaron 3 muestras de aire de la habitación, una muestra de polvo y tres muestras de aire exterior. Adicionalmente, como control y en las mismas condiciones se tomaron muestras de cinco casas-habitación de niños sin asma.

Para tomar muestras de polvo en ambientes intramuros se utilizó una aspiradora doméstica (Koblenz) adaptada con filtros y para las partículas de aire se utilizó el aparato "Multi-Stage Liquid Impinger" con medio Basal Bold. Para ambientes extramuros se obtuvieron partículas de aire siguiendo el mismo procedimiento que en ambientes intramuros.

Se identificaron los aislamientos obtenidos a través del diagnóstico morfológico, tolerancia a la temperatura, pruebas de patogenicidad e isoelectroenfoque (IEF). Se recolectaron 189 muestras de aire y polvo de donde se obtuvieron 40 aislamientos distribuidos en 6 géneros y 18 especies. Del total, 31 corresponden al género *Acanthamoeba*; *Vahlkampfia* y *Guttunilopsis* con 3 aislamientos cada género, *Mayorella*, *Platyamoeba* y *Rusculus* con un solo aislamiento cada uno.

En la prueba de tolerancia a la temperatura, los 40 aislamientos presentaron una temperatura optima de 30 °C y tolerancia a 22 °C. Con respecto a la prueba de patogenicidad el 15% de las acanthamebas probadas durante este estudio, resultaron ser patógenas, aparentemente el porcentaje es bajo, sin embargo, debe considerarse que estos organismos son oportunistas y pueden causar EAG, MEAP y Queratitis.

Los resultados de este estudio demuestran que en ambientes intramuros también se encuentran AVL (estrechamente asociadas a polvo). Esto es de particular importancia ya que los individuos más susceptibles como es el caso de niños con asma, pasan la mayor parte del día en esos ambientes y en consecuencia existe un continuo y estrecho contacto con esas partículas y además de su posible papel como agentes alérgenos, por lo que es necesario considerar el potencial patógeno de algunas AVL.

## 1. INTRODUCCIÓN

La biota aérea está constituida por bacterias, virus, hongos, polen, algas y solo ocasionalmente se han reportado protozoos (Schlichting, 1970; Rivera *et al.*, 1987; Bonilla, 2000).

Los protozoos son organismos constituidos por una sola célula, que no forman órganos ni tejidos, de forma y tamaño variables (Jahn *et al.*, 1979); son organismos individuales o coloniales (dentro de la colonia los organismos conservan su individualidad) y muchos de ellos son cosmopolitas. Desde el punto de vista ecológico y evolutivo son unidades que interactúan con su medio ambiente y con otros organismos (Fenchel, 1987). Con referencia a los protozoos de vida libre se reporta que sus estadios vegetativos y tróficos se encuentran en todo tipo de ambiente: en el agua, suelo o materia orgánica en descomposición y su distribución abarca desde los polos hasta los trópicos (Martínez y Elías, 1985).

Los microorganismos viables en el aire pueden ser transferidos a la atmósfera ya sea desde el suelo o desde los cuerpos de agua. Los que son transferidos desde el suelo pueden originarse de fuentes y actividades humanas tales como el polvo generado por el tráfico, la suspensión del polvo de los edificios, de la superficie de las rocas, de los árboles y otras plantas (Rattenberg, 1939; Gregory, 1973). Las fuentes acuáticas pueden ser los mares, los ríos, los lagos, así como las plantas de tratamiento de aguas negras (Fannin, 1981).

En relación con los mecanismos de transferencia de microorganismos a la atmósfera existen ciertas películas de agua que se encuentran en la interfase agua-aire que contienen bacterias, hongos, protozoos y otros organismos que al impactarse como lluvia o nieve se produce una dispersión tanto vertical como horizontal de los mismos (Bandoni y Kosre, 1974).

El viento es otro factor ambiental responsable de la liberación y dispersión de los microorganismos en la atmósfera. Otro mecanismo de transferencia de microorganismos es la producción de burbujas de gas de manera natural e inducida por el hombre en los ecosistemas marinos y de agua dulce, estas burbujas absorben selectivamente materia orgánica y microorganismos y cuando entran en contacto con la parte superior del cuerpo de agua ocurre el rompimiento de la burbuja liberando a los microorganismos absorbidos, hacia la atmósfera. Tales burbujas pueden ser producidas por diversos factores como la lluvia y nieve impactándose en la superficie del agua o por el rompimiento de las olas (Rosas *et al.*, 1989).

Es importante señalar que algunos microorganismos de la atmósfera son capaces de sobrevivir por un período largo de tiempo en condiciones adversas tales como temperatura, presión y sequía extremas, a la radiación solar y a los contaminantes gaseosos (Lundholm, 1982), principalmente aquellas especies con capacidad de formar quistes (Rivera *et al.*, 1987).

La sobrevivencia de los protozoos en la atmósfera depende no solo de las condiciones micrometeorológicas en las masas de aire, sino también de las características morfológicas y fisiológicas que le son propias. Algunas especies pueden ser más favorecidas que otras, y esta selección natural puede restringirse para algunos organismos para colonizar un hábitat dado (Rivera *et al.*, 1988).

Por otro lado, el hombre en su ambiente está expuesto a innumerables agentes químicos y biológicos de origen natural o antropogénico, algunos de los cuales pueden penetrar al organismo de una manera imperceptible y pueden ser alérgenos ya que la inhalación de partículas viables puede desencadenar una reacción de tipo inmunológico, siendo muy común debido a que puede ser producida por diversas partículas cuyo tamaño varía de 5 a 15  $\mu\text{m}$ ; entre ellas se han identificado granos de polen, esporas de hongos, algas, enzimas bacterianas y polvo orgánico. El estudio de los alérgenos está basado en la identificación de proteínas y polisacáridos (Rosas *et al.*, 1997).

La mayoría de las enfermedades respiratorias registradas en ambientes intramuros ocurren principalmente en hospitales e industrias que presentan atmósferas contaminadas por agentes biológicos.

Existen enfermedades causadas por la inhalación de partículas infecciosas cuya fuente es el suelo, el agua o el detritus orgánico, de tal forma que el agente responsable se encuentra en forma libre, tal es caso de los hongos, algas, bacterias y los protozoos que se desarrollan en el suelo. Sin embargo, la mayor parte de información tanto de ambientes intramuros como extramuros ha sido generada sobre las enfermedades que producen los hongos y bacterias (Rosas *et al.*, 1997). En el caso de los protozoos, la información es muy escasa o la mayoría son inocuos, sin embargo, existen algunos que pueden producir patologías en los seres vivos, como es el caso de las amibas de vida libre (AVL) las cuales pueden producir Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), Encefalitis amibiana Granulomatosa (EAG) y Queratitis amibiana (QA) (Martínez y Visvesvara, 1997).

## 2. ANTECEDENTES

Probablemente la primera persona que recolectó protozoos viables del aire fue el naturalista italiano Spallanzani, quién en 1777 expuso un medio de cultivo estéril al aire y encontró protozoos, los cuales describió como "animáculos superiores"; Miquel en 1883 reportó de 0.1 a 0.2 "huevos" de protozoos / m<sup>3</sup> de aire aislados del observatorio del Montsouris, Paris (Schlichting, 1965).

Schlichting en 1964 tomó muestras del aire de Denton, Texas y Port Sanilac, Michigan U.S.A. por medio de filtros Millipore, aislando del suelo 33 especies de algas y protozoos (Schlichting, 1969). Entre las partículas se han descrito algas, bacterias, hongos y muy ocasionalmente protozoos (Schlichting, 1970; Edmons, 1979; Rosas *et al.*, 1986; Rivera *et al.*, 1987;).

Sobre la presencia de algas en la atmósfera pocos trabajos han sido realizados, destacándose los realizados por el Dr. H. Schlichting en Estados Unidos (1965, 1969, 1970). Se ha descrito que las fuentes de algas hacia la atmósfera son el suelo, la lluvia, el mar, plantas de tratamiento y agua dulce. Éstas se han colectado desde los 2 m hasta 2000 msnm, la mayoría de ellas se encuentran en estado vegetativo aunque también se han colectado esporas y quistes. Se ha demostrado que muchas algas microscópicas pueden sobrevivir en condiciones ambientales extremas aunque frecuentemente sufren cambios pleomórficos y fisiológicos (Schlichting y Bruton, 1970).

La atmósfera contiene bacterias de origen natural y de origen antropogénico. Se ha determinado que la emisión de bacterias del suelo hacia la atmósfera depende de las estaciones del año, la hora y las condiciones meteorológicas, ya que en superficies secas y calientes puede ocurrir transporte convectivo de partículas conteniendo bacterias las cuales se pueden encontrar en la capa de inversión atmosférica. Además, se ha demostrado que el número de bacterias de la atmósfera está relacionada con el contenido de partículas suspendidas en la misma y eso probablemente es debido a que este material sirve como sustrato o como protección a los microorganismos (Rosas y Roy Ocotla, 1985 ).

Los hongos son los componentes más abundantes del aire, éstos generalmente destacan entre otros grupos por su amplia gama de patrones de liberación activa de las esporas. Gran parte de las esporas liberadas se depositan cerca de la fuente y algunas son transportadas a grandes distancias; éstas últimas desempeñan un papel importante en algunas de

las enfermedades epidémicas y en la dispersión de los microorganismos (Edmons, 1979).

Los protozoos de vida libre presentan en general una distribución cosmopolita debido a su tamaño pequeño, a la facilidad de su transportación y a la formación de quistes, característica que les permite invadir ambientes distintos del original. Generalmente habitan en ambientes húmedos como el suelo y el agua, también pueden encontrarse en el aire en forma de quistes, que son formas de resistencia a condiciones adversas como a las que se encuentran sometidos durante su transporte por el aire (Rivera *et. al.*, 1987; 1992; 1994; Bonilla, 2000). Los mecanismos de dispersión de estos microorganismos son básicamente los mismos que las de bacterias y los hongos anteriormente descritos.

En México el estudio de la Aerobiología se inició en 1982 en el centro de Ciencias de la Atmósfera, en donde se han realizado diversos estudios en relación a algas, bacterias y hongos. Y al mismo tiempo el Dr. Rivera y su grupo de la FES Iztacala se abocó al estudio de los protozoos especialmente de las amibas patógenas de vida libre en el aire (Rivera *et al.*, 1987; 1988; 1992; Rosas y Roy Ocotla, 1985; ).

En el año de 1987 Rivera y cols. publicaron un artículo del análisis que se realizó en el periodo de Junio a Agosto de 1982 en el cual se encontraron en la atmósfera diversas especies de AVL que incluyen *Naegleria sp.*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *Vahlkamfia jugosa*, *V. ustiana*, *V. russellii*, *V. ovis*, *Saccamoeba stagnicola*, *Hyalodiscus sp*, *Platyamoeba placida*, *Rugipes sp*, *Vannella platypodia* y *Leptomyxa flabellata*. Las especies de *Naegleria*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni* y *A. castellanii* fueron patógenas en ratón. En 1992 Rivera *et al.* reportaron un estudio realizado en los 4 puntos cardinales de la ciudad de México en donde se reportaron 63 cepas de distintos protozoos, en el cual no se incluyeron amibas de vida libre. En 1993 Rodríguez *et al.* realizaron un estudio de la atmósfera de San Luis Potosí, en el cual obtuvieron 57 aislamientos de AVL de las cuales el 36% fue *Acanthamoeba* spp. el 16% de *Hartmannella* spp. el 9% de *Vahlkamfia* spp.

Bonilla (2000) realizó un muestreo, durante un año de la atmósfera de la Cd. De México y área metropolitana, para determinar la distribución espacial y temporal, así como la patogenicidad de las AVL aisladas.

Por otro lado, varios autores (Rosas y Roy Ocotla, 1985; Ramos y Canseco, 1994; Frenz, 1999 ), han encontrado asociación entre la presencia

de bacterias, hongos, polen y esporas en ambientes intramuros con enfermedades de tipo alérgico. En 1994 se realizó un estudio sobre hipersensibilidad a alérgenos aerotransportados en la región central de Coahuila, en el cual se determinó la frecuencia de aeroalergenos (granos de polen, hongos así como cierto tipo de alimentos) y sensibilización de la comida a través de ensayos alérgicos a piel y ensayos múltiples de sistemas de alergia.

