



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“IDENTIFICACIÓN DE AMIBAS DE VIDA LIBRE EN
CUEVAS DE LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Norma Angélica Montes Colima

DIRECTORA DE TESIS: D. en C. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2012



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.

***CON MUCHO CARIÑO DEDICO ESTA TESIS A:
MIS PADRES, ABUELOS Y HERMANOS***

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que contribuyeron de una u otra manera en la elaboración de esta tesis.

En primer lugar deseo agradecer a mis padres, por apoyarme y guiarme en todo momento, sobre todo por alentarme siempre para superarme y ser una mejor persona en todos los aspectos de mi vida. Este trabajo no es solo un logro mío, pues yo sé el gran esfuerzo y dedicación que ambos le tienen a esta familia y la emoción que les causa el haber concluido conmigo este capítulo de mi vida. Gracias y los quiero mucho.

A mis hermanos Paty, Ale y Kike, que han estado siempre para ayudarme y darme el empujoncito cuando lo necesité, sin su apoyo y cariño no hubiera sido lo mismo.

A mis abuelos, que quiero tanto y aunque estén lejos o ausentes, llevo día con día muchas de sus enseñanzas, gracias por creer en mí y por estar a mi lado en todo momento.

A mis familiares, gracias por sus buenos deseos, a mis tías y tíos, siempre de una o de otra forma he sentido su apoyo y cariño, gracias por compartir este momento conmigo.

A mis amigos, que han estado en las diferentes etapas de mi vida, gracias por estar a mi lado apoyándome, haciéndome sonreír, por dejarme aprender y compartir con ustedes de buenos y malos momentos. Sobre todo gracias por la amistad que me brindan.

A la UNAM, por haber recibido de ella mi formación profesional, por los excelentes profesores que desde el inicio de mi carrera me enseñaron todo lo que sabían, demostrando ese gran amor que ahora tengo por mi carrera, con el único propósito de formar buenos profesionistas.

Especial agradecimiento, a la Dra. Elvia Gallegos Neyra y al M. en C. Arturo Calderón Vega por sus consejos y experiencias que me dieron a lo largo del tiempo que dedicaron para el termino de esta tesis.

A mi jurado de tesis, a la M. en C. María de los Ángeles Sanabria, a la M. en C. María Dolores Hernández y a la Dra. Nandini Sarma, por su disposición y tiempo al leer mi trabajo de tesis, por sus observaciones, sugerencias y correcciones a este.

Finalmente agradezco a la Dra. Rosaura Mayen Estrada y a la M. en C. Itzel Sigala Regalado del Laboratorio de Protozoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM por las muestras y fotografías otorgadas mediante el convenio de colaboración con el Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE) de la FES- Iztacala, UNAM.

*“Cuando quieres realmente una cosa, todo el Universo
conspira para ayudarte a conseguirla.”*

Paulo Coelho

CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
	1. Amibas de vida libre.	2
	2. Ciclo de vida de las AVL.....	2
	3. Taxonomía de las AVL.....	4
	4. Ecología de las AVL.....	6
	a) Agua.....	7
	b) Suelo.....	8
	c) Guano.....	8
	5. Importancia médica de las AVL	8
	6. Características de las cuevas de México	12
III.	ANTECEDENTES.....	13
IV.	JUSTIFICACIÓN.	16
V.	OBJETIVOS.	17
	1. General.....	17
	2. Particulares.....	17
VI.	ÁREAS DE ESTUDIO.....	18
	1. Grutas de Tziranda, Municipio de Cd. Hidalgo, Michoacán..	18
	2. Grutas de Karmidas, Municipio de Zapotitlán, Puebla.....	19
	3. Cueva “La Joya”, Municipio de Taxco, Guerrero.....	21
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
	1. Recolecta de las muestras.....	23
	2. Aislamiento de las AVL.....	23
	a) Muestras líquidas.....	23
	b) Muestras sólidas.....	24
	3. Clonación.....	24
	4. Identificación morfológica de las AVL.....	25
	5. Medición de quistes y trofozoítos.....	25
	6. Registro fotográfico.....	25
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
	1. Aislados amebianos.....	26
	2. Identificación morfológica, descripción y registro	

fotográfico.....	31
a) Género: <i>Acanthamoeba</i>	32
b) Género: <i>Naegleria</i>	38
c) Género: <i>Vahlkampfia</i>	39
d) Género: <i>Hartmannella</i>	42
e) Género: <i>Echinamoeba</i>	44
f) Género: <i>Vanella</i>	45
g) Género: <i>Cochliopodium</i>	45
h) Género: <i>Leptomyxa</i>	46
i) Género: <i>Saccamoeba</i>	46
j) Género: <i>Rhizamoeba</i>	47
k) Género: <i>Rosculus</i>	48
IX. CONCLUSIONES.....	49
X. BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXO 1. MEDIO DE CULTIVO.....	57

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

1. Figura 1. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba sp.</i>	3
2. Figura 2. Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i>	4
3. Cuadro 1. Clasificación de los Eucariontes con énfasis en los súper grupos con representantes amébidos (Adl <i>et al.</i> , 2005).....	5
4. Figura 3. Ubicación geográfica del Municipio de Cd. Hidalgo, Michoacán en donde se encuentran las Grutas de Tziranda	18
5. Figura 4 y 5. Entrada a las Grutas de Tziranda.....	19
6. Figura 6. Ubicación geográfica del Municipio de Zapotitlán, Puebla en donde se encuentran las Grutas de Karmidas	20
7. Figura 7 y 8. Cuerpos de agua de las Grutas de Karmidas.....	21
8. Figura 9. Ubicación geográfica del Municipio de Taxco, Guerrero en donde se encuentra la Cueva “La Joya”.....	21
9. Figuras 10 y 11. Cuerpos de agua de la Cueva “La Joya”.....	22
10. Cuadro 2. Fechas de recolectas y los biotopos muestreados en cada cueva.....	26
11. Figura 12. Gráfica de diversidad de géneros amebianos presentes en las tres cuevas muestreadas.....	27
12. Figura 13. Gráfica de la diversidad de especies del género <i>Naegleria spp.</i>	28
13. Figura 14. Gráfica de la diversidad de especies del género <i>Acanthamoeba spp.</i>	28
14. Cuadro 3. Riqueza específica de amibas presentes en la cueva y las grutas.....	29
15. Figura 15. Gráfica de porcentaje de organismos amebianos aislados por biotopo.....	30
16. Figura 16. Gráfica de riqueza específica de especies de amibas encontradas por biotopo.....	31

Identificación morfológica, descripción y registro fotográfico de las amibas aisladas de las cuevas y grutas

17. Figura 17. <i>Acanthamoeba astronyxis</i>	32
18. Figura 18. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	33
19. Figura 19. <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	34
20. Figura 20. <i>Acanthamoeba griffini</i>	35
21. Figura 21. <i>Acanthamoeba palestinensis</i>	35
22. Figura 22. <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	36
23. Figura 23. <i>Acanthamoeba quina</i>	37
24. Figura 24. <i>Acanthamoeba triangularis</i>	37
25. Figura 25. <i>Naegleria fowleri</i>	38
26. Figura 26. <i>Naegleria gruberi</i>	39
27. Figura 27. <i>Vahlkampfia avara</i>	39
28. Figura 28. <i>Vahlkampfia enterica</i>	40
29. Figura 29. <i>Vahlkampfia ustiana</i>	41
30. Figura 30. <i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	42
31. Figura 31. <i>Hartmannella vermiformis</i>	43
32. Figura 32. <i>Echinamoeba exudans</i>	44
33. Figura 33. <i>Vannella platypodia</i>	45
34. Figura 34. <i>Cochliopodium actinophorum</i>	45
35. Figura 35. <i>Leptomyxa reticulata</i>	46

36. Figura 36. <i>Saccamoeba limax</i>	46
37. Figura 37. <i>Rhizamoeba flabellata</i>	47
38. Figura 38. <i>Rosculus ithacus</i>	48

I. RESUMEN

El estudio de las amibas de vida libre (AVL) en cuevas de México es muy escaso es por eso que el presente estudio tuvo como objetivo registrar las especies de AVL en tres ambientes cavernícolas ubicadas en tres estados de la República Mexicana: la Cueva de "La Joya" (Guerrero), las Grutas de Karmidas (Puebla) y las Grutas de Tziranda (Michoacán).