Nunca se han realizado estudios de este tipo sin embargo en relación con los protozoos, es muy probable que se encuentren en este ambiente debido a que las condiciones ambientales como temperatura y humedad, son adecuadas; por lo que es importante realizar estudios de la presencia de AVL en ambientes intramuros debido que a la mayor frecuencia y exposición a alérgeno se dan en esos ambientes y los individuos más susceptibles por ejemplo, niños con asma, pasan la mayor parte en ambientes intramuros. Además de su posible papel como agentes alérgenos, es necesario considerar el potencial patógeno de las AVL.

## 2.1. CICLOS DE VIDA Y MORFOLOGÍA

Hasta la fecha se han descrito solamente 3 géneros de AVL patógenas

Los ciclos de vida de las amibas de vida libre incluyen un estadio de trofozoíto que se alimenta y se reproduce y una fase quística, como forma de resistencia; en el caso de *Naegleria* además del quiste y trofozoíto se presenta un estadio flagelar temporal. Los ciclos de vida más característicos son los siguientes:

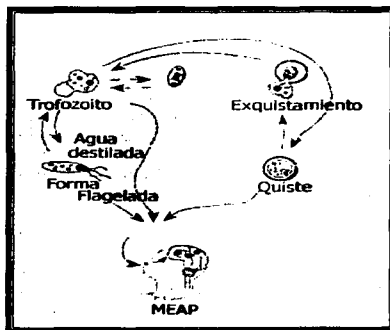
### a) *Naegleria*

El término ameboflagelado es utilizado para describir las amibas que pueden presentar formas flageladas. Cuando los trofozoítos del género *Naegleria* son puestos en un medio no nutritivo como agua destilada o soluciones amortiguadoras, se diferencian en una fase transitoria flagelada que no se alimenta ni se divide. En condiciones adversas, los trofozoítos se enquistan y de esa manera sobreviven hasta por meses.

La fase invasiva de *Naegleria fowleri* es el trofozoíto y la infección se adquiere por la aspiración nasal de aguas contaminadas con estos organismos. Los trofozoítos invaden la mucosa nasal, la placa cribosa y los bulbos olfatorios del cerebro.

Se piensa que las formas flageladas o los quistes de *N. fowleri* pueden entrar a la nariz de un nadador tan fácilmente como los trofozoítos. En la mucosa nasal los quistes y las formas flageladas pueden revertirse rápidamente a trofozoítos, para iniciar la invasión. Los flagelos o quistes de *N. fowleri* nunca se han encontrado en los tejidos o fluido cerebro espinal del huésped (fig.1) (John, 1993).





TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fig 1. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*** (Modificada de Martínez y Visvesvara, 1997)

Los trofozoítos de las diferentes especies de *Naegleria* son muy similares y son conocidos como amibas limax; son de forma alargada y se mueven de manera unidireccional por medio de un pseudópodo eruptivo, llamado lobópodo. El núcleo posee un denso y esférico nucleolo central o cariosoma y una membrana nuclear sin cromatina granular. El trofozoito de *N. fowleri* en movimiento mide aproximadamente 22  $\mu\text{m}$  de longitud (intervalo de 15 a 30  $\mu\text{m}$ ). En forma inactiva es redondeada y tiene un ámbito de 9 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Carter, 1970; Page, 1988).

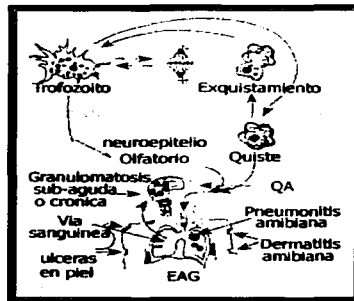
La reproducción de este organismo es por fisión binaria. La división nuclear es promitótica, lo cual significa que el nucleolo y la membrana nuclear persisten durante la división nuclear (cariocinesis). El nucleolo se alarga formando una estructura en forma de pesas y se divide en dos masas polares, posteriormente se convertirán en el nucleolo de cada una de las dos nuevas amibas (Page, 1988).

Temporalmente se presenta la forma flagelada cuando las condiciones en el ambiente son adversas, el flagelado típico es una célula de forma periforme, con dos flagelos que emergen debajo del *rostrum* anterior (Page, 1988; John *et al.*, 1991).

El quiste de *N. fowleri* es esférico, con un diámetro entre 7 y 15  $\mu\text{m}$  (Page, 1988). En quistes analizados con la técnica de microscopía electrónica se observan al menos dos poros u ostiolas con tapón. Una pared relativamente delgada, característica que hace a esta especie muy susceptible a la desecación (John y De Jonckheere, 1985).

### b) *Acanthamoeba*

Los dos estadios del ciclo de vida (trofozoito y quiste) de *Acanthamoeba* se pueden encontrar en tejido humano.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2 Ciclo de vida de *Acanthamoeba* sp (Modificado de Martínez y Vivesvara, 1997)

La forma más característica de este grupo de organismos son los acantópodos (del Griego *acanth* que significa espina) que son pseudópodos afilados como púas. *Acanthamoeba* tiene un movimiento lento con un frente ancho sin dirección definida. Tiene una longitud entre 24 y 56  $\mu\text{m}$ . La división nuclear es metamitótica, es decir, que durante la cariocinesis el nucleolo y la membrana nuclear se desintegran (John, 1993).

La morfología de los quistes de las diferentes especies es muy variable. Está compuesto por una doble pared, el ectoquiste que es la pared externa y el endoquiste o pared interna, lo que les confiere una gran resistencia en el medio ambiente. El quiste puede ser arrugado o liso, el tamaño del quiste se encuentra entre 11 y 25  $\mu\text{m}$  (Page, 1988).

**c) *Balamuthia***

El ciclo de vida de *Balamuthia* consta únicamente de un estadio trófico y un quístico. Su comportamiento como organismo patógeno es muy semejante al de *Acanthamoeba*, aunque es de evolución más crónica (Visvesvara *et al.*, 1993).

El trofozoito es uninucleado, ocasionalmente binucleado, con un núcleo vesicular que mide alrededor de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y un denso nucleolo central. En estado trofozoito mide de 12 a 60  $\mu\text{m}$  de longitud con un promedio de 30  $\mu\text{m}$ . La forma de los trofozoitos es irregular y también adopta la forma limax; se mueve por medio de lobópodos o adaptando una forma de araña con numerosos pseudópodos no ramificados; se divide por mitosis. Durante la primera fase de la división el nucleolo y la envoltura nuclear permanecen intactos.

Los quistes son redondos, aunque pueden encontrarse formas ovales, es uninucleado, ocasionalmente binucleado. En estado maduro presenta tres paredes. La pared interna (endoquiste) es densa y uniforme, rodeada por una capa delgada y ondulada. El ectoquiste es delgado, ondulado e irregular, con apariencia rugosa en los quistes maduros. Entre las dos paredes, se encuentra el mesoquiste que es un espacio de dimensiones variables ocupado por una red de fibras amorfas. Su tamaño se encuentra entre 6 y 30  $\mu\text{m}$  con un promedio de 15  $\mu\text{m}$  y no presenta poros (Visvesvara, *et al.*, 1993).

## 2.2. INFECCIONES POR AMIBAS DE VIDA LIBRE

### a) Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP)

La meningoencefalitis amibiana primaria es producida por *Naegleria fowleri*, la cual es una enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal. Debido a que la invasión es muy rápida hay necrosis, hemorragias de gran parte del encéfalo (Martínez, 1985, 1993). Los signos y los síntomas de la MEAP consisten en severo dolor de cabeza, fiebre, anorexia, seguido de náusea, vómito, disturbios en el sentido del olfato y gusto (John, 1993).

El curso clínico se caracteriza por confusión mental, pérdida del apetito, visión doble o borrosa y alucinaciones, coma profundo y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren dentro de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como de la virulencia de las amibas (Martínez y Visvesvara, 1997). El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana; sin embargo, en la infección por *Naegleria* la mayoría de los casos han tenido como antecedente la natación en época calurosa de personas sanas y jóvenes. El diagnóstico se confirma con el aislamiento de las amibas en el líquido cerebroespinal o del tejido de biopsia cerebral. El tratamiento contra *Naegleria fowleri* es el antimicótico Anfotericina B (Martínez, 1985; John, 1993 Martínez y Visvesvara 1997).

### b) Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) tiene como agente etiológico a *Acanthamoeba culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. palestinensis*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis* y *A. hatchetti* (Martínez, 1993). La EAG presenta un largo curso clínico con signos y síntomas neurológicos dependiendo del sitio que se encuentre dañado por los trofozoítos. Se presenta primordialmente en pacientes crónicamente debilitados por otro padecimiento, en pacientes bajo tratamiento inmunodepresivo o que tienen comprometidos los mecanismos inmunológicos, incluyendo pacientes con SIDA (González *et al.*, 1986; Anzil *et al.*, 1991). Entre los síntomas más relevantes se incluyen alteraciones del estado mental como alucinaciones, letargia, somnolencia y cambios en la personalidad (John, 1993).

El cuadro clínico puede confundirse con tuberculosis cerebral, encefalitis viral, cáncer y absceso cerebral. El aislamiento de los trofozoítos o quistes de las lesiones o del líquido cerebroespinal confirma el diagnóstico (John, 1993; Martínez, 1985).

En la actualidad el tratamiento no ha sido exitoso, a pesar que se han hecho estudios de diferentes fármacos. El ketoconazol y clotrimazol han demostrado cierta efectividad contra *Acanthamoeba* en estudios *in vitro* aunque no se ha confirmado su efectividad en humanos ( Martínez, 1993).

### c) Queratitis Amibiana (QA)

Las especies asociadas a Queratitis son *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti* y *A. rhyssodes*. Es una infección de la córnea, la cual puede causar la pérdida del ojo si no es tratada adecuadamente. Esta infección se presenta en pacientes jóvenes sanos y principalmente entre usuarios de lentes de contacto (Omaña, 1997). Los síntomas mas relevantes son dolor agudo generalmente unilateral, algunas veces con enrojecimiento, irritación con sensación de cuerpo extraño. Es una enfermedad que puede ser confundida con queratitis micótica o herpes simple. Su diagnóstico se puede confirmar con un raspado de la córnea y tiñendo el material con tinciones de Giemsa tricrómica, Wright, blanco de calcofluor entre otras y observando con el microscopio (Silvany *et al.*, 1987; Stehr-Green *et al.*, 1989).

Hasta estos días se ha estado utilizando Ketoconazol, Miconazol, Isotionato de propamidina, Itraconazol con muy pocos resultados positivos debido a las características de resistencia de las amibas (Martínez y Visvesvara, 1997; Omaña, 1997)

**Tabla 1. Cuadro comparativo entre las 3 diferentes enfermedades producidas por AVL ( Martínez and Visvesvara 1997).**

CARACTERÍSTICAS	EAG	MEAP	QA
Agente etiológico	<i>Acanthamoeba</i> spp. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> , <i>A. culbertsoni</i> , <i>A. rhyssodes</i> , <i>A. polyphaga</i> , <i>A. hatchetti</i>
Factores Predisponentes	SIDA, debilitamiento crónico	Previa buena salud, exposición a polvo y agua contaminados.	Buena salud, traumatismo corneal, uso lentes de contacto contaminados.
Epidemiología	Distribución mundial, cualquier época del año.	Distribución mundial, en los meses de calor.	Distribución mundial, cualquier época del año.
Vías de entrada	Pulmones, piel y neuroepitelio olfatorio.	Neuroepitelio olfatorio	Abrasión corneal.
Curso Clínico	Agudo o crónico; Fatal 100%	Agudo con muerte fulminante. Fatal 98%.	Agudo y crónico.
Signos y síntomas clínicos	Confusión, somnolencia parálisis de nervio craneal, mareo, náusea, irritabilidad, dolor de cabeza	Dolor de cabeza, náusea, vómito, rigidez del cuello, fiebre, coma.	Molestia ocular, dolor ocular severo, visión borrosa.
Diagnóstico Diferencial	Meningitis bacteriana aguda.	Tumores en cerebro, abscesos, meningitis, hematomas cerebrales	Queratitis viral, queratitis bacteriana o por hongos.
Tratamiento	Ketoconazol, Itraconazol, Miconazol, Sulfametazina, Pentamidina IV y tópica, Gluconato de Cloroexidina.	Anfotericina B.	Biguamida de polixametileno, Isotonato de Propamidina.

### 2.3. ECOLOGÍA

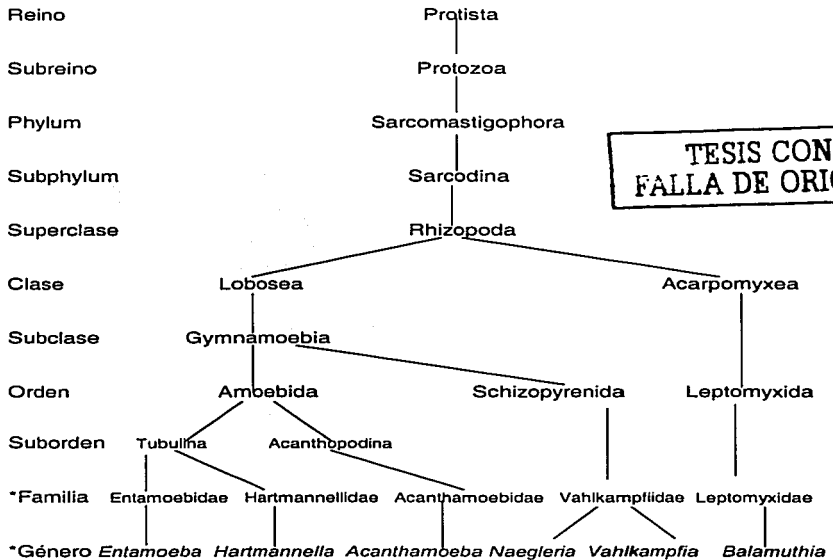
Las AVL son habitantes comunes del suelo y del agua, donde juegan un papel importante dentro del ciclo de los nutrientes (Fenchel, 1987)

Los quistes pueden sobrevivir a la sequía, cambios de pH y falta casi total de oxígeno. En forma de quiste las AVL pueden ser acarreadas hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas de aire (Rivera *et al.*, 1987,1994; Rodríguez *et al.*, 1993). El tiempo y la distancia a la que pueden transportarse en la atmósfera depende de la altura y el tamaño que posean. En general las partículas de un diámetro mayor a 20  $\mu\text{m}$  sedimentan casi de inmediato y su área de distribución es aproximadamente de 100 m, mientras que las partículas de 10 a 20  $\mu\text{m}$  pueden permanecer por un tiempo mayor y dispersarse más ampliamente. Lo anterior tiene importancia porque la mayoría de las especies de AVL tienen tamaño pequeño y pueden ser acarreadas por el viento a través de grandes distancias (Rondanelli, 1987).

Las temperaturas extremas a las cuales las AVL son capaces de sobrevivir están por debajo de los 4°C y algunas pueden sobrevivir a temperaturas mayores de 45 °C (De Jonckheere, 1981).

## 2.4. UBICACIÓN TAXONÓMICA

Esquema 1. Ubicación Taxonómica de las AVL patógenas para el hombre  
(Levine *et al.*, 1980)



\* De acuerdo a Lee *et al.*, 1985 y Page, 1988.



Durante mucho tiempo se dieron diferentes nombres a una misma especie amibiana y frecuentemente las descripciones eran incompletas y erróneas ya que estaban basadas principalmente en la morfología. Page, uno de los más importantes estudiosos de las gimnamebas (amibas desnudas) describió 8 especies nuevas desde el punto de vista morfológico, en 1974; en 1976 sintetizó los datos disponibles hasta esa fecha y elaboró una clave taxonómica para gimnamebas del suelo y de agua dulce. En 1988 publicó una nueva versión de la misma y, aunque es muy completa, es conveniente mencionar que el desarrollo de la clave no siguió fielmente los criterios taxonómicos expresados por la Sociedad de Protozoólogos en 1980 (Bonilla, 2000).

La microscopia de luz transmitida sigue siendo una herramienta básica, pero la microscopia electrónica ha contribuido de manera muy importante en la taxonomía e identificación de las AVL. En este campo, John (1993) destaca por su importancia, los trabajos de Vickerman (1962), Schuster (1969, 1975, 1977), Willaert & Le Ray (1973), Visvesvara y Callaway (1974), Lastovica (1975) y Rondanelli *et al.*, (1976).

El análisis de isoenzimas es todavía el método más ampliamente utilizado (De Jonckheere, 1982, 1983, 1987; John, 1993). Mediante esta técnica, se han logrado detectar patrones enzimáticos distintivos de cada especie, especialmente del género *Acanthamoeba* y *Naegleria*, debido al potencial patógeno de algunas especies.

### 3. ALERGIA

La alergia es consecuencia de una enfermedad provocando una reacción inflamatoria desencadenada contra antígenos ambientales (alérgenos)(Stites, 2000).

#### 3.1. RESPUESTA INMUNE EN LA ALERGIA

El sistema inmune es un mecanismo de defensa de nuestro organismo que actúa contra la agresión de los microorganismos que nos rodean. Está conformado por un conjunto de células y moléculas que nos protege de infecciones y elimina moléculas nocivas originadas por el envejecimiento, su función es esencial para la vida y permite a los seres vivos preservar su integridad e identidad (Rojas y Cano, 2001).

La respuesta inmune alérgica hacia un antígeno determinado (alérgeno), es uno de los desórdenes inmunológicos más comunes que pueden ocurrir en una de cada 10 personas (Quan, 1994).

El fenómeno alérgico ocurre cuando un individuo es expuesto a un alérgeno, generándose una respuesta inmune conocida como sensibilización. La magnitud de la respuesta hacia el alérgeno depende de la dosis de exposición, la ruta de exposición, el tipo de partícula y la predisposición genética del individuo (Paul, 1993).

Una vez que ocurre la sensibilización, el individuo permanecerá asintomático hasta que tenga nuevamente exposición al alérgeno con el que fue sensibilizado desarrollándose la fase efectora en la cual el alérgeno reaccionará con anticuerpos (acs) específicos o con linfocitos T efectores. Ambos mecanismos serán los responsables de producir los signos y síntomas de la reacción alérgica (Abbas, 1994).

### 3.2 ALÉRGENOS

Se denomina alérgeno a la sustancia que produce síntomas de hipersensibilidad inmediata con producción elevada de anticuerpos (acs) IgE. Los alérgenos inducen sensibilización por su exposición en el tracto respiratorio nasal. Los alérgenos son proteínas o glicoproteínas derivadas de una gran variedad de sustancias particuladas. Dichos alérgenos pueden estar contenidos en semillas de plantas, partículas reproductivas de hongos, algas, bacterias, pólenes, protozoos, en el pelo de perros y gatos, en desechos biológicos, incluyendo desechos de mamíferos y emanaciones de artrópodos (ácaros). Estas moléculas pueden ser aerosolizadas y transportadas en la atmósfera (Paul, 1993). Su presencia está determinada localmente por factores como el uso de la tierra, temperatura, humedad, ciclos de crecimiento de plantas y la presencia de animales en las distintas regiones (Middlenton, 1993).

La gran mayoría de los alérgenos inhalables provienen de fuentes naturales, como la flora y la fauna regionales, varían dependiendo de la época del año por lo que son estacionales; este tipo de alérgenos incluyen a los pólenes y esporas de hongos. Otros tipos importantes de alérgenos, son los generados por el hombre a través de prácticas domésticas y laborales incluyendo ácaros de polvo, esporas de hongos y tal vez protozoos (Rosas *et al.*, 1998)

El aire contiene numerosos agentes nocivos e irritantes, incluyendo partículas gaseosas, tales como óxidos de nitrógeno, azufre y ozono, así como alérgenos de tipo biológico como restos de ácaros de polvo doméstico, restos de cucarachas, polen, hongos, etc. El asma es la principal manifestación clínica del pulmón provocada por la inhalación de tales contaminantes ambientales. Esta exposición también condiciona el desarrollo de las diversas formas de rinitis alérgicas (Heinrich *et al.*, 1998).

Los aeroalérgenos más frecuentemente asociados al asma y la rinitis alérgica se encuentran en el interior de los domicilios o lugares de trabajo, es decir, en ambientes intramuros, mientras que aquellos vinculados con molestias alérgicas estacionales proceden del medioambiente exterior. Entre los primeros se han descrito los siguientes:

#### **Ácaros del polvo doméstico**

El polvo del interior de las casas es la fuente principal de los alérgenos. Está formado por materia inorgánica y orgánica incluyendo fibras de distinto origen, hongos, bacterias, enzimas, pólenes, insectos, pelos de animales y

ácaros. Los ácaros del polvo doméstico constituyen en nuestros días la principal fuente de alérgenos en todo el mundo, alcanzando su mayor desarrollo en áreas tropicales y subtropicales con hábitos sociales occidentalizados (Middleton *et al.*, 1992).

Los ácaros domésticos son artrópodos, relacionados con las arañas y escorpiones, que tienen un tamaño microscópico de aproximadamente 0.3  $\mu\text{m}$ , ocho patas, son ciegos y viven de escamas de piel y otros detritos. Crecen en un rango de temperatura muy estrecho de 23 a 25°C y mueren cuando son sometidos a temperaturas inferiores a los -20°C durante 24 horas. Cuando disminuye la humedad relativa del ambiente, se refugian en la profundidad de las alfombras, colchones y almohadas, donde pueden permanecer vivos durante meses. Los ácaros excretan sus alimentos parcialmente digeridos y enzimas digestivas en forma de partículas fecales muy pequeñas, que contienen a los principales alérgenos que aspiramos cotidianamente (Middleton *et al.*, 1992).

#### Hongos

Los hongos, se reproducen por esporas que a semejanza de los granos de polen, pueden ser arrastradas por el viento. Habitualmente se desarrollan a partir de fuentes intradomiciliarias (restos de alimentos, escamas, papel, plantas ornamentales, cortinas de baños, sótanos, tuberías de aire), y extradomiciliarias (cultivos y depósito de granos, pastos y hojas muertas, basureros, deyecciones animales). La humedad ambiental es un elemento crítico para el desarrollo de los hongos. Sin embargo, aún con aire seco, los hongos pueden encontrar suficiente agua libre en áreas frías de condensación, suelos húmedos y superficies de hojas. El viento seco promueve la dispersión de numerosas esporas durante la tarde de días soleados (Lawlor y Fischer, 1985).

#### Pólenes

Los pólenes, para que sean considerados como causantes de alergias, deben reunir una serie de características:

- ser livianos.
- liberarse en cantidad suficiente.

Menos del 10% de las especies vegetales que florecen liberan pólenes al aire para que sean transportados por el viento. Los pólenes de las plantas se hallan concentradas en regiones templadas. Los pólenes dispersados por el aire presentan un tamaño muy pequeño para facilitar su

transporte y dispersión por la corriente aérea. La temperatura, humedad y velocidad del viento afectan notablemente la descarga de polen. El aire seco y caliente del mediodía y la tarde produce picos de emisión, aunque para las gramíneas y malezas éstos pueden ocurrir en las primeras horas de la mañana. La lluvia, la niebla y las temperaturas inferiores a 10°C suprimen la liberación de polen (Lawlor y Fischer, 1985).

#### **Insectos**

Algunos insectos son fuente importante de alérgenos respirables. Los más estudiados corresponden a las especies de cucarachas más frecuentes en el interior de las viviendas. La cucaracha alemana (rubia) y la americana (marrón), son las más comunes en Estados Unidos de Norteamérica, Europa y Sudamérica. La acumulación de alérgenos de cucaracha en las casas ocurre principalmente en la cocina, aunque pueden encontrarse cantidades significativas en otras habitaciones. Tanto los restos corporales como las heces de estos insectos, al igual que los ácaros del polvo, contienen alérgenos. La sensibilidad a alérgenos de cucaracha es más frecuente en zonas urbanas y se ha relacionado con grupos de bajos recursos económicos

#### **Animales domésticos**

Los gatos y perros aportan una fuente de exposición inmediata en los domicilios y dado que sus alérgenos son fácilmente transportables, también es posible la exposición en lugares públicos y escuelas. Los alérgenos de los gatos se encuentran principalmente en la saliva, piel y pelo. Una gran proporción de ellos se encuentra dispersa en el aire en partículas microscópicas que resultan muy difíciles de eliminar. En el perro, las fuentes principales de alérgenos son el pelo, la piel y la saliva, siendo también fácilmente transportados adheridos a las vestimentas (Stites *et al.*, 2000).