Dentro de cada cueva se muestrearon cuatro biotopos: agua, suelo, guano y musgo, se realizaron dos muestreos por cueva (excepto las Grutas de Tziranda donde solo hubo una recolecta), los biotopos se inocularon directamente en placas de Petri con agar NNE, y una monocapa de bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor a 56 °C, se cultivaron y se aislaron las colonias de AVL para su posterior observación con un microscopio óptico invertido, se realizó el registro fotográfico y la identificación morfológica de las especies de AVL.

Se aislaron e identificaron 21 especies amebianas, correspondientes a 11 géneros de AVL, presentes en los cuatro biotopos, los géneros identificados con mayor presencia fueron *Acanthamoeba* (65%) y *Naegleria* (11%) lo cual los convierte en los géneros más abundantes en este estudio, el biotopo con mayor presencia de AVL y mayor riqueza específica fue el agua.

El presente estudio demuestra que las AVL son capaces de sobrevivir en ambientes cavernícolas, bajo diversas condiciones ambientales y en los cuatro biotopos presentes en las cuevas muestreadas.

II. INTRODUCCIÓN

1. Amibas de vida libre

Los eucariontes se caracterizan por ser organismos unicelulares, a veces plasmodiales o coloniales, generalmente sin color ni pared celular en el estado trófico. Estos organismos presentan diferentes formas, alargados, reniformes, piriformes, estrelladas u otras más. En general, presentan mitocondrias tubulares, cuerpos de Golgi y peroxisomas. Su movimiento es por medio de flagelos, cilios o pseudópodos; la mayoría son de tamaño microscópico, son organismos simbiotes, parásitos u organismos de vida libre (Sigala, 2008).

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos, que pertenecen según la nueva clasificación propuesta por Adl y colaboradores (2005) a los super-grupos Amoebozoa, Excavata y Rhizaria, estos organismos tienen la capacidad de existir en la naturaleza y en el caso de algunos géneros tienen la capacidad invadir a un hospedero por lo cual a estos se les han denominado como organismos anfitriónicos (Martínez, 1985; Page, 1988; Martínez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara y McGuire, 2006), las AVL son organismos cosmopolitas que habitan ambientes húmedos y se pueden encontrar en suelo, en agua y en aire, vehículo que utilizan como medio de dispersión (Bonilla *et al.*, 2001).

2. Ciclo de vida de las AVL

El ciclo de vida de las AVL (Fig. 1) comprende una fase activa llamada trofozoíto y una forma quística o de latencia; presentándose además en el caso del género *Naegleria*, una forma flagelada (Bottone, 1993; John, 1993). La forma de quiste es la fase de resistencia en la cual puede resistir largos períodos en condiciones adversas como: la desecación, concentraciones bajas de oxígeno, escasez de alimento, etc. (John, 1993). Se sabe que en este estadio estos organismos pueden ser resistentes a varios tratamientos de desinfección (Lloyd *et al.*, 2001;

Greub y Raoult, 2004; Thomas *et al.*, 2008). La forma activa para estos organismos es la llamada forma de trofozoíto en la cual las amibas se alimentan y reproducen (John, 1993; Marciano *et al.*, 2000).

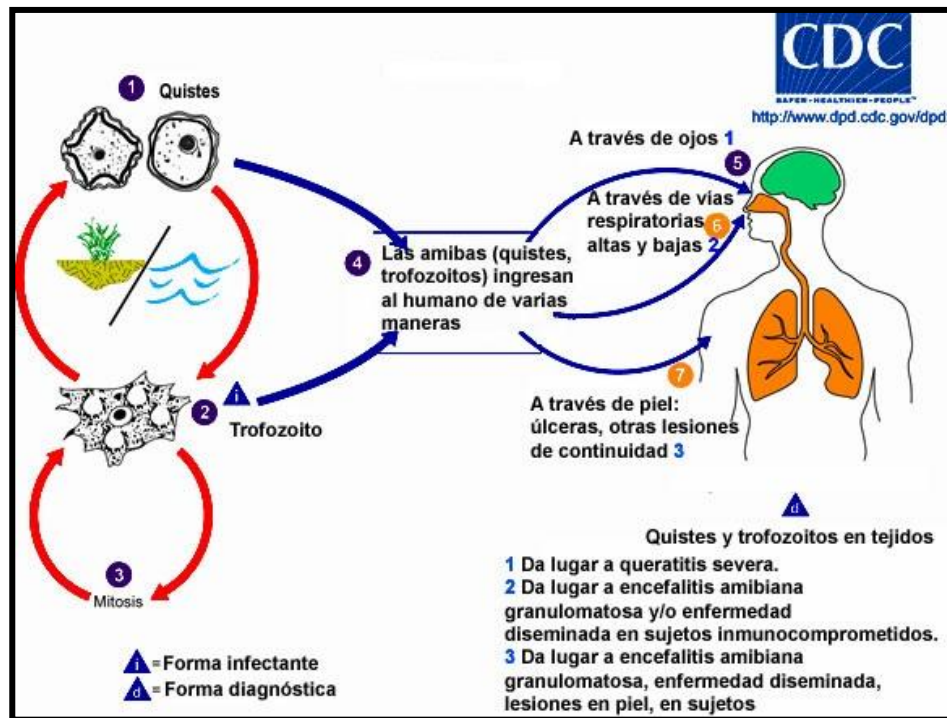


Figura 1. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (CDC, 2012)

En el caso de *Naegleria* (Fig. 2) se destaca su capacidad para cambiar a la forma flagelada esto ocurre cuando la amiba se encuentra en condiciones ambientales no favorables como: falta de nutrimentos, cambios de temperatura y pH, entre otros. Esta forma, es transitoria ya que el organismo no se alimenta ni se divide y después de un tiempo, cuando la amiba encuentra nuevamente un ambiente adecuado, regresa a su forma amebiana, este proceso se realiza en cuestión de minutos (John, 1993).

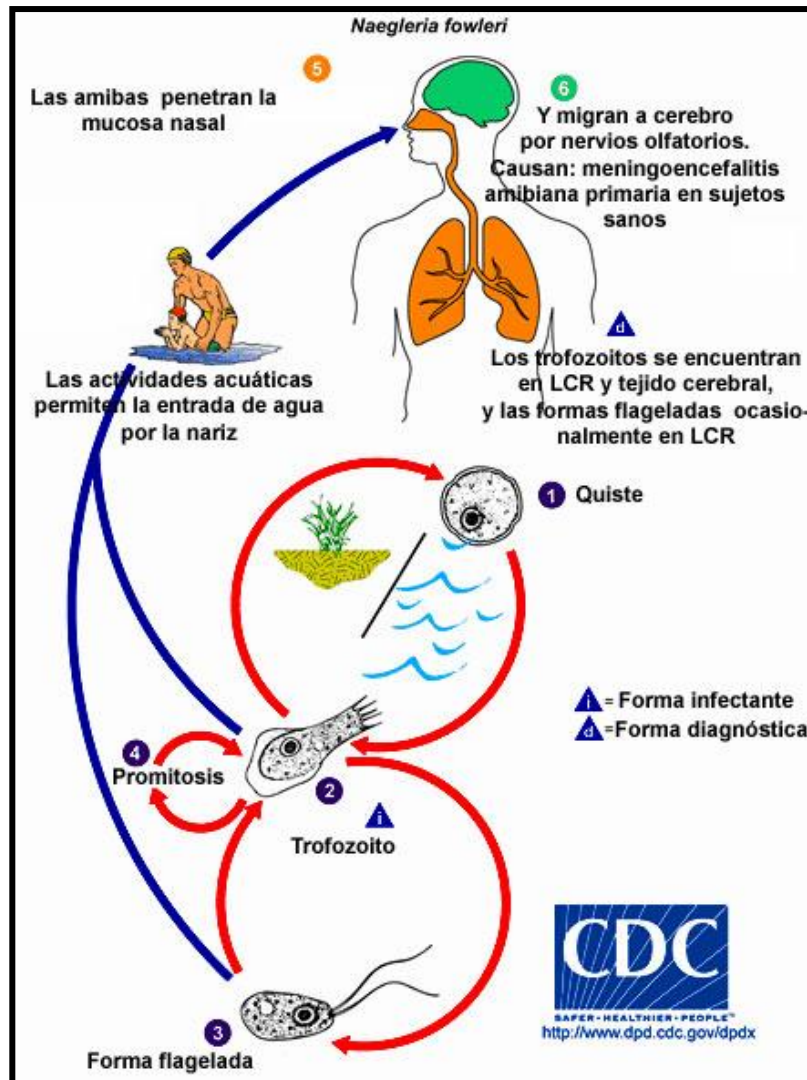


Figura 2. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri* (CDC, 2012)

3. Taxonomía de las AVL

Desde la clasificación propuesta por la Sociedad de Protozoólogos (Levine *et al.*, 1980), se han hecho muchos cambios para el entendimiento del linaje de los eucariontes. En particular, el clásico esquema de Bütschli (1880–1889), que divide a los protozoos en cuatro clases: Sarcodina (organismos ameboides), Sporozoa, Mastigophora (flagelados) e Infusoria (ciliados), fue abandonada por los protozoólogos (Corliss, 1998; Adl *et al.*, 2005).

Como resultado de estos cambios, Simpson y Roger (2002, 2004) y Adl y cols. en el 2005 (sistema aprobado por la "*International Society of Protistologist*") proponen un esquema de clasificación con énfasis en los organismos protistas en donde reconocen taxones que están evolutivamente relacionados y al resto los agrupan parafileticamente. En este esquema, el grupo de los eucariontes se divide en seis grupos filogenéticos: (1) Opisthokonta, agrupa a los animales, el fungi, coanoflagelados y mesomycetozoarios; (2) el Amoebozoa, agrupa a la mayoría de las amibas; (3) Excavata, agrupa a los oxymonadidos, parabasalidos, diplomonadidos, flagelados, euglenidos y heteroloboseos; (4) Rhizaria, agrupa a los foraminíferos, radiolarios y a los cercozoarios; (5) Archaeplastida, agrupa a los glaucophyta, algas verdes y rojas, y plantae; (6) Chromoalveolata, agrupa a los alveolata (ciliados, dinoflagelados y apicomplexa) (Keeling 2003) (Cuadro1).

Cuadro 1. Clasificación de los Eucariontes con énfasis en los súper grupos con representantes amébidos (Adl *et al.*, 2005)

Super-grupos	Primer rango	Segundo rango
Amoebozoa	Tubulinea	Leptomyxida, Testacealobosia,
	Flabellinea	Tubulinida, Cochliopodium,
	Stereomyxida	Dactylopodia, Thecamoebida,
	Acanthamoebidae	Vanellida
	Entamoebida	
	Mastigamoebidae	
Excavata	Pelomyxa	
	Fornicata	Carpediemonas, Eopharyngia
	Malawimonas	
	Parabasalia	Cristamonadida, Spirotrichonymphida,
		Trichomonadida,
		Trichonymphida
	Preaxostyla	Oxymonadida, Trimastix
	Jakobida	Histonidae, Jakoba
	Heterolobosea	Acrasidae, Gruberellidae,
		Vahlkampfiidae

	Euglenozoa	Euglenida, Diplonemea, Kinetoplastea
Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadida, Chlorarachniophyta, Nucleohelea, Phaeodarea, Phytomyxea, Silicofilosea
	Haplosporidia	No se tienen subdivisiones
	Foraminifera	
	Gromia	
	Radiolaria	Acantharia, Polycystinea, Sticholonche

Este sistema jerárquico no cuenta con designaciones de rango formal como "clase", "subclase", "orden", etc. la decisión de que esto fuera así es para hacerlo más útil y evitar el problema común de que un solo cambio cause una cascada de cambios en el sistema, lo cual hace que este sistema sea más fácil de modificar.

4. Ecología de AVL

Como ya se hizo referencia, las AVL presentan en general una distribución cosmopolita y son ubicuas en la naturaleza. Las especies patógenas son termotolerantes, aunque no todas las termotolerantes son patógenas (Martínez, 1985). Su hábitat principal es el suelo y desde ahí pueden llegar a los cuerpos de agua arrastradas por escurrimientos o a través del aire (Rivera *et al.*, 1994; Bonilla, 2000;).

Los mecanismos de dispersión por los cuales se da la entrada y la colonización de los protozoos a formaciones cársticas y grutas en general tienen lugar por la intermediación de las aguas que penetran o se infiltran en las capas subterráneas y originan los ríos, riachuelos y aguas subterráneas. De esta manera, penetran a las formaciones en cualquiera de sus estadios, lo que permite explicar la existencia en las grutas de una comunidad rica y diversa de protozoos, asimismo, no queda excluido el ingreso de protozoos por la entradas de la gruta a través de las corrientes de aire e inclusive en las grutas

acondicionadas y visitadas por el hombre este mismo puede servir como medio para la entrada de los protozoos a la cueva (Golemansky y Bonnet, 1994).

Las AVL son más frecuentes en cuerpos de agua con temperatura por arriba de los 25° C y en aguas naturales de los trópicos y subtrópicos, con niveles óptimos de oxígeno, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente (bacterias y materia orgánica) y un mínimo de humedad; sin embargo, pueden soportar variaciones amplias en cualquiera de los parámetros anteriormente mencionados (Bonilla *et al.*, 2001).

- a) Agua:** En el agua desempeña un papel fundamental en el flujo energético y en el reciclado de los nutrimentos. Los cuerpos de agua son un enlace fundamental entre desintegradores y niveles tróficos superiores, convirtiéndose en un eslabón importante en el circuito microbiano acuático (Fenchel, 1987). Las especies patógenas se observan más frecuentemente en cuerpos de agua con temperaturas mayores a los 30 °C y aguas naturales de los trópicos y subtrópicos. En países templados y fríos las amibas patógenas proliferan mejor durante los meses más cálidos, lo que lleva a pensar en un patrón estacional (Rondanelli, 1987; Rivera *et al.*, 1994). Algunos investigadores, han propuesto que el incremento brusco de temperatura más que una temperatura elevada constante es lo que realmente favorece la predominancia de las naeglerias patógenas (Pernin *et al.*, 2001).

Las comunidades acuáticas en las grutas se caracterizan por su extraordinaria simplicidad. La ausencia absoluta de luz impide la existencia de organismos fotosintetizadores, provocando una dependencia de los organismos por el flujo de nutrientes del exterior.

Es lógico suponer que esta relativa escasez en el número de especies de individuos resulta de la pobreza en cuanto a nutrientes que presenta la biocenosis acuática en cuevas (Morales y Vázquez, 1984).

- b) Suelo:** Las AVL se encuentran en mayor proporción en la microcapa superficial, así como en las hojas desprendidas o sobre las plantas con un alto grado de adaptación debido a la abundancia de nutrimentos y al establecimiento de quistes aéreos (Kyle *et al.*, 1986; Sigala, 2008).
- c) Guano.** De este tipo de sustrato hay pocos estudios realizados, se han encontrado protozoos viviendo sobre el guano y el suelo en general sobre todo por la gran cantidad de bacterias que hay, por lo cual es un medio idóneo para el crecimiento de estas, se tienen reportes de amibas desnudas, flagelados sin pigmentos y ciliados, pero en realidad no se conoce bien las especies que viven en este sustrato (Sigala, 2008).

5. Importancia médica de AVL

Existen cuatro géneros de amebas de vida libre asociadas a enfermedad en los humanos, varias especies de *Acanthamoeba* spp, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata* (Oddó *et al.*, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007; Peralta y Ayala 2009).

Naegleria fowleri, causa una infección aguda que afecta al sistema nervioso central (SNC) llamada Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) o naegleriosis. El mayor número de casos se ha presentado en niños y jóvenes previamente sanos con antecedente de haber nadado durante el verano en cuerpos de agua naturales contaminados o artificiales inadecuadamente clorados. La ruta de invasión de *N. fowleri* es a través de la aspiración por las fosas nasales del agua contaminada (Lasake *et al.*, 2009; Goudout *et al.*, 2012).

La mayoría de los pacientes mueren en la primera o segunda semana después de la manifestación de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como, la virulencia de las amibas (Rodríguez, 1984; Martínez y Visvesvara, 1997). El análisis por género nos muestra que *Naegleria* vive principalmente en el suelo y ambientes acuáticos calentados natural o artificialmente (Bottone, 1993), aunque también se puede establecer en estanques, cascadas, manantiales, lagos y ríos con temperaturas menores (Rondanelli, 1987; Bonilla *et al.*, 2000). *Naegleria*, se ha aislado de agua de grifo, piscinas, aguas termales, aguas de desecho, canales de riego, tinas de hidroterapia, lagos artificiales y efluentes calientes de plantas termoeléctricas (Rivera *et al.*, 1986; Ramírez y Bonilla, 1995).