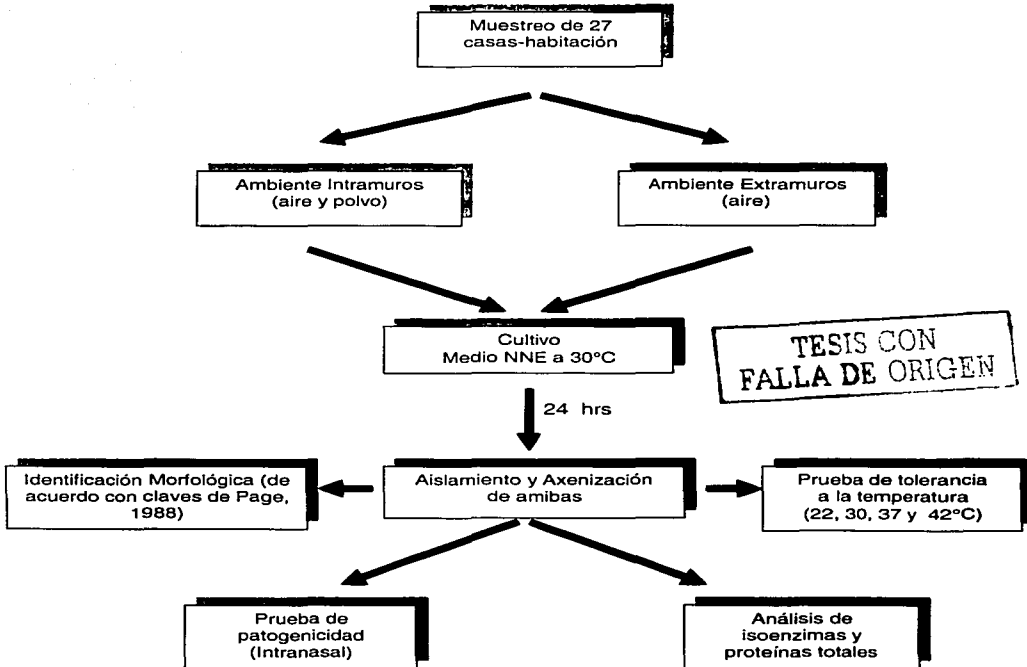
#### **4. OBJETIVO GENERAL**

- **Determinar la presencia de amibas de vida libre en ambientes intramuros y extramuros.**

#### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- **Recolectar muestras de polvo y de aire tanto intra como extramuros de casas-habitación de la Ciudad de México de individuos con asma.**
- **Aislar las amibas de vida libre encontradas en medios axénicos.**
- **Identificación morfológica de las amibas de vida libre encontradas.**
- **Determinar el potencial patógeno de las amibas aisladas.**
- **Determinación de isoenzimas y proteínas totales de las amibas potencialmente patógenas.**

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS



Esquema 2. Diagrama de flujo

### 5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.

Para determinar la presencia de amibas de vida libre en ambientes intramuros (AI) y extramuros (AE), se tomaron muestras tanto de polvo como de aire de 27 casas-habitación de niños asmáticos, entre 8 y 12 años.

En ambientes intramuros se utilizó una aspiradora doméstica (Koblenz) adaptada con filtros para obtener polvo y para las partículas de aire se utilizó el aparato "Multi-Stage Liquid Impinger" (MSLI)(Fig. 3) con medio líquido Basal Bold (Anexo A). El MSLI es un aparato que simula el sistema respiratorio, consta de 3 etapas:

Primera etapa: Es la parte superior, el diámetro del poro es mayor a  $10 \mu$ , representa la zona nasal humana.

Segunda etapa: Es la parte intermedia, el diámetro del poro va de  $4-10 \mu$ , representa a la región de los bronquios.

Tercera etapa: Es la parte inferior, el diámetro del poro es menor a  $4 \mu$ , representa la región de los alveolos.

El flujo del aparato filtra  $20 \text{ L/min}$ . En este estudio se filtró aire durante 30 minutos, es decir, se filtraron 600 litros de aire por sitio de muestreo. La muestra se recolectó de la recámara, colocando  $5 \text{ ml}$  de medio Bold en cada una de las etapas de aparato.

Para ambientes extramuros solo se obtuvieron partículas de aire siguiendo el mismo procedimiento que en ambientes intramuros.

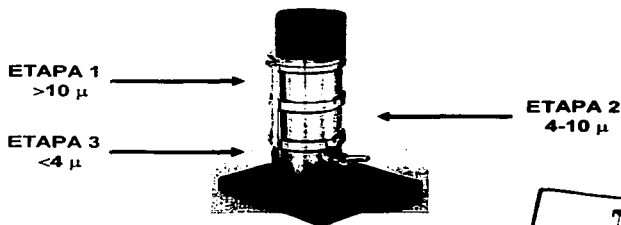


Figura 3. Multi-Stage Liquid Impinger

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



De cada una de las 27 casas, se tomó lo siguiente:

- Tres muestras del aire de la habitación del niño con asma (una muestra en cada etapa del MSLI).
- Una muestra compuesta de polvo: del piso, colchón, debajo de la cama y ropa de la cama de la habitación del niño.
- Tres muestras de aire exterior de cada una de las casas.

Adicionalmente, como control y en las mismas condiciones se tomaron muestras de cinco casas-habitación de niños sin asma.

## 5.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO

### a) CULTIVO MONOXÉNICO

Las muestras de polvo (0.5 g) se distribuyeron en la superficie de medio agar no nutritivo con *Escherichia coli* muerta (NNE) (Anexo A)( De Jonckheere, 1980; Rivera *et al.*,1994).

Las cajas Petri se guardaron en bolsas de plástico y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación las cajas Petri se observaron diariamente durante 15 días con un microscopio invertido (Zeiss, Mod. D.) con oculares 10x y objetivos de 10x y 20x; de cada caja se separaron las colonias de amibas, se resembraron nuevamente en medio NNE y se incubaron a la misma temperatura. Ya libres de hongos, bacterias u otros organismos, se transfirieron a medios axénicos.

Las muestras de aire contenidas en el medio líquido Basal de Bold se incubaron a temperatura ambiente durante 30 días para la rehidratación de los quistes y posteriormente se centrifugaron a 4500 gravedades durante 15 minutos; se desechó el sobrenadante y el concentrado se distribuyó en medio NNE y se empleó el mismo procedimiento de las muestras de polvo.

### b) CULTIVO AXÉNICO

De los cultivos monoxénicos se seleccionó una zona con abundante crecimiento amibiano en estado de trofozoito, se cortaron cuadrillos de medio NNE de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se transfirieron a tubos de cultivo con medio Chang modificado (PBSGM) (Anexo A). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente en posición inclinada y el crecimiento amibiano se observó en el microscopio invertido.

Debido a que algunas amibas no crecen en el medio PBSGM se probaron los siguientes medios de cultivo axénicos: medio Bactocasitona (BC) al 2%, medio líquido Ringer con *E. coli* inactivada (Page,1988; Martínez y Visvesvara,1997).

### 5.3. DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA

#### a) MORFOLOGÍA

La determinación morfológica de las amibas se realizó con ayuda de un microscopio de contraste de fases (Zeiss Mod. III), mediante la observación y medición *in vivo* tanto de trofozoítos como de quistes. Se realizaron preparaciones de cultivos axénicos o monoxénico (cajas de agar NNE) por barrido con solución salina de Page y utilizando las claves taxonómicas de Page (1976, 1988).

**Morfometría:** Se hicieron preparaciones en fresco en laminillas de vidrio y se observaron en contraste de fases a un aumento de 400x. Se registró la medida de 50 trofozoítos (largo, ancho) y de 50 quistes (diámetro), incluyendo el promedio (Page, 1988).

**Transformación ameboflagelar:** Esta prueba se realizó con todas las amibas aisladas, excepto las que evidentemente pertenecían al género *Acanthamoeba*. Este procedimiento consiste en colocar aproximadamente 0.5 ml de agua destilada o solución Ringer (Page, 1988) en la superficie de una caja de NNE que presenta abundante crecimiento amibiano en estado de trofozoito, la cual se incubó a 37°C. Se observa con un microscopio invertido cada 30 min. por lo menos durante 8 horas o hasta que se observe la forma flagelada.

**Tolerancia a la temperatura:** Esta prueba se realizó para conocer la temperatura máxima y óptima de crecimiento de las amibas aisladas. Cada uno de los aislamientos se sembró en medio NNE y se incubó a diferentes temperaturas (22, 30, 37 y 42°C) por triplicado. Se observaron las placas con el microscopio invertido durante una semana para verificar el desarrollo amibiano.

## **b) ANÁLISIS DE ISOENZIMAS Y PROTEÍNAS TOTALES**

Esta prueba se utiliza para verificar el diagnóstico morfológico de las amibas y así, establecer un diagnóstico más preciso que permita ubicarlas a nivel de especie. Se basa en la comparación de patrones enzimáticos de las amibas en estudio con cepas de referencia ( De Jonckheere, 1982).

Para realizar este análisis se usa la técnica de isoelectroenfoque (IEF), la cual consiste en la separación de los componentes de una enzima presentes en el extracto crudo de cada amiba sobre un sustrato de agarosa con un anfolito. Al hacer pasar una corriente eléctrica de alto voltaje sobre dicho sustrato con el extracto amibiano, debido a las propiedades del anfolito, se genera un gradiente de pH sobre la agarosa y las proteínas de las amibas migran hasta alcanzar su punto isoelectrónico. Con el revelador específico se hacen visibles las bandas enzimáticas que responden a un sustrato específico, de manera que las enzimas de cada microorganismo problema puedan ser comparadas con las enzimas de las cepas de referencia.

Siguiendo el procedimiento descrito por De Jonckheere (1982, 1983), la técnica se llevó a cabo con un equipo para isoelectroenfoque (Pharmacia Fine Chemicals), compuesto por una base para corrimiento con placas refrigeradas de 250 x 250 mm (Mod. FBE 3000), fuente de poder constante (ECPS 3000/150), tabla de nivelación, un integrador de voltaje (VH-1) y marcos de acrílico para formar geles con sujetadores. Se determinaron las siguientes enzimas:

Propionil Esterasa (PE) pH 3-10  
Alcohol Deshidrogenasa (ADH) pH 3-10  
y Proteínas Totales (PT) pH 3-10

Debido a que esta prueba es muy sensible, solo se realizó con los aislamientos que lograron axenizarse, ya que las proteínas de las bacterias de los cultivos monoxénicos podrían interferir y de esa manera los resultados se alterarían.

Para realizar el análisis de isoenzimas se utilizaron las siguientes cepas de referencia obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) y del Catálogo de Colección del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la FES-Iztacala-UNAM.

## CEPA

## CLAVE DE REFERENCIA

<i>A. castellanii</i>	Ac
<i>A. castellanii</i>	Neff
<i>A. divionensis</i>	AA-1
<i>A. hatchetii</i>	BH2
<i>A. lugdunensis</i>	García
<i>A. lugdunensis</i>	SH-565
<i>A. palestinensis</i>	2802
<i>A. polyphaga</i>	<i>polyphaga</i>
<i>A. polyphaga</i>	P-23
<i>A. quina</i>	L1-a
<i>A. divionensis</i>	1AM
<i>A. lenticulata</i>	PD2

## 5.4. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

La capacidad de un organismo para ser patógeno se determinó por inoculación intranasal (IN) en ratones, para lo cual se utilizó un cultivo amibano axénico concentrado por centrifugación a 4500 gravedades durante 10 minutos, conteniendo especímenes del orden de  $10^3$  a  $10^6$  células amibianas en 0.2 ml del medio.

La muestra se tomó con una aguja de insulina y se inoculó un grupo de 5 ratones machos, blancos y de 3 semanas de edad, para cada aislamiento. Cada ratón se inoculó con un volumen de 0.2 ml del concentrado. De la misma forma se inoculó un lote de 5 ratones con medio de cultivo sin amibas, como grupo testigo.

Los ratones inoculados se observaron durante 21 días y se registraron los cambios en su comportamiento. Tanto a los ratones que sobrevivieron a este período como los que murieron durante el proceso, se les extirparon: cerebro, pulmón, hígado y riñón y se colocaron en medio NNE y se incubaron a 30 °C, para observar si hubo crecimiento amibiano en los órganos. Las amibas patógenas se recuperaron y fueron mantenidas en medio axénico.

## 6. RESULTADOS

Se recolectaron 189 muestras en total, de las cuales se obtuvieron 40 aislamientos amibianos; 38 de ambientes intramuros (4 de aire y 34 de polvo), los 2 restantes se aislaron de aire de ambientes extramuros (tabla 2, figura 4). De las casas control se obtuvieron 6 aislamientos pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Rosculus*, *Guttunilopsis* y *Vahlkampfia* (Tabla 3).

Los 40 aislamientos están distribuidos en 6 géneros y 18 especies. Del total, 31 corresponden al género *Acanthamoeba*; *Vahlkampfia* y *Guttunilopsis* con 3 aislamientos cada género, *Mayorella*, *Platyamoeba* y *Rosculus* con un solo aislamiento (Tabla 2, Figura 5).

Del total de aislamientos solamente 20 pertenecientes al género *Acanthamoeba* se desarrollaron en medio axénico y las restantes crecieron en medio monoaxénico (NNE).