Acanthamoeba, es una amiba oportunista capaz de producir encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) o acantamebiasis, una enfermedad subaguda o crónica. Se presenta en individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes, como alcohólicos crónicos, embarazadas, VIH positivos, enfermos con SIDA, con lupus eritematoso sistémico o cáncer (Martínez y Visvesvara, 1997). Las lesiones que produce esta amiba son de tipo granulomatosas, encontrándose en ellas trofozoítos y quistes. Otra infección que provoca es la Queratitis Amebiana (QA) la cual es más frecuente en individuos sanos que utilizan algún tipo de lente de contacto o con menor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos. Esta, es una inflamación crónica en la córnea que puede causar la pérdida del ojo. Las amibas invaden el estroma corneal por una solución de continuidad del epitelio, el organismo es capaz de lograr la patología aun sin un traumatismo menor o abrasión previa de la córnea (Omaña, 2011). *Acanthamoeba*, se encuentra distribuida en todos los ambientes y probablemente es la amiba con mayor distribución en la naturaleza, debido a la gran resistencia de sus quistes (Page, 1988; Armstrong, 2000). Como consecuencia de su distribución cosmopolita el contacto con el ser humano es constante y probablemente es la razón de la

presencia de anticuerpos de *Acanthamoeba* y de *Naegleria* en suero humano (Bottone, 1993; Khan, 2003).

Para su mejor identificación, Pussard y Pons (1977) dividieron a las especies de *Acanthamoeba* en tres grupos según el tamaño y las características morfológicas de sus quistes. Grupo I caracterizado por quistes grandes ($>18 \mu\text{m}$) con endoquiste estrellado y ectoquiste esférico (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, y *A. tubiashi*). Grupo II, quistes más pequeños ($<18 \mu\text{m}$), endoquiste poligonal y ectoquiste arrugado (*A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhysodes* y *A. triangularis*) y Grupo III, con quistes pequeños ($<18 \mu\text{m}$), endoquiste redondo o suavemente angular y ectoquiste ligeramente arrugado (*A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa* y *A. royreba*) (Pussard y Pons, 1977).

Debido a que *Balamuthia mandrillaris* solo se puede desarrollar en cultivos de tejido y en un medio axénico tales como: cultivos de células Vero (riñón de mono verde africano) y en el medio axénico BM-3, por esta razón la búsqueda de su hábitat natural (Visvesvara *et al.*, 1993; Gelman *et al.*, 2001; Schuster, 2002). Esta AVL se aisló por primera vez de un mandril y posteriormente de pacientes con EAG (Visvesvara *et al.*, 1993).

El cuadro producido por *B. mandrillaris* y *S. pedata* es muy similar al descrito para *Acanthamoeba*, sin embargo, no está claro si estas dos se comportan como organismos oportunistas o si son patógenos primarios letales, que no depende del estado del hospedero. La información al respecto es escasa y los cuadros observados se han presentado principalmente en individuos inmunocompetentes.

Por otro lado, se ha demostrado que las AVL, participan como vectores de diferentes especies de bacterias actuando como endosimbiontes de las AVL

(Barker *et al.*, 1994). Una de estas bacterias es *Legionella pneumophila*, capaz de multiplicarse dentro de la célula amebiana, causar lisis y liberarse nuevamente en el ambiente. Las AVL, ayudan a mantener a *V. cholerae* en aguas naturales en algunas partes del mundo donde no hay una asociación evidente de casos reportados por cólera clínica. También, algunas bacterias coliformes y *Mycobacterium avium* sobreviven dentro de las amibas aunque sin multiplicarse. De esta manera, el quiste amebiano no solo ofrece a las bacterias un mecanismo de protección para evadir ambientes hostiles, sino también les provee un medio para transportarse y colonizar nuevos hábitats aprovechando los mecanismos de dispersión de las AVL (Greub y Raoult 2004; Hsu *et al.*, 2011).

El conocimiento sobre los mecanismos que utilizan las AVL patógenas para evadir la respuesta inmune es muy escaso no obstante, se conoce que en la protección contra esta infección letal se ven implicadas las respuestas inmunes innata y adquirida, estudios previos en animales han demostrado que es complicado descifrar la vía de resistencia a esta infección pues son muchos los factores que influyen en el mecanismo de defensa del hospedero tales como: la edad, la dosis y la cepa con la que se inoculan a los animales, virulencia, entre otros. (Ferrante, 1991; Martínez y Visvesvara 1997; Marciano-Cabral, *et al.*, 2003).

Se sabe que la respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, cuando el organismo es invadido por una AVL, mediante la activación del complemento C3b generando factores opsonicos que desempeñan un papel en el reconocimiento de las amibas ante las células fagocíticas, también se considera que los complementos C3a y C5a, se activan y actúan como mediadores de la inflamación y del daño tisular o bien pueden ayudar a eliminar a las amibas del organismo aunque esto aún está por definirse (Marciano-Cabral, *et al.*, 2003).

6. Características de las cuevas en México

Las cuevas, por su origen se pueden dividir en volcánicas (formadas durante escurrimientos de lava) o cársticas (formada cuando el agua disuelve las rocas calizas a lo largo de las fracturas, formando canales de drenaje y conductos subterráneos). Estas últimas son las más importantes en número y dimensiones. La formación de estas estructuras, se cree fue en el periodo Cretácico, ya que durante este periodo la mayor parte del país se encontraba bajo el mar, formando una serie de cuencas profundas y plataformas, de esta forma, se fueron depositando sedimentos formados principalmente por carbonatos de calcio. Así que, para principios del periodo Terciario estos sedimentos transformados en roca caliza, fueron plegados y transformados en las sierras que actualmente observamos. Estas rocas calizas, estuvieron expuestas a la erosión sub-aérea y acuática que comenzaron a disolver para formar los causes subterráneos (Espinaza, 1994; Sigala, 2011).

Las cuevas se pueden clasificar según sus temperaturas (templadas o tropicales), humedad, cantidad de agua que pueden contener, si cuentan con ríos o son totalmente secas y finalmente, si son de agua dulce, marina o anquihalinas es decir, que presentan una zona de interacción de las aguas dulces epicontinentales y las marinas saladas (Mejía, 2008; Sigala, 2011).

Desde el punto de vista ecológico, estas formaciones tienen un papel muy importante en el ciclo hidrológico (Mejía, 2008; Sigala, 2011), son refugio de diferentes especies de mamíferos, aves reptiles, peces y artrópodos. Así que, dentro de estos ecosistemas podemos caracterizar diferentes biotopos como son: agua, biopelícula, suelo y vegetación los cuales aportarán nutrientes para las diferentes especies que viven dentro de la cueva.

III. ANTECEDENTES

Las AVL de los géneros *Naegleria* spp. y *Acanthamoeba* spp. fueron reconocidos como organismos patógenos hace más de 35 años, cuando Malcolm Fowler y Rodney F. Carter reportaron los primeros cuatro casos de infecciones en humanos a causa de estas amibas. Sin embargo, son identificadas cada vez con más frecuencia, no sólo como causantes de enfermedad en inmunosuprimidos, sino también en huéspedes sanos, por lo que podrían considerarse entre las llamadas enfermedades emergentes (Fowler y Carter, 1965; Carter, 1972; Visvesvara *et al.*, 1993).

La AVL han sido identificadas con amplia distribución en todo el mundo y se han aislado de diversos materiales tales como: tierra de macetas encontradas en la casa de los pacientes (Schuster *et al.*, 2002), en aguas termales ya que las temperaturas altas pueden potencializar el desarrollo de estos parásitos que puede vivir a 45 °C (Pereira y Pérez, 2003), unidades de aire acondicionado, albercas para nadar (Rivera *et al.*, 1983), en varios sistemas domésticos de agua, (Michel *et al.*, 1998), equipos de diálisis, lentes de contacto, secreciones nasales, exudados faríngeos de pacientes con enfermedades respiratorias, pero también de pacientes sanos (John, 1982). También se han aislado de diferentes tipos de suelo, sedimento oceánico, sedimento de lagos, lodos resultantes del tratamiento del agua de desecho, polvo de casas-habitación y de composta (Rondanelli, 1987; John, 1993; Bonilla *et al.*, 2001).

Existe registro de estos organismos en ambientes extremos como cuevas o grutas, ya que uno de los primeros reportes donde se documenta la existencia de las AVL fue a principios del siglo pasado, donde Will Scott realizó un estudio ecológico de plancton de la cueva de Shawnee en el estado de Indiana en E.U.A, en el que encontró diversos protozoos entre ellos amebas de los géneros *Arcella* y *Diffugia* (Scott, 1907).

La fauna acuática de las cuevas de la región de Valles de San Luis Potosí fue investigada por Osorio-Tafall (1943) con la inclusión entre otros animales de tres diferentes protozoos amébidos en el biotopo agua: *Arcella vulgaris* (testada), *Centropyxis aculeata* (testada) y *Actinophrys sol* (heliozoo).

Hoffmann y cols. (1986) aislaron a diferentes protistas amébidos de dos sistemas de cuevas en la República Mexicana: la gruta de Juxtlahuaca, Colotlipa del Estado de Guerrero donde se aislaron a los siguientes géneros y especies de amibas del biotopo suelo: *Mayorella* sp., *N. gruberi*, *Naegleria* sp., *Platyamoeba* sp., *Platyamoeba placida*, *Platyamoeba stenopodia*, *Protoacanthamoeba caledonica*, *Tetramitus* sp., *Vahlkampfia aberdonica*, *V. avara*, *V. froschi*, *V. magna*, *V. ustiana*, *Vannella* sp., *Vannella mira*, *Vannella platypodia* y *Vexillifera telma*.

En el estudio realizado por Sigala y cols. en el 2008, en la gruta Aguachil en Taxco, Guerrero se aislaron e identificaron a las siguientes géneros de amibas: *Arcella* sp., *Euglypha* sp., *Mayorella* sp. y *Vahlkampfia* sp. Todas estas especies fueron aisladas del suelo.

En el trabajo realizado en 2008 por Sigala titulado: "Registro protozoológico en cinco biotipos de la cueva de los riscos en Querétaro, México" se registraron ocho géneros de amebas desnudas: *Acanthamoeba* sp., *Hartmannella vermiformis*, *Lingulamoeba* sp., *Mayorella* sp., *Naegleria* sp., *Tetramitus* sp., *Thecamoeba* sp. y *Vahlkampfia* sp. y ocho géneros de amebas testadas: *Arcella* sp., *Cryptodifflugia* sp., *Cyclopyxis eurystoma*, *Chamydophrys* sp., *Difflugia* sp., *Euglypha filifera*, *Trinema* sp. y a *Tracheleuglypha dentata*, lo cual da una clara evidencia de su presencia en este tipo de ambientes.

Fabiola Bastian y cols. en 2008, realizó un estudio en la cueva de Lascaux en España donde encontró evidencia de la presencia de amibas del género *Acanthamoeba* en la biopelícula del agua.

En una investigación realizada en 2008 por Sigala-Regalado y Mayén-Estrada identificaron a *Mayorella* sp. y a *Flabellula* sp. las cuales fueron reportadas en el Sistema de Cuevas Xalltégoxtli I, Puebla, México.

A lo largo del 2009, Sigala realizó un estudio llamado "Diversidad de los protozoos ciliados en cinco biotopos de cuevas de México" en el cual, realiza muestreos en cinco cuevas de la República Mexicana, tomando muestras de cinco biotopos diferentes: agua, suelo, guano y musgo encontrando una gran variedad de protozoos ciliados (Sigala, 2011).

IV. JUSTIFICACIÓN

Considerando el papel ecológico que juegan las AVL, así como su potencial patógeno, es importante identificar a las AVL en diferentes cuevas de México, ya que, el estudio de estos organismos (patógenos y no patógenos) desde el punto de vista ecológico, es sumamente escaso. Finalmente, aunque ya se conoce de manera general su distribución en el ambiente y las condiciones ambientales que las pueden afectar, es necesario este estudio para verificar la presencia y riqueza específica de estos microorganismos en este tipo de hábitats extremos lo cual demostraría nuevos entornos de dispersión y adaptación. Así, también detallaría aspectos de su relación con los factores bióticos y abióticos en estos ecosistemas, ya que estos organismos aun no han sido concretamente investigados a este nivel.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la presencia de amibas de vida libre en tres sistemas de cuevas y grutas de México.

2. Objetivos particulares

- Aislar y cultivar a las AVL de los diferentes biotopos: agua, suelo, guano y musgo en las tres cuevas muestreadas de la región central de México.
- Determinar la posición taxonómica a nivel de género y especie de amibas de vida libre presentes en los diferentes biotopos.
- Comprobar si existe presencia de amibas de vida libre potencialmente patógenas en las cuevas de estudio.

VI. ÁREAS DE ESTUDIO

Se seleccionaron tres sistemas de cuevas en los Estados de Michoacán, Puebla y Guerrero debido a que estas no han sido intensamente perturbadas por la actividad del turismo. Para acceder a estos sistemas, se contó con el apoyo de espeleólogos profesionales ya que, la incursión a las cuevas es de difícil acceso, lo cual aseguró que las cuevas a estudiar presentaran la mínima o ninguna perturbación a nivel de biotopos que fueron seleccionadas de acuerdo a un convenio con el Laboratorio de Protozoología de la Facultad de Ciencias y el laboratorio de Patógenos Emergentes de la FES- Iztacala de la UNAM para su estudio.

1. Grutas de Tziranda

Ubicado en el Estado de Michoacán, las Grutas de Tziranda, deben su nombre ya que en este lugar predominan los árboles Tziranda, estas formaciones subterráneas se localizan a seis kilómetros del municipio de Ciudad Hidalgo, en las coordenadas geográficas 19° 42' de latitud norte, 100° 33' longitud oeste, a una altitud de 2,040 msnm; con una superficie total de 1,063.03 km² (Fig. 3).

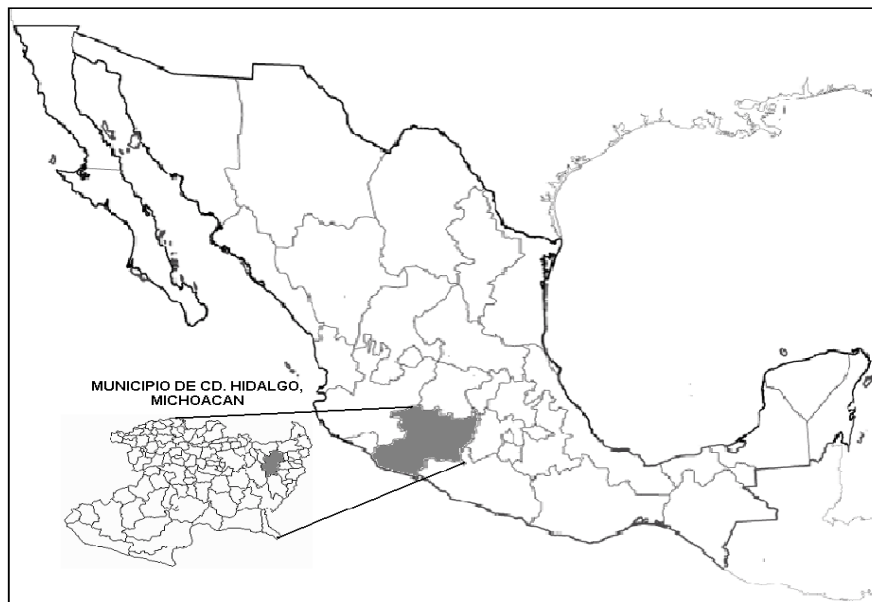


Figura 3. Ubicación geográfica del Municipio de Cd. Hidalgo, Michoacán en donde se encuentran las grutas de Tziranda

Limita al norte con Queréndaro, Zinapécuaro y Maravatío, al este con Irimbo, Tuxpan y Jungapeo, al sur con Tuzantla y Tiquicheo y al oeste con Tzitzio, Queréndaro, Indarapeo y Charo (SEGOB, 2009).