Con respecto a la prueba de tolerancia a la temperatura, los resultados muestran que la temperatura óptima para la mayoría (34) de los aislamientos fue de 30 °C; 27 fueron tolerantes a 22 °C, y 0% fue tolerante a 37 y 42 °C (Tabla 2).

Las amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba* tuvieron diferentes grados de virulencia, incluso algunas no fueron patógenas en ratón (Tabla 4).

De las 31 aislamientos de acanthamebas obtenidas, 11 no lograron crecer en ninguno de los medios axénicos utilizados, por lo que la prueba de patogenicidad solo se llevó a cabo en 20 aislamientos amibianos. De éstos, solamente 3 fueron patógenos. Se considera patógeno un aislamiento amibiano, cuando la mortalidad de los ratones inoculados vía IN, alcanzan el 50% ó mas (De Jonckheere, 1980). De acuerdo con este criterio, el 15% de las acanthamebas probadas durante este estudio, resultaron ser patógenas.

Por otro lado, cuatro fueron invasivas, es decir que no mataron al ratón en el intervalo que dura la prueba, sin embargo, se encontraron amibas viables en los órganos extraídos después de sacrificarlos (Tabla 4).

En lo que respecta a las pruebas de isoenzimas se llevó a cabo únicamente con las amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba*, ya que la técnica es muy sensible y para evitar resultados falsos por la bacteria de

## 6. Resultados.

los cultivos monoxénicos, solamente se utiliza con las amibas en cultivo axénico.

Con el propósito de determinar la especie de los aislamientos identificados morfológicamente como *Acanthamoeba*, se realizó un análisis de proteínas totales y las enzimas propionil esterasa y alcohol deshidrogenasa con 19 aislamientos. No se llevó a cabo con los 20 aislamientos debido a que después de la prueba de patogenicidad, la cepa 2A, ya no creció, aun después de haber probado con diversos medios.

Tabla 2. Total de AVL aisladas de AI y AE y prueba de tolerancia a la temperatura

No. DE CASA	AISLAMIENTO	ORIGEN	22°C	30°C	37°C	42°C	DIAGNÓSTICO (MORFOLÓGICO Y POR IEF)
1	A	AI (a)*	+	+	-	-	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
	B	AE (a)**	+	-	-	-	<i>A. castellanii</i>
	C	AI (a)*	-	+	-	-	<i>A. rhyodes</i>
2	A	AI (p)	-	+	-	-	<i>A. rhyodes</i>
	B	AE (a)**	-	+	-	-	<i>A. rhyodes</i>
	C	AI (p)	-	+	-	-	<i>A. polyphaga</i>
	D	AI (p)	+	-	-	-	<i>A. polyphaga</i>
	E	AI (p)	+	-	-	-	<i>Guttulopsis vulgaris</i>
3		AI (p)	-	-	-	-	<i>A. lugdunensis</i>
4	No hubo AVL	-	-	-	-	-	
5	A	AI (p)	+	+	-	-	<i>A. lugdunensis</i>
	B	AI (p)	-	+	-	-	<i>Vahikampfia sp</i>
6	A	AI (p)	-	+	-	-	<i>A. griffini</i>
	B	AI (p)	+	+	-	-	<i>A. lugdunensis</i>
7		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. comandori</i>
8		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. lugdunensis</i>
9	A	AI (p)	+	-	-	-	<i>A. palestinesis</i>
10	B	AI (p)	+	-	-	-	<i>Platyamoeba stenopodia</i>
	A	AI (p)	-	+	-	-	<i>A. polyphaga</i>
	B	AI (p)	+	-	-	-	<i>G. vulgaris</i>
	C	AI (p)	-	+	-	-	<i>A. castellanii</i>
11		AI (p)	+	+	-	-	<i>Acanthamoeba sp</i>
12		AI (p)	-	+	-	-	<i>Vahikampfia avara</i>
13		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. hatchetti</i>
14		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. palestinesis</i>
15	A	AI (p)	+	+	-	-	<i>A. polyphaga</i>
	B	AI (p)	-	+	-	-	<i>Vahikampfia entenca</i>
16		AI (D)	+	+	-	-	<i>A. polyphaga</i>
17	No hubo AVL	-	-	-	-	-	
18	A	AI (p)	+	+	-	-	<i>A. comandori</i>
	B	AI (p)	+	+	-	-	<i>A. rhyodes</i>
	C	AI (p)	-	+	-	-	<i>Mayorella microeruca</i>
	D	AI (a)*	+	-	-	-	<i>G. vulgaris</i>
	E	AI (a)*	+	-	-	-	<i>Rosculus ithacus</i>
19		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. lugdunensis</i>
20		AI (p)	+	+	-	-	<i>Acanthamoeba sp</i>
21	No hubo AVL	-	-	-	-	-	
22		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. mauntanensis</i>
23		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. castellanii</i>
24		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. lugdunensis</i>
25		AI (p)	+	+	-	-	<i>Acanthamoeba sp</i>
26		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. palestinesis</i>
27		AI (p)	+	+	-	-	<i>A. divionensis</i>

AI = Ambiente Intramuros  
a = aire; p = polvo;

AE = Ambiente Extramuros

\*aislada de la 1ª etapa del MSLI

\*\* aislada de la 2ª etapa del MSLI

TEST CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 3. Total de AVL aisladas de las casas control y prueba de tolerancia a la temperatura**

CASA	ORIGEN	22°C	30°C	37°C	42°C	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO
1	AI (p)	-	+	-	-	<i>Acanthamoeba mauritanensis</i>
2	AI (p)	+	-	-	-	<i>Guttunilopsis nivea</i>
3	AI (p)	+	+	-	-	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
4	AI (p)	+	-	-	-	<i>Vahikampfia avara</i>
5 <sub>1</sub>	AI (p)	+	-	-	-	<i>Rusculus ithacus</i>
5 <sub>2</sub>	AI (p)	+	+	-	-	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>

AI=Ambientes Intramuros

p=polvo

**Figura 4. AVL encontradas en aire y polvo de ambientes intra y extramuros.**

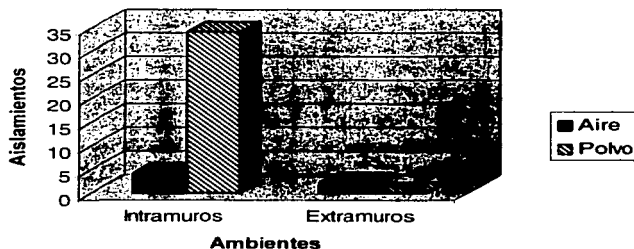
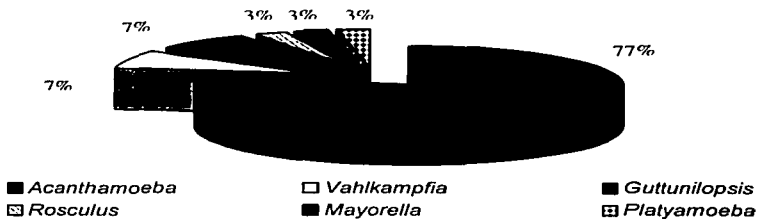




Figura 5. Géneros de AVL encontradas en casas habitación

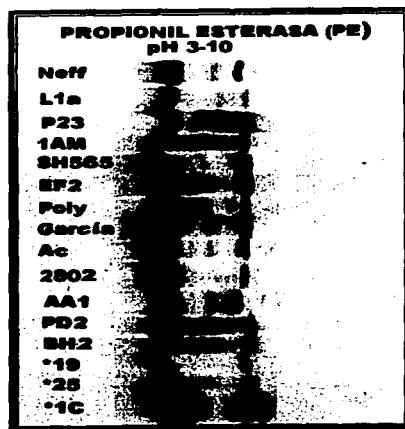
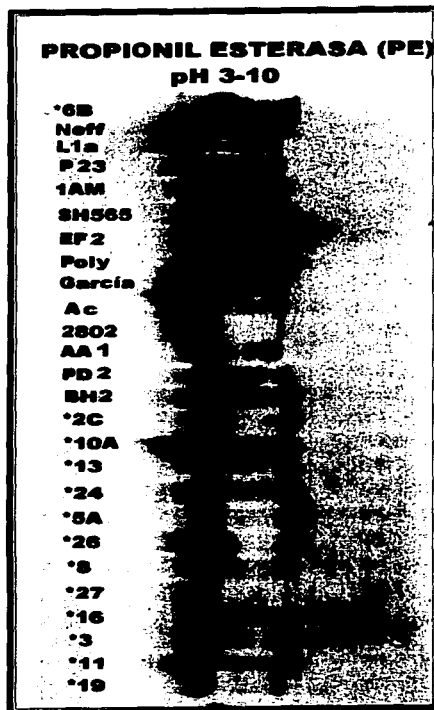


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Prueba de patogenicidad de las amibas del género *Acanthamoeba*

CASA	DIAGNÓSTICO	I. N	C P H R	PATOGENICIDAD
1A	<i>A. castellanii</i>	M 5/5	+ + + +	+
1B	<i>A. castellanii</i>	0/5	-	-
1C	<i>A. rhyodes</i>	S 5/5	- - - -	-
2A	<i>A. rhyodes</i>	S 4/5	+ + + +	Invasiva
2B	<i>A. rhyodes</i>	0/5	-	-
2C	<i>A. polyphaga</i>	S 4/5	+ + + +	Invasiva
2D	<i>A. polyphaga</i>	M 5/5	+ + + +	+
3	<i>A. lugdunensis</i>	S 4/5	- + - -	-
5A	<i>A. lugdunensis</i>	M 3/5 S 2/5	+ - - -	+
6A	<i>A. griffini</i>	0/5	-	-
6B	<i>A. lugdunensis</i>	M 1/5 S 4/5	+ + + +	Invasiva
7	<i>A. comandoni</i>	0/5	-	-
8	<i>A. lugdunensis</i>	0/5	-	-
9A	<i>A. palestinesis</i>	0/5	-	-
10A	<i>A. polyphaga</i>	S 5/5	- - - -	-
10C	<i>A. castellanii</i>	0/5	-	-
11	<i>Acanthamoeba sp</i>	S 5/5	- - - -	-
13	<i>A. hatchetti</i>	S 5/5	- - - -	-
14	<i>A. palestinesis</i>	0/5	-	-
15A	<i>A. polyphaga</i>	0/5	-	-
16	<i>A. polyphaga</i>	S 5/5	- - - -	-
18A	<i>A. comandoni</i>	S 5/5	- - - -	-
18B	<i>A. rhyodes</i>	S 5/5	- + - -	-
19	<i>A. lugdunensis</i>	S 5/5	- + + +	Invasiva
20	<i>Acanthamoeba sp</i>	S 5/5	- - - -	-
22	<i>A. mauntanensis</i>	S 5/5	- - - -	-
23	<i>A. castellanii</i>	0/5	-	-
24	<i>A. lugdunensis</i>	S 5/5	- - - -	-
25	<i>Acanthamoeba sp</i>	S 5/5	- - - -	-
26	<i>A. palestinesis</i>	S 5/5	- - - -	-
27	<i>A. divionensis</i>	S 5/5	- - - -	-

M = Muerte; S = Sacrificio; C = Cerebro; P = Pulmón; H = Hígado; R = Riñón

**Cepas de referencia**

Neff	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
L1a	" <i>quina</i>
P23	" <i>polyphaga</i>
1AM	" <i>lugdunensis</i>
SH565	" <i>lugdunensis</i>
EF2	" <i>lugdunensis</i>
Polyphaga	" <i>polyphaga</i>
García	" <i>lugdunensis</i>
Ac	" <i>castellanii</i>
2802	" <i>palestinensis</i>
AA1	" <i>divionensis</i>
PD2	" <i>lenticulata</i>
BH2	" <i>hatchetti</i>

\* cepas problema

Figura 6. Zimogramas de la enzima Propionil Esterasa.