El relieve lo conforman el sistema volcánico transversal, sierra mil cumbres y los cerros del Fraile, Azul, San Andrés, Zarco y Grande. Tiene una precipitación anual de 1,810.2 mm y temperaturas que oscilan de 4.1 a 18.4 °C. En esta zona prevalece un clima semifrío húmedo C (w), formando parte de la cuenca del río Balsas. Los ríos principales son: Taximaroa, Agostitlán y Turundeo. Su fauna básicamente está conformada por zorros, tlacuaches, conejos, armadillos y patos (SEGOB, 2009) (Figs. 4 y 5).



Figuras 4 y 5. Entrada a las Grutas de Tziranda, Municipio de Cd. Hidalgo, Michoacán (SECTUR, 2012).

2. Grutas de Karmidas

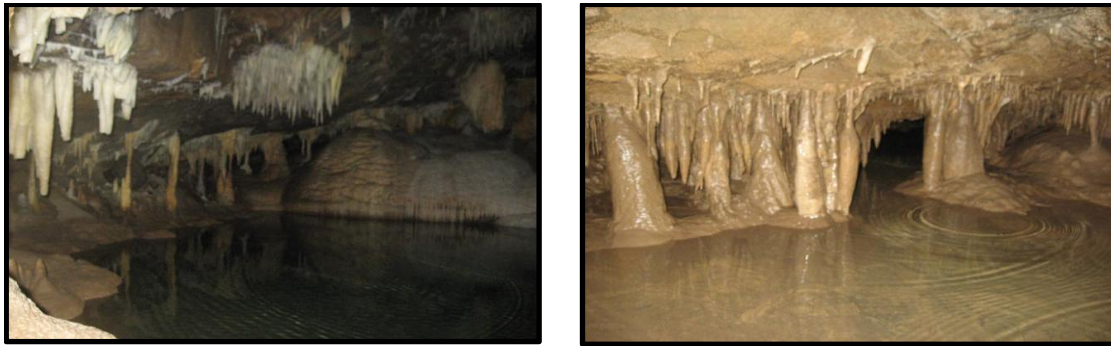
Estas grutas se localizan en el Estado de Puebla específicamente en el Municipio de Zapotitlán, tiene una superficie de 35.72 km². Sus coordenadas geográficas son los paralelos 19° 58'10'' y 20°01'36'' de latitud norte y los meridianos 97° 38'36'' y 97° 44'24'' de longitud occidental (SEGOB, 2009) (Fig. 6).



Figura 6. Ubicación geográfica del Municipio de Zapotitlán de las manzanas, Puebla en donde se encuentran las grutas de Karmidas.

El municipio pertenece a dos regiones morfológicas: la porción central y septentrional, al declive del Golfo y la porción meridional a la Sierra Norte. La Sierra Norte o Sierra de Puebla está formada por sierras paralelas, comprimidas las unas con las otras y que suelen formar grandes o pequeñas altiplanicies. La principal característica orográfica que presenta es la altiplanicie intermontañosa que se localiza en la parte central, en una franja que va desde el Oeste a Este; asentándose en ella las poblaciones de Zapotitlán y Nanacatlán (SEGOB, 2009).

Se encuentra a 680 msnm. Esta gruta está compuesta por una bóveda principal rodeada de cinco salones. Presenta un solo clima: semicálido a subhúmedo con lluvias todo el año y el tipo de vegetación que predomina es el bosque mesófilo de montaña. Y en cuanto a su fauna, aun existen zorros, tejones, mapaches entre otras variedades de reptiles y aves. (SEGOB, 2009) (Figs. 7 y 8).



Figuras 7 y 8. Cuerpos de agua en las Grutas de Karmidas Municipio de Zapotitlán de las Manzanas, Puebla (Sigala, 2011)

3. Cueva “La Joya”

La Joya, cueva ubicada en el Municipio de Taxco de Alarcón en el estado de Guerrero con una altitud de 1 730 msnm. Se localiza en la carta topográfica en las coordenadas $18^{\circ} 35'50''$ de latitud norte y $99^{\circ} 33'38''$ de longitud oeste (SEGOB, 2009) (Fig. 9).

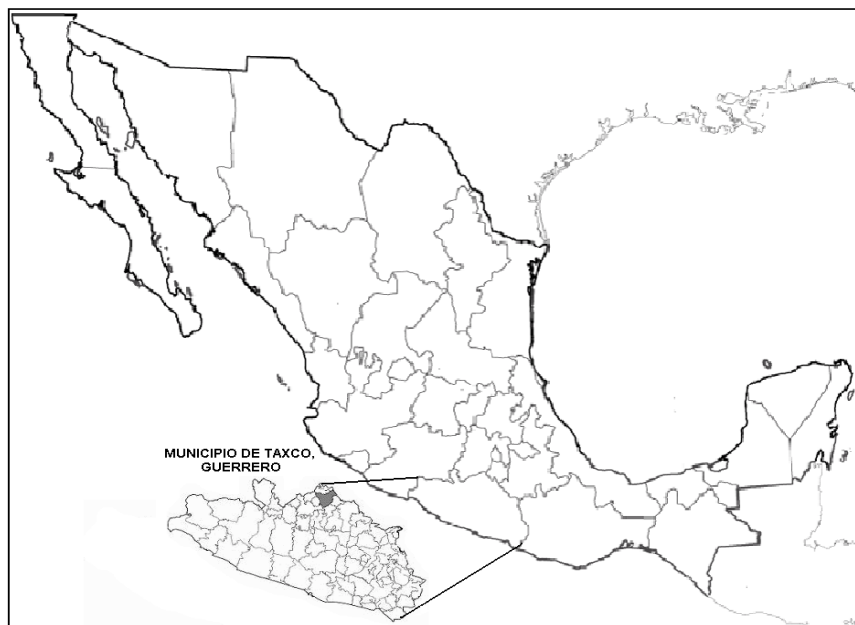


Figura 9. Ubicación geográfica del Municipio de Taxco, Guerrero en donde se encuentra la cueva La Joya.

La configuración del suelo del Municipio de Taxco presenta tres tipos de relieve: zonas accidentadas, zonas semitempladas y zonas planas. El clima predominante registrado en todo el municipio es cálido-subhúmedo y semicálido en la zona montañosa. Las temperaturas promedio anual registradas van de 18 a 20 °C, los meses calurosos son de marzo a abril y el mes más frío es en diciembre.

El tipo de vegetación predominante es el de bosque de encino con diferente proporción de asociación con pino, aunque la diversidad de ecosistemas incluye también la selva baja caducifolia, así como áreas perturbadas, en que se presenta agricultura de temporal y pastizal inducido (SEGOB, 2009).

Con relación a su fauna aún un se pueden encontrar especies de venados, águilas, halcones, iguanas, conejos, tejones, mapache, diferentes especies de reptiles, entre otras, su importancia radica en la riqueza biológica de las cañadas y la Sierra de Taxco, así como a la alta integridad ecológica de la Sierra de Huautla, la cual ha sido decretada como un área natural protegida a nivel estatal (SEGOB, 2009) (Figs. 10 y 11).



Figuras 10 y 11. Cuerpos de agua en La Joya, Municipio de Taxco, Guerrero (Sigala, 2011).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recolecta de las muestras

Se realizaron dos recolectas en las tres cuevas de la zona centro de la República Mexicana: las Grutas de Tziranda (Michoacán), las Grutas de Karmidas (Puebla) y Cueva de "La Joya" (Guerrero), en cada una de las cuevas se recolectaron cuatro tipos de biotopos los cuales fueron suelo, agua, musgo y guano de murciélago.

En cada recolecta se procuró obtener muestras de todos los biotopos, sin embargo, no fue posible hacerlo en todas las cuevas, debido a la ausencia del biotopo. Para el agua se tomó muestra de la zona más profunda a la que se tuvo acceso. El musgo se obtuvo en la zona de penumbra. Para recolectar el guano se seleccionó el lugar con mayor abundancia y con apariencia más fresca.

Se realizaron dos recolectas en la Cueva de La Joya y las Grutas de Karmidas, para el caso de las Grutas de Tziranda solo fue posible realizar una recolecta por cuestiones ajenas al Proyecto

Las muestras de los diferentes biotopos fueron recolectadas manualmente en frascos de polipropileno estériles, se tomaron muestras de musgo, guano de murciélago, suelo y agua, se etiquetaron y se trasladaron a temperatura ambiente hasta el Laboratorio de Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala UNAM, para su procesamiento.

2. Aislamiento de AVL

- a) **Muestras líquidas.** Se tomaron alícuotas de 50 ml en tubos cónicos de polipropileno estériles y se centrifugaron a 1000 Xg por 10 min. El sobrenadante se desechó dejando unos 100 µl de sedimento los

cuales fueron resuspendidos e inoculados en cajas de Petri con agar NNE (por sus siglas en inglés non-nutritive agar con *Enterobacter aerogenes*) las cuales tienen una monocapa de bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor a 56 °C por 30 min, las cuales fueron preparadas como se describe en el anexo I.

- b) Muestras sólidas.** Se tomaron aproximadamente 2 cm³ del biotopo y se inocularon directamente en placas de Petri con agar NNE (non-nutritive agar) las cuales también contenían la monocapa de bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor a 56 °C por 30 min.

Las placas inoculadas con la muestra se incubaron a 37 °C y se observaron con un microscopio invertido de contraste de fases, Nikon Eclipse TS 100 con el objetivo de 40x, para la búsqueda de AVL cada 24 hrs. Para la realización de la limpieza de las cajas y tener cultivos amebianos sanos se marcó la zona de mayor abundancia de trofozoítos o quistes, para posteriormente realizar un corte de agar de aproximadamente 5 mm², y transferirlo a otra placa (NNE) nueva para mantenerlos a 37 °C para su posterior identificación.

3. Clonación

Transcurrido el tiempo de incubación, las placas de agar NNE sembradas con las muestras de los diferentes biotopos, se revisaron en un microscopio invertido, con el objetivo de 40X, para buscar la presencia de trofozoítos y quistes amebianos.

Los aislados fueron resembrados en placas con agar NNE, transfiriendo una porción del agar NNE con trofozoítos a otra placa con agar NNE y se incubaron a 37 °C y a temperatura ambiente (De Jonckheere, 1977). Posteriormente se

efectuaron nuevas resiembras, para separar totalmente un aislado de otro, para llevar a cabo la identificación de los diferentes morfotipos.

4. Identificación morfológica de AVL

Para efectuar la identificación morfológica, se aseguró que las placas de NNE tuvieran trofozoítos y quistes y que a su vez las cajas no se encontraran contaminadas con bacterias u hongos. Una vez crecidas las amebas en las placas, se cosecharon siguiendo el procedimiento estándar para su identificación, en condiciones de esterilidad, se puso 1 ml de solución fisiológica (PBS) estéril sobre la placa y se realizó un barrido sobre la placa de cultivo, concentrando la suspensión acuosa con amibas para su observación al microscopio de contraste de fases.

Se hicieron preparaciones en fresco de las amebas aisladas en laminillas y se observaron en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 40X (Nikon Eclipse TS100). De cada aislado se registró la medida de 50 trofozoítos (largo y ancho) y 50 quistes (diámetro largo y ancho si fue el caso).

La identificación morfológica se hizo con un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TS 100) y las claves taxonómicas de Page (1988), tomando en cuenta la morfología de los organismos, como las formas del quiste, del trofozoíto o uroide y la presencia o no de gránulos perinucleares, entre otros.

5. Registro fotográfico.

Se realizó el registro fotográfico con cámara fotográfica Nikon coolpix 990 y se elaboraron esquemas de cada aislado.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislados amebianos

De los muestreos realizados en el periodo de marzo a junio del 2009, en las tres diferentes cuevas se obtuvieron 42 muestras de diferentes biotopos de los tres lugares muestreados, los cuales se muestran a detalle en el cuadro 2.

Cuadro 2. Fechas de recolectas y los biotopos muestreados en cada cueva.

FECHA/LUGAR	LA JOYA	KARMIDAS	TZIRANDA
1-2 MARZO 2009	▲ ■		
2-6 JUNIO 2009	▲ ■ ● +		
14-15 JUNIO 2009		▲ ■ ● +	
20-21 JUNIO 2009		▲ ■ ● +	
30 JUNIO 2009			▲ ■ +

SIMBOLOGÍA: SUELO ▲ AGUA ■ MUSGO ● GUANO ✦

Se aislaron e identificaron 135 organismos amebianos, correspondientes a 11 géneros (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Rhizamoeba*, *Vannella*, *Cochliopodium*, *Echinamoeba*, *Leptomyxa*, *Rosculus*, *Saccamoeba*) en los cuatro biotopos estudiados; suelo, agua, musgo y guano.

En la figura 12 se observa de manera notable que *Acanthamoeba* fue el género predominante sobre los demás con un 65 %, seguido del género *Naegleria* con el 11 % y *Vahlkampfia* con un 10 % de frecuencia. Las AVL por presentar una fase quística de resistencia, les permite sobrevivir a las variaciones ambientales adversas, así como permanecer viables en sequías, cambios de pH, temperatura y salinidad, falta casi total de oxígeno y escasez de alimento, además les confiere una facilidad de desplazamiento a través de las corrientes de aire. La frecuencia del género *Acanthamoeba sp.* se podría deber a que los

organismos de este género son tolerantes a los cambios de salinidad cuando están en su fase trófica y su quiste es resistente al cloro hasta niveles por debajo de 2 ppm (Gallegos, 1997), pueden tolerar variaciones amplias de los factores ambientales, poca cantidad de oxígeno y temperaturas extremas haciéndolas especies termotolerantes (Rivera *et al.*, 1979; Lloyd, 2001; Aksozek, 2002; Smirnov, 2003).

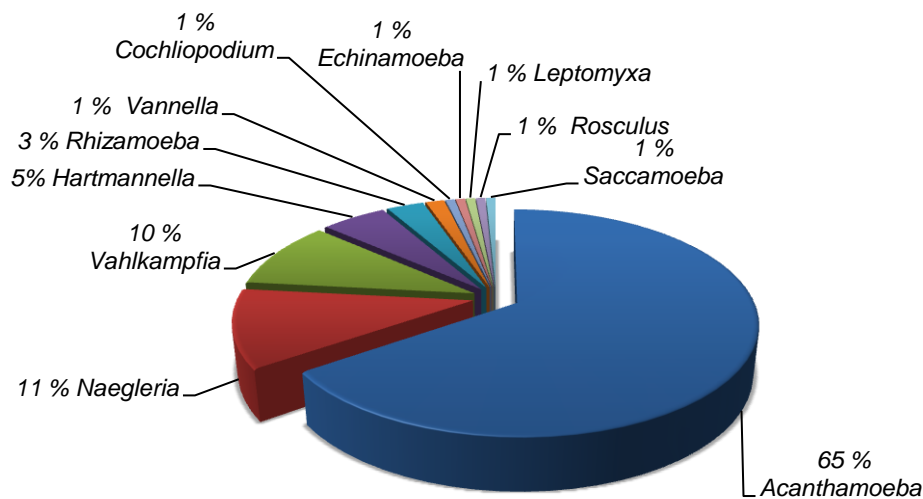


Figura 12. Diversidad de géneros amebianos presentes en las tres cuevas muestreadas.

Es importante mencionar que los dos géneros más frecuentes en este estudio son los más reportados en la literatura como los géneros de importancia epidemiológica pues los han descrito como de alto riesgo infeccioso para los humanos (Lehman *et al.*, 1998).

De las especies identificadas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* no todas son patógenas como se puede observar en las figuras 13 y 14, pero la presencia de especies patógenas fue elevada en ambos casos, pues está claramente comprobado que *N. fowleri*, *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *A.*

culbertsoni son especies que infectan al sistema nervioso central y a otros órganos como son los ojos, pulmón, próstata y piel (Martínez, 1985; Martínez y Janitschke, 1985; Rocha *et al.*, 2009).

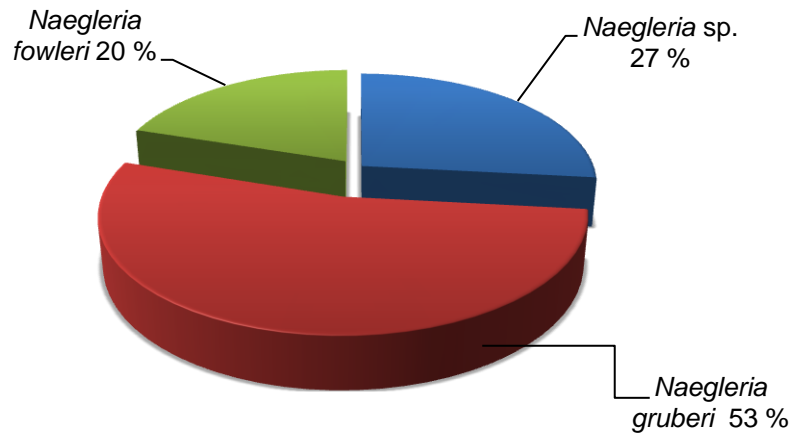


Figura 13. Diversidad de especies del género *Naegleria* sp.