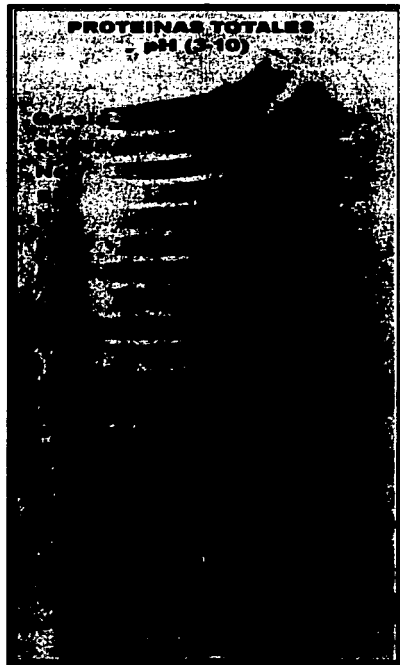
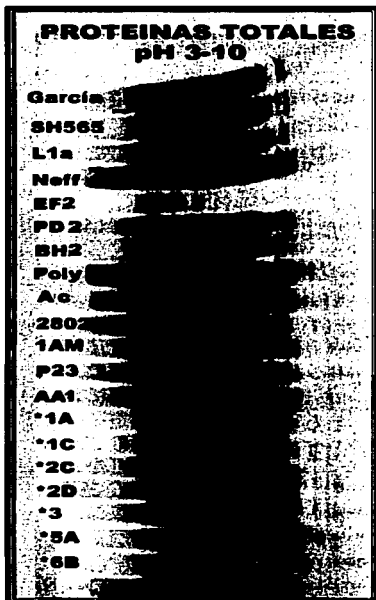


Fig 7. Zimogramas de Proteínas Totales

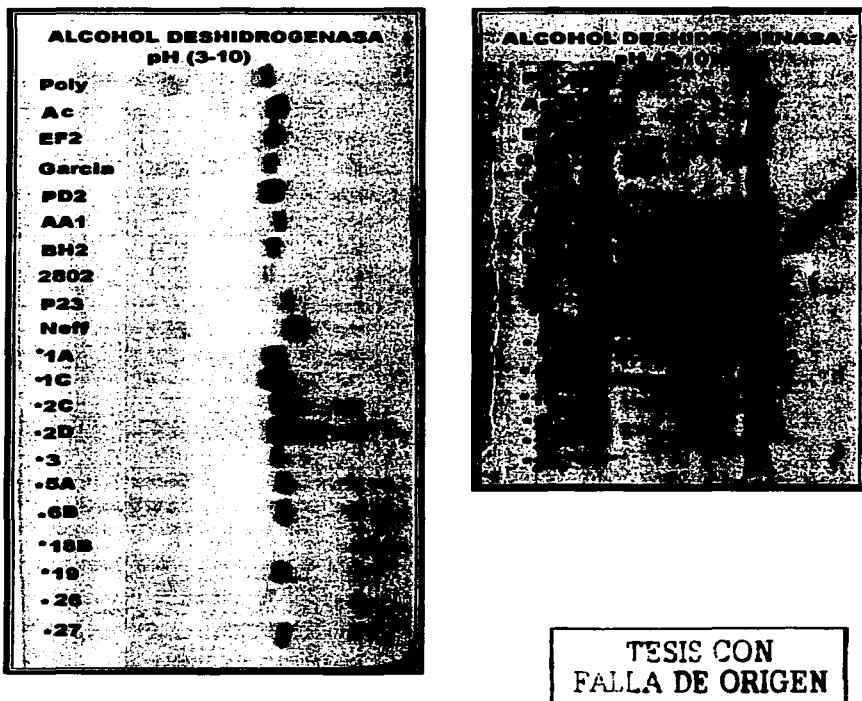


Fig. 8. Zimogramas de la enzima alcohol deshidrogenasa

## 7. DISCUSIÓN

El papel de las amibas de vida libre es parte fundamental de las cadenas tróficas del agua y del suelo, se encuentran entre los más importantes consumidores de bacterias en el suelo y basura donde liberan alrededor del 35% del material ingerido como nutrimentos solubles, lo que favorece la actividad bacteriana y otros microorganismos (Bamforth, 1980).

En los cuerpos acuáticos se encuentran adheridos a las partículas flotantes de la superficie, en la columna de agua existen en menor cantidad y en los sedimentos se encuentran principalmente en forma de quiste (Kyle y Noblet, 1986). Desde el agua y el suelo pueden ser introducidas a la atmósfera por diferentes mecanismos y de esta manera pueden dispersarse ampliamente y también invadir otros hábitats y al ser humano.

Estudios previos han demostrado la presencia de AVL en la atmósfera (Rivera *et. al.*, 1994; Bonilla, 2000), pero ésta es la primera vez que se realiza la búsqueda de este grupo de amibas en ambientes intramuros.

En general, el 85 % de las AVL se aisló de polvo. Esto era de esperarse ya que se ha reportado que el suelo es el hábitat principal de las AVL pequeñas, constituyendo entre 50 y el 90 % de los protozoos heterótrofos del suelo y basura, donde son los más importantes consumidores de bacterias (Bamforth, 1980). En condiciones adversas, la mayoría de las AVL, son capaces de producir quistes, lo que les permite sobrevivir períodos prolongados de sequía y escasez de alimento.

En contraste, solamente el 15 % del total se obtuvo del aire (Tabla 2 y Figura 4). Aunque se obtuvieron solamente seis aislamientos amibianos, es interesante observar que se aisló el 50 % más, en el interior de las casas, lo cual sugiere que el ambiente intramuros les proporcionan cierta protección de las condiciones externas, donde pueden estar expuestas a la acción biocida de la radiación solar, la desecación, a los efectos tóxicos de algunos contaminantes químicos, a temperaturas extremas y falta de alimento. Y debido a estas características, difícilmente pueden estar metabólicamente activas en la atmósfera (Campbell, 1987). Sin embargo el aire es importante como medio de transporte y dispersión de las AVL.

Se ha demostrado que las bacterias y virus en el polvo pueden resistir las condiciones normales del interior durante muchas semanas (Campbell, 1987) y con los resultados de este trabajo, se puede agregar que también las amibas de vida libre de los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Guttunilopsis*, *Rosculus*, *Mayorella* y *Platyamoeba* (Tabla 2)

En el ambiente intramuros, tanto el polvo como las partículas de aire se encuentran protegidos de la radiación solar; la temperatura interior generalmente es más constante (aunque si excede los 40 °C, puede causar inactivación de muchos microorganismos)(Campbell, 1987); generalmente la humedad relativa es mayor y existe mas fuentes de alimento; como bacterias de origen humano, del tracto respiratorio superior provenientes del estornudo, el toser o el hablar, así como gran cantidad de células epiteliales humanas y restos de materia orgánica provenientes de alimentos, papel, plantas, cortinas de baño, sótanos, etc.

El tamaño de las partículas emitidas al estornudar, toser o hablar determina su permanencia en la atmósfera, ya que gotas grandes con gran número de microorganismos tienden a sedimentarse rápidamente, las muy pequeñas se secan en poco tiempo, pero todas aquellas que logren permanecer suspendidas mayor tiempo y distribuirse representan un riesgo si proviene de personas enfermas ya que cualquier persona podría inhalarlas fácilmente (Rosas *et al.*, 1997).

Los gases y las partículas de una atmósfera contaminada se ponen en contacto con el aparato respiratorio durante la inhalación, estas partículas generalmente son removidas del organismo mediante diversos mecanismos como la actividad ciliar de las fosas nasales. Al llevarse a cabo este proceso, los anticuerpos del organismo tienen una acción fagocítica sobre dichas partículas, pero de no ser así, pueden llegar a los pulmones donde pueden desencadenar una infección o alergia (Rosas *et al.*, 1997).

Del aire se obtuvieron seis aislamientos amibianos en total; cuatro de la primera etapa y dos de la segunda (Figura 4). Esto significa que aunque existen AVL en el aire (susceptible de ser respiradas), la mayor parte son removidas del cuerpo humano por diversos mecanismos como la actividad ciliar de las fosas nasales o por la acción fagocítica de los anticuerpos del organismo. Por lo tanto, la mayoría de las partículas, entre ellas las AVL, son eliminadas en el tracto respiratorio superior y son pocas las que logran alcanzar la zona de los bronquios y alveolos (etapas 2 y 3 respectivamente).

Además de lo anterior, como ya se ha mencionado, las AVL son ubicuas en la naturaleza, lo cual representa una fuente constante de estimulación antigénica.

Esto explica el hecho de que existan anticuerpos en suero humano, tanto contra *Acanthamoeba* como para *Naegleria* patógenas en suero humano, aunque no se sabe exactamente su papel en la protección del hospedero (John, 1993).

De cualquier manera, es importante tomar en cuenta que si logran llegar a los bronquios hay mayor probabilidad de que puedan alcanzar a los alveolos y desde ahí incorporarse al torrente sanguíneo e invadir al SNC u otras partes del organismo. En todos los casos, es necesario tomar en cuenta el estado inmunológico del hospedero, la dosis infectiva, así como la habilidad de las amibas patógenas para evadir el sistema inmune del hospedero (John, 1993).

El hecho de haber obtenido el mayor número de aislamientos de AI, es de particular importancia ya que los individuos más susceptibles como es el caso de niños con asma, pasan la mayor parte del día en esos ambientes y en consecuencia existe un continuo y estrecho contacto con partículas de polvo, lo cual aumenta la posibilidad de que se desarrollen alergias o infecciones.

Hasta hace algunos años, a los pacientes alérgicos se les recomendaba evitar el contacto con el exterior, con el fin de prevenir la exposición a supuestos agresores medioambientales tales como viento, rocío, cambio climático, humedad y algunos alérgenos como los pólenes.

En la actualidad, este escaso contacto con el exterior constituye un hábito social y no una indicación médica. Así, en los países industrializados, la mayoría de los individuos pasan gran parte de su vida en espacios cerrados, mal ventilación, con elevada humedad relativa, presencia de alfombras, cortinas, muñecos de paño, mascotas y plantas, donde el aire puede contener contaminantes en concentraciones superiores a las que se encuentran en el exterior.

Como consecuencia de lo anterior, la calidad del aire en esos espacios cerrados es considerada actualmente tan importante o más que la calidad del aire del exterior para la salud en general y para las enfermedades alérgicas respiratorias en particular. En muchos pacientes, esta exposición habitual y continua a los alérgenos ambientales es la causa de síntomas respiratorios persistentes, los que mejoran al suprimir drásticamente y totalmente dicha exposición (Rosas *et al.*, 1988).



En este estudio, el mayor número de AVL se obtuvo en dos de las 27 casas estudiadas (Tabla 2). En ambas, había gran cantidad de polvo y humedad, con plantas y animales en el interior, una de las casas se encuentra construida cerca de una barranca y sus condiciones de higiene no eran las adecuadas, debido a que en la casa no había piso y los hábitos de limpieza eran escasos. La otra casa se encuentra en una vecindad en condiciones de higiene muy deficientes, cuenta con un pasillo pequeño, donde había material de construcción, con poca ventilación, su limpieza era escasa y en la sala se encontraban demasiados muñecos de peluche, condiciones que propician que haya y se acumule polvo, lo que a su vez proporciona condiciones adecuadas para la proliferación de AVL.

En 22 casas se obtuvieron solamente tres o menos aislamientos amibianos. En éstas, las condiciones higiénicas en general eran mejores, no había animales, ni plantas en el interior de las casas y presentaban una ventilación constante, algunas veces las cortinas gruesas, lo que propicia que se acumule mayor cantidad de polvo.

En las casas 4, 17 y 20, no se obtuvo ninguna AVL. En general se observó que había mejores condiciones higiénicas en las habitaciones, y menos fuentes de polvo alrededor de las casas. No presentaban alfombras, animales o plantas dentro de éstas. Las cortinas eran delgadas o presentaban persianas limpias, lo que disminuye en gran cantidad la concentración de polvo dentro de las casas y con ésto la probabilidad de encontrar amibas también disminuye.

Del total de las AVL obtenidas, la mayor frecuencia corresponde al género *Acanthamoeba* (Figura 5) lo que coincide con lo antes reportado por Rivera *et al.*, (1987, 1994), Rodríguez *et al.*, (1993), Bonilla (2000) y lo señalado por Page (1988) en relación a que las especies de este género son probablemente el protozoo de vida libre más común en la naturaleza.

La abundancia de *Acanthamoeba* en el ambiente se debe en gran parte a la resistencia de su quiste ya que está formado principalmente por una capa externa fosfoproteica y después una capa interna de celulosa (Page, 1966; Sleigh, 1989), este último componente la hace muy resistente a la desecación proporcionándole capacidad para sobrevivir en condiciones sumamente adversas.

Esto es importante porque a *Acanthamoeba* pertenecen varias especies patógenas oportunistas que pueden producir EAG, principalmente en personas inmunosuprimidas tales como individuos con terapias

inmunosupresoras para trasplantes de órganos, desnutrición, alcohólicos crónicos, mujeres embarazadas, pacientes con SIDA o cualquier otro tipo de supresión provocada por quimioterapias (Martínez y Visvesvara, 1997).

Es interesante señalar que no se obtuvo ningún aislamiento de *Naegleria*. Esto se debe probablemente a que su quiste es muy sensible a la desecación y a pesar de que las condiciones intramuros son menos extremas que en exterior, tampoco favorecen su desarrollo.

El mayor porcentaje de amibas se obtuvo de las muestras de polvo (Tabla 2), lo que era de esperarse ya que como se mencionó al principio, el suelo es su principal hábitat y en estas condiciones, pueden permanecer viables durante mucho tiempo en forma de quiste (Singh, 1975), especialmente las más resistentes.

Con respecto a la identificación de las AVL, el método más sencillo y ampliamente utilizado es el morfológico, sin embargo, debido a que este método solamente es confiable para identificar el género al que pertenecen; se recomienda agregar otros criterios para identificarlas hasta nivel de especie; como hábitat de donde proceden, tolerancia a la temperatura, capacidad patógena y análisis de isoenzimas (De Jonckheere, 1993; Page, 1988).

En la actualidad la comparación de patrones enzimáticos sigue siendo la más utilizada, especialmente para la identificar especies patógenas (De Jonckheere, 1980, 1982, 1983; John, 1993), aunque tampoco es 100 % precisa.

Una misma especie puede presentar diferentes zimogramas si la condiciones de mantenimiento varía aunque sea un poco; por ejemplo, la edad del cultivo, el tiempo que se mantuvieron en medios axénicos, la temperatura a la cual se mantengan. La variación de cualquiera de estos factores pueden hacer que la expresión enzimática sea diferente, aun entre organismos de la misma especie (De Jonckheere, 1980, 1983).

En varios lugares del mundo, actualmente se están desarrollando el uso de técnicas de Biología molecular para la identificación de las AVL, sin embargo, se le ha dado especial atención a las patógenas, debido a su importancia desde el punto de vista de salud pública. Por otro lado, la implementación de estas técnicas, no es tan sencilla, debido principalmente al costo del equipo y materiales que se utilizan.

Es necesario tomar en cuenta que la virulencia de las AVL patógenas disminuye significativamente, cuando se mantiene a las amibas en cultivo axénico por largo tiempo (John y Howard, 1993), por lo que es recomendable realizar las pruebas de patogenicidad lo más pronto posible. En el presente estudio, no siempre fue posible realizar la prueba de patogenicidad inmediatamente, debido en parte, a que muchas de las AVL no se desarrollaron inmediatamente en medio axénico, ya que para algunos organismos el adaptarse a un nuevo hábitat puede ser difícil, aunado al cambio en la temperatura y alimentación.

Se ha reconocido que la mayor frecuencia de enfermedades respiratorias y la exposición a alérgenos se da en AI (Edmons, 1979). Así mismo, se ha reportado que los hongos en ciudades tropicales son los principales alérgenos que causan asma y rinitis alérgica (Rosas *et al.*, 1997). También se ha registrado la presencia de bacterias, algas y ácaros (Bukantz, 1988), y a los protozoos solamente se les ha mencionado de manera muy general (Middleton *et al.*, 1992).

De lo anterior, la importancia de identificar con precisión a los protozoos en general y en particular a las AVL que se encuentran en este ambiente. Con los resultados de este trabajo no se puede afirmar que las AVL tengan capacidad alérgica, ya que los resultados demuestran que se encuentran tanto en casas de niños con asma como en casas de niños sanos, pero tampoco se puede descartar esa posibilidad, ya que los alérgenos son moléculas proteicas o glicoproteínas de origen vegetal o animal (Rojas, 2001); por otro lado, se ha demostrado que las proteínas son parte importante en la composición celular de las AVL (Réveiller *et al.*, 2001).

Además de su posible papel como agentes alérgenos, es necesario considerar el potencial patógeno de algunas AVL. El 78 % de los aislamientos obtenidos pertenecen al género *Acanthamoeba* y de éstos, el 15 % fue patógeno para ratón. Aparentemente el porcentaje es bajo, sin embargo, es muy importante debido a que son organismos oportunistas que pueden causar EAG, Queratitis, Rinitis, Otitis en humanos inmunocomprometidos o inmunosuprimidos.

## 8. CONCLUSIONES

- Se identificaron en total 6 géneros distribuidos en 18 especies en casas-habitación de niños con asma.
- La habilidad de las AVL para formar quistes es fundamental para su sobrevivencia y dispersión en el aire.
- El ambiente intramuros es mucho más favorable para las AVL, que el de extramuros.
- La presencia de amibas en ambientes intramuros estuvo estrechamente asociada a la presencia de polvo.
- *Acanthamoeba* fue el género amibiano predominante, tanto en ambientes intramuros como extramuros.
- Para ubicar taxonómicamente a las AVL, no es suficiente el análisis de isoenzimas como herramienta única, es necesario tomar en cuenta otras características como morfología, tolerancia a la temperatura, capacidad patógena, así como el hábitat de donde proceden.
- La presencia de *Acanthamoeba* spp. es un importante factor de riesgo tanto por su potencial patógeno, como posible agente alérgico, especialmente para los individuos debilitados inmunológicamente como es el caso de los pacientes con asma.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abba Terr I. A. 1994. The atopic Diseases. In Stites., P.D., Terr I. A., Parslow G. T. Basic & Clinical-Immunology 8 ed. Lange Medical Book Publications U.S.A. Pp327-345.
- Asbel, P. 1993. *Acanthamoeba* Queratitis. There and Back Again *J. of Med.* 60 (4):277-282.
- Anzil, A.P., Rao, C., Wrzolek, M.A., Visvesvara, G.S., Sherr, J.H and Kozlowski, P.B. 1991. Amebic Meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by newly recognic opportunistic pathogen. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115:21-25.
- Bamforth, S.S. 1980. Terrestrial Protozoa. *J. Protozool.* 27(1): 33-36.
- Bandoni, J.J and Kosre, R.E. 1974. Monolayers and microbial dispersal. *Science.* 183: 1079-1081.
- Bonilla, P. 2000. Heterogeneidad de las amibas de vida libre con potencial patógeno aisladas de la atmósfera de la Ciudad de México. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias UNAM.
- Campbell, R. 1987. Ecología microbiana. Ed. Limusa. México. Pp. 222-227.
- Canonica G.W., Ciprandi G., Buscaglia S., Pesce G. and Bagnasco M. Adhesion. 1994. Molecules of allergenic inflammation: recent insights into their functional roles. *Allergy* 49:135-141.
- Carter, R.F. 1970. Description of a *Naegleria* sp. Isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental changes induced by it. *J. Pathol.* 100: 217-244.
- Culberson, C.G., Smith, J.W. and Minner, J.R. 1958. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. *Science.* 127: 1506.
- De Jonckheere, J.F. 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:681-685.
- De Jonckheere, J.F. 1981. *Naegleria australiensis* sp. Nov. Another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica.* 17:423-429.
- De Jonckheere, J.F. 1982. Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp, using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol.* 133 A:319-342.

- De Jonckheere, J.F. 1983. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomic of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 30(4):701-706.
- De Jonckheere, J.F. 1987. Taxonomy. *En:* E.G. Rondanelli (ed) *Amphizoic Amoebae: Human pathology infectious diseases*. Color Atlas Monograph. Piccin Nuova Libreria, Pavia, Italy. Pp. 25-48.
- Edmons, R. 1979. Aerobiology. The ecological System approach. Dowden. Hutchinson and Ross Inc. Pennsylvania. 386 pp.
- Espinosa, M.S.M. 1992. Estudio de hipersensibilidad cutánea: intradérmica a extractos alergénicos y su relación con el lugar de residencia. *Rev. Aler. Méx.* 39(6): 115-119.
- Fannin, K.V. 1981. An approach to the study of environmental microbial aerosols. *Wat. Sci. Tech.* 5:1103-1114.
- Fenchel, T. 1987. Ecology of Protozoa. The Biology of Free-Living phagotrophic protist. Springer Verlag. U.S.A. 197 pp.
- Frenz, D.A. 1999. Comparing pollen and spore counts collected with the Rotorod sampler and Burkard spore trap. *Ann allergy asthma Immunol.* 83(5): 4341-7; quiz 348-9.
- Gonzalez, M.M., Gould, E., Dickinson, G., Martinez, A., Visversvara, G.S., Ceary, T.J and Hensley, G.T. 1986. Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organism. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110:749-751.
- Gregory, P.H. 1973. The microbiology of the atmosphere. Leonard Hill Books. Great Britain. 337 pp.
- Heinrich, D., Stephan, K., and Ulrich, K. 1998. Epidemiology analyses of the relationship between environmental pollution and asthma. *Toxicology letters*. Germany. 307-316.
- Jahn, L.T., Bovee, E.C. and Jahn, F.F. 1979. How to Know the Protozoa. 2nd. ed. The printed Key nature series. U.S.A. 279 p.
- John, D.T., y De Jonckheere, J.F. 1985. Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma lake. *J. Protozool.* 32:571-575.
- John, D.T., Cole, T.B., Jr and John, R.A. 1991. Flagella number among *Naegleria* flagellates. *Folia Parasitol.* 38:289-295.

- John. D.T., 1993. Opportunistically Pathogenic Free living Amebae: In: parasitic Protozoa. Julius p. Kreier and John R. Baker. *Academic Press, Inc.* San Diego California. U.S.A. 2(3): 143-246.
- Lawlor, J.G. and Fischer, J.T. 1985. Manual de alergia e inmunología. Salvat editores. México. 37-46 pp.
- Lee, J.J., Hunter, S.H., and Bouee, E.C. (eds). 1985. An Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologist, Kansas, U.S.A. pp. 1-17; 158-190.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Leoblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.
- Lundholm, M. I. 1982. Comparison of methods for quantitative determination of airborne bacteria and evaluation of total viable counts. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(1):179-183.
- Martínez, J.A., Sotelo-Avila, C., García-Tamayo, J., Moron, J.T., Willaert, E. and Stamm, W. P. 1977. Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp: pathogenesis and clinicopathological study. *Acta Neuro. Pathol.* 37:183-191.
- Martínez, J.A. y Elías, M. 1985. Introducción a la Protozoología. Trillas. México, D.F. 206 pp.
- Martínez, J.A. 1985. Free living amebas: Natural history, prevention, diagnosis and treatment of disease. CRC Press. Boca Raton, Florida. U.S.A. 156 pp.
- Martínez, J.A. 1993. Free living amebas: Infection of the central nervous system. *The Mount Sinai. J. Med.* 40(4):271-279.
- Martínez J., Guerra E., García J., Céspedes G., González A. and Visvesvara G. 1994. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol.* 87:430-434.
- Martínez, A.J. and Visvesvara, G.S. 1997. Free-living amphiocic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7(1): 583-98
- Middleton E. 1993. Allergy Principles and Practice, Volume I and II 4 th ed. Mosby U.S.A. 295-352 pp.
- Omaña, M. 1997. Estudio comparativo de 3 cepas del género *Acanthamoeba* responsable de los primeros casos detectados de queratitis amibiana en México. Tesis de Maestría en Ciencias en la Area de Microbiología. FES-Cuautitlán UNAM. México. 165 pp.

---Page, F.C. 1976. An Illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. *Freshwater Biol. Assoc.* Cumbria, England. 155 pp.

---- Page, F.C. 1988. A new Key to Freshwater an Soil Gymnamoebae with instructions for culture. *Culture collection of Algae and Protozoa.* England

--- Paul, E.W. 1993. Fundamental Immunology. 3 ed., Raven Press, Ltd., New York . 1399-1425.

---Quan S. 1994. Allergy, *In:* Gosling P. J., Basso L. C. Immunoassay Laboratory Analysis and Clinical Application, U.S. A. 249-257 pp.

---Ramos, M.J. and Canseco, G.C. 1994. Hypersensitivity to airborne allergens common in the central region of Coahuila. *Rev. Alerg. Méx.* 41(3):84-87.

---Rattenberg. 1939. Investigations on the microbiology of marine air. *J. of Marine Research.* 11 3:208-217.

---- Rivera, F., Paz, E., Ortega, A. and López, E. 1978. Estudio Biológico de las amibas del grupo limax, géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, Facultad de Medicina, Departamento de Histología. U.N.A.M., Méx. D.F. *Archivos Mexicanos de Anatomía* 5(3):45-48.

---Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P and Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico city and environs. *Environ. Res.* 42:149-159.

---Rivera, F., Lares, F., Bonilla, P., Ramírez, E., and Paulin, A. 1988. Pathogenic amoebae isolated from the atmosphere of Mexico city and environs. In: Hazardous waste, detection, control, treatment. In: Elsevier Science Publisher, B.V. Amsterdam. 1175-1179 pp.

---- Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A, and Chavez, M. 1992 Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico city and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* 61:17-36.

---Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, O. and Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of airborne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* 74:65-87.

---Rodríguez, S., Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., and Hernández, D. 1993. Amoebological study of the atmosphere at San Luis Potosi (SLP), Mexico. *J. of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology.* 3(1):229-241.



- Rojas, W. Y Cano, L.E. 2001. Inmonología. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 470 pp.
- Rondanelli, E. G. (ed). 1987. Amphizoic Amoebae: Human Pathology. Infection diseases. Color atlas monographs. Piccin, Pavia, Italy. 279 pp.
- Rosas, I., Roy-Ocotla, G., Yela, A. and Monsiño, P. 1989. Centro de Ciencias de la Atmósfera . U.N.A.M. México D.F.
- Rosas, I. and Roy-Ocotla, G. 1985. La Aerobiología, una ciencia interdisciplinaria. Memorias III Curso y Simposio sobre Biología de la Contaminación. ENEPI-UNAM-CONACYT-DDF. México D.F.
- Rosas, I., Calderón, C., Gutiérrez, S. and Mosiño, P. 1986. Airborne fungi isolated from rain water collected in Mexico city. *Contam. Ambiental*. 1(2): 13-24.
- Rosas, I., Calderón C., Martínez L., Ulloa M., and Lacey J. 1997. Indoor and outdoor airborne fungal propagule concentration in Mexico city. *Aerobiologia*. 13:23-30.
- Rosas, I., McCarty, H.A., Calderón, C., Lacey, J., Chapela, R., and Ruiz-Velazco, S. 1998. Analysis of the relationships between environmental factors (aeroallergens, air pollution, and weather) and asthma emergency admissions to a hospital in Mexico City. *Allergy*. 53: 394-401.
- Schlichting, H.E. Jr. 1965. Meteorological conditions affecting the dispersal of airborne algae and protozoa. *Lloydia*. 27:63-78.
- Schlichting, H.E. Jr. 1969. The importance of airborne algae and protozoa. *J. Air Pollution Control Assoc.* 19:946-951.
- Schlichting, H.E. and Bruton B. A. 1970. Some problems of pleomorphism and algal taxonomy. *Lloydia* 33:472-476
- Schlichting, J.E. Jr. 1970. Airborne algae and protozoa. *Carolina Tips*. 33(9):33-34.
- Silvany, R.E., Luckenbach, M. W. and Moore, M. B. 1987. The rapid detection of *Acanthamoeba* in paraffin-embedded section of corneal tissue with calcofluor white. *Arch. Ophthalmol*. 105:1366-1367.
- Singh, B.N. 1975. Pathogenic and Nonpathogenic Amoebae. John Wiley and Sons. New York . U. S. A. 1-33 pp.
- Sleight, M. 1989. Protozoa and other protists. E. Arnold ( Ed). London, England. Pp 342.

9. Bibliografía

- Stehr-Green, J.K., Bailey, T.M. and Visvesvara, G.S. 1989. The epidemiology of *Acanthamoeba* Keratitis in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* 107:331-336.
- Stites, D., Abba, I., Parslow, I. 2000. Manual Moderno. Pp 451-510.
- Valenzuela, G., López-Corella, E., and De Jonckheere J. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 78(4): 558-559.
- Visvesvara, G.S., Schuster, F.L., and Martinez. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N: G., N. Sp., Agent of Amebic Meningoencephalitis in Humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* 40(4): 504-514.

## ANEXO A

### PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

#### Medio Basal de Bold

1.- Se preparan 6 soluciones stock (macroelementos). Se disuelve el peso indicado de las siguientes sales en 400 ml de agua destilada.

NaNO <sub>3</sub> .....	10.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	7.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	3.0 g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O.....	1.0 g
NaCl.....	1.0 g

De estas soluciones se toman 10 ml de cada una para 1 litro de solución final.

2.- Se preparan las siguientes soluciones stock (microelementos):

#### a) Solución stock de EDTA

50 g de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y 31 vg de KOH diluidos en 1 litro de agua destilada.

#### b) Solución stock H-Fe

4.98 g de FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O se disuelve en 1 litro de agua acidificada. Ésta se prepara adicionando 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a 999 ml de agua destilada.

#### c) Solución stock H-Boro

11.42 g de H<sub>3</sub> BO<sub>3</sub> se disuelven en 1 litro de agua destilada.

#### d) Solución stock de H-H<sub>5</sub>

ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	8.82 g
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O.....	1.44 g
MoO <sub>3</sub> .....	0.71 g
Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O.....	1.57 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O.....	0.49 g

Todo lo anterior se disuelve en 1 litro de agua acidificada (como en el inciso b), Un ml de cada solución stock de microelementos se adiciona a 1 litro de la solución final. Se disuelve todo y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

### **Agar no Nutritivo con *Escherichia coli* (NNE)**

NaCl.....	0.12 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	0.004 g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O.....	0.004 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.142 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.136 g
Bactoagar.....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500 ml de agua destilada y disolver, complementar el volumen de 1000 ml y hervir hasta que se disuelva al agar completamente. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Se vierte de 14 a 20 ml en cajas Petri. Cuado el agar se haya solidificado se vierte 5 gotas de una suspensión concentrada de bacteria *E. coli* muerta por calor a 70°C durante 30 min. distribuyendo la suspensión de bacteria sobre la superficie del agar. Las cajas se guardan en el refrigerador.

### **Medio PBSGM (Chang modificado)**

Peptona Biotriptasa.....	16.6 g
Dextrosa.....	2.7 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.9 g
Agua destilada.....	1000 ml

Los ingredientes se mezclan en seco y se disuelve en el agua destilada. Se envasa 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca y se esterilizan a 121°C durante 15 minutos. Ya frío el medio, a cada tubo se le agrega 0.3 ml se suero neonato de bovino con antibiótico. Se guardan en el congelador.

### Medio Bactocasitona (BC)

Bactocasitona..... 2.0 g  
Agua destilada..... 1000 ml

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos, se deja enfriar y se agregan 0.3 ml de suero neonato de bovino con antibiótico. Se guardan en el congelador.

### Medio Ringer

NaCl..... 6.0 g  
KCl..... 0.075 g  
CaCl<sub>2</sub>..... 0.1 g  
NaHCO<sub>3</sub>..... 0.1 g  
Agua destilada..... 1000 ml  
PH..... 7-7.4

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos, dejarse enfriar y agregar *E. coli* o *E. aerogenes* inactivada.

### Preparación de suero neonato de bovino

El suero se descongela y se pone en baño María a 56°C durante 30 minutos para descompletarlo. Se prepara una mezcla de antibiótico a base de penicilina G sal sódica y Kanamicina de la siguiente manera:

Penicilina G 1000 000 U en 2 ml de agua destilada  
Kanamicina 1 g en solución 3 ml  
Volumen total 5 ml

## ANEXO B

### ISOELECTROENFOQUE

Propionil esterasa (PE)

Sal RR de azul rápido..... 100 mg  
Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 5.7..... 100 ml  
 $\alpha$ -naftilpropionato al 1%  
(en acetona al 50%)..... 2 ml

#### Amortiguador de fosfatos 0.1 pH 5.7

##### Solución 1

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ..... 6.875 g  
2.83 g  
Agua destilada..... 250 ml  
100 ml

##### Solución 2

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....  
Agua destilada.....

Mezclar 230 ml de la solución 1 y 20 ml de la solución 2 con 250 ml de agua destilada.

#### Preparación de los concentrados amibianos para IEF

\*\*\* Cada aislamiento amibiano, se resiembr a en frascos para cultivo de tejido de 25 cm<sup>3</sup> con 10-15 ml del medio Chang modificado, por tres días a 30°C o hasta observar una monocapa de trofozoitos, la cual debe de representar alrededor de 10<sup>6</sup> cel/ml.

\*\*\* Los frascos de cultivo se dejan tres minutos a una temperatura de -20°C teniendo cuidado que el medio no se congele. Se agitarán vigorosamente los frascos y el medio se vierten en tubos de centrifuga de polipropileno de 15 ml. Las células amebianas se concentran por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y se desecha cuidadosamente el sobrenadante.

\*\*\* La pastilla de células se resuspenden en agua destilada y se transfiere a tubos de microcentrifuga de 2.0 ml y se concentra nuevamente a 4500 gravedades por 10 minutos, se tira con cuidado el sobrenadante, cuidando que la pastilla quede intacta.

\*\*\* Para lisar las células, se agregan 10µl de Tritón X-100 y la muestra se congela y descongela dos veces a -20° C. Cuando este concentrado no se utiliza inmediatamente se guardan hasta 1 mes a -75 ° C o en Nitrógeno líquido.

Para utilizar los concentrados en isoelectroenfoco, se descongelan las muestras a 37 °C, y se vuelven a congelar inmediatamente, no es recomendable descongelar más de tres veces, ya que las enzimas pierden su actividad y las marcas de los zimogramas pueden verse muy claras o no ser visibles (Bonilla,200).

### **Preparación de los geles de agarosa**

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml, se disuelve la solución de agarosa en agua hirviendo. El gel de agarosa, se prepara mezclando lo siguiente:

0.3 g de agarosa IEF  
3.6 g de sobitol  
27 ml de agua destilada

Mientras se disuelve la agarosa, se prepara el molde de la siguiente manera:

\*\* La tabla de nivelación se coloca horizontalmente.

\*\* Vaciar 2 ml de agua destilada en el centro de la placa de nivelación.

\*\* Colocar una hoja de película Gel Bond para geles de agarosa de 114 x 225 mm, sobre la placa de nivelación con la superficie hidrofílica hacia arriba.

\*\* Con un rodillo se hace presión sobre la película y contra la placa de nivelación para eliminar el exceso de agua y las burbujas que se hubieran formado bajo el gel. Se seca la película y sus orillas con papel absorbente suave.

\*\* Se coloca el marco de acrílico sobre la película y se sujeta con grapas para formar el molde.

**\*\*Después de disolver completamente la agarosa, se deja enfriar a aproximadamente 75°C. Se agrega el anfolito (1.9 ml), se mezcla suavemente para no formar burbujas y se vacía rápida y uniformemente en el molde, dejando gelificar la solución de 10-15 minutos. Se retira el marco de acrílico de la tabla niveladora con cuidado para no dañar el gel. Se deja que la agarosa gelifique completamente durante 1 hora a 4°C.**

**\*\* Se agregan 2ml de agua destilada sobre la placa de enfriamiento de la unidad de electroforesis y se coloca encima la película con el gel asegurándose de que el agua se extienda en una delgada película bajo el gel, se elimina el exceso de agua con toallas de papel absorbente.**

**\*\* Se sumergen los electrodos en las solución del ánodo y cátodo respectivamente. Se colocan los electrodos sobre papel filtro por 1 minuto para eliminar el exceso de líquido (Los electrodos no deben gotear) y luego se colocarlos sobre el gel aproximadamente a 1 mm de los extremos.**

**\*\* Se coloca 25µl de cada muestra en los papeles aplicadores 10x5 mm.**

**\*\* Se coloca la tapa del equipo de electroforesis asegurándose que exista un estrecho contacto entre los electrodos de la tapa y los electrodos colocados sobre el gel.**

**\*\* Se ajusta la fuente del poder a 15W y 1500V de corriente ilimitada. Se quita los aplicadores de muestra después de 45 minutos. Se deja pasar 45 minutos más, se apaga el equipo, se levanta la tapa y se quitan los electrodos del gel.**

**\*\* Se coloca el gel en solución reveladora de las enzimas correspondientes a 37°C durante 15-30 minutos.**

**\*\* El gel se seca colocando tres hojas de papel secante sobre su superficie seguidas de una placa de vidrio y un peso de alrededor de 1 kg. Después de 15 minutos se remueve todo y con una secadora de pelo se termina de secar el gel.**



### **Revelado de proteínas totales.**

\*\* Se fija el gel en una solución fijadora (ácido sulfosalicílico al 5% y ácido tricloroacético al 10%) por 30 minutos.

\*\* Se lava el gel dos veces (25 minutos cada vez) en una solución (Metanol ácido acético agua destilada 3:1:6).

\*\* El gel se seca colocando tres capas de papel filtro sobre su superficie seguida de una placa de cristal y un peso alrededor de 1 Kg después de 15 minutos se remueve todo y el gel y se seca con una secadora de pelo.

\*\* Una vez seco el gel se coloca en una solución teñidora de azul de Coomassie al 0.2% por 15 minutos.

\*\* Se coloca el gel en solución desteñidora hasta que el fondo del gel este claro y finalmente se seca la película con una secadora de pelo (Bonilla, 2000).