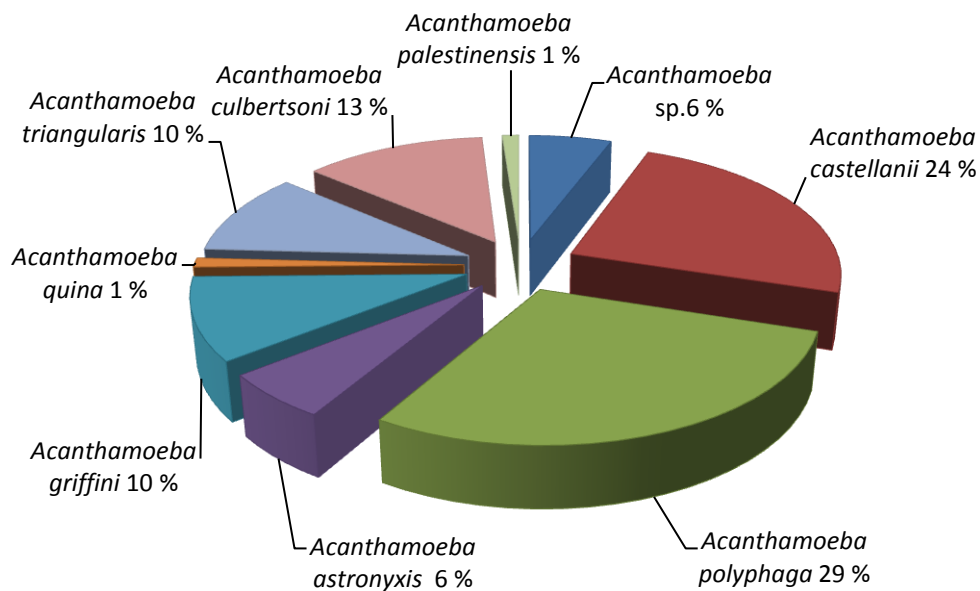


Figura 14. Diversidad de especies del género *Acanthamoeba* sp.

A continuación se enlista en el cuadro 3 las especies reportadas en el presente trabajo.

Cuadro 3. Riqueza específica de amibas presentes en la cueva y las grutas.

Género: <i>Acanthamoeba</i>	Género: <i>Hartmannella</i>
<i>Acanthamoeba</i> sp. <i>A. astronyxis</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. griffini</i> <i>A. palestinesis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. quina</i> <i>A. triangularis</i>	<i>Hartmannella</i> sp. <i>H. cantabrigiensis</i> <i>H. vermiformis</i>
	Género: <i>Vannella</i>
	<i>Vannella</i> sp. <i>V. platypodia</i>
Género: <i>Naegleria</i>	Género: <i>Rhizamoeba</i>
<i>Naegleria</i> sp. <i>N. fowleri</i> <i>N. gruberi</i>	<i>Rhizamoeba</i> sp. <i>R. flabellata</i>
Género: <i>Vahlkampfia</i>	Género: <i>Echinamoeba</i>
<i>Vahlkampfia</i> sp. <i>V. avara</i> <i>V. enterica</i> <i>V. ustiana</i>	<i>E. exudans</i>
	Género: <i>Saccamoeba</i>
	<i>S. limax</i>
Género: <i>Cochliopodium</i>	Género: <i>Rosculus</i>
<i>C. actinophorum</i>	<i>R. ithacus</i>
Género: <i>Leptomyxa</i>	
<i>L. reticulata</i>	

Se recolectaron 42 muestras de las cuales la mayoría de las especies aisladas se encontraron en el agua, lo cual concuerda con trabajos anteriores en donde se ha reportado mayor presencia en medios acuáticos. Las AVL están presentes en pequeños nichos ecológicos en forma de partículas en suspensión con la materia orgánica en los cuerpos de agua que concentran nutrientes que proveen de recursos a las AVL para su supervivencia (Rodríguez, 1994). Además se tiene reporte que estos organismos se han llegado a aislar hasta en aguas sometidas a procesos de tratamiento de potabilización en donde las condiciones para que las AVL sobrevivan son mínimas (Thomas *et al.*, 2008) (Fig.15).

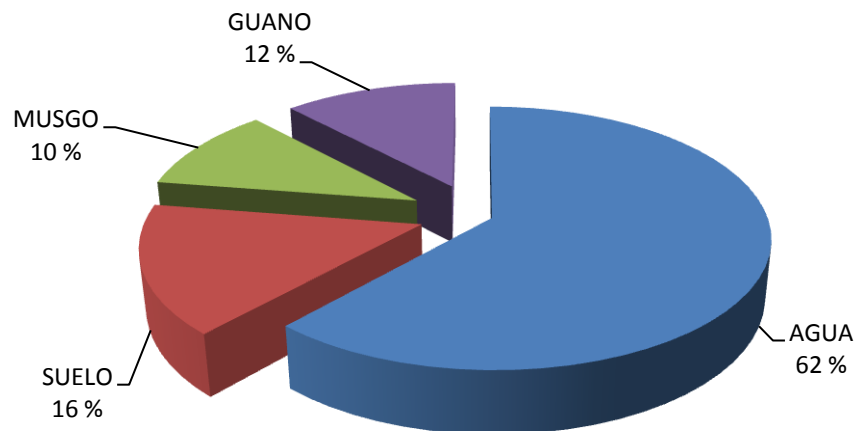


Figura 15. Porcentaje de organismos amebianos aislados por biotopo.

Como se observa en la figura 16 la riqueza específica por biotopo fue mayor en el agua con 18 especies, seguida por el musgo con 11 especies identificadas, esto se podría deber a la cantidad de humedad y protección que estos dos biotopos aportan para la supervivencia de las AVL, también se identificaron AVL en el suelo y guano ya que forman parte de estos ambientes, estos dos biotopos en específico el segundo tienen gran cantidad de materia orgánica que mantienen en perfectas condiciones a las AVL (Fig. 16).

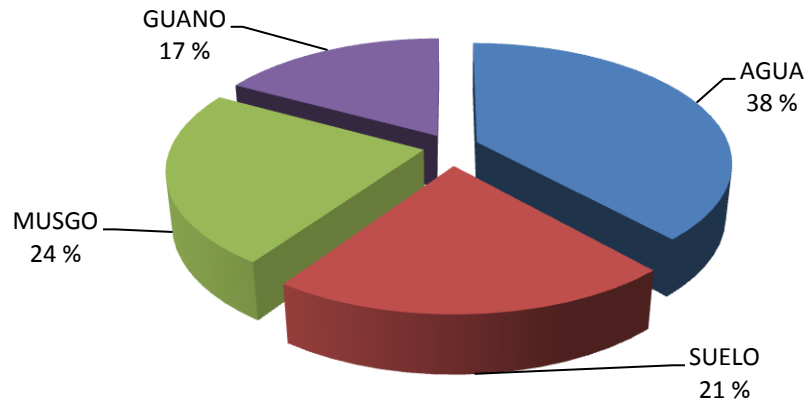


Figura 16. Riqueza específica de amibas encontradas por biotopo.

2. Identificación morfológica, descripción y registro fotográfico

La identificación morfológica de los aislados se realizó con las claves taxonómicas y el atlas de amebas de vida libre elaborados por Page (1988), para determinar la presencia de todos los géneros amebianos se observaron detalladamente las formas y tamaños del quiste y de trofozoíto (Figs. 17-38).

a) Género: *Acanthamoeba****Acanthamoeba astronyxis*** Ray y Hayes, 1954

Ectoquiste generalmente rugoso generalmente el endoquiste en forma estrellada. La mayoría de los brazos del endoquiste están en contacto estrecho con el ectoquiste. Todos o casi todos los brazos de endoquiste se unen al exoquiste en el mismo plano, arriba de 9 brazos, el quiste tiende a medir entre 19.2–22 μm . estos organismos son pertenecientes al grupo I.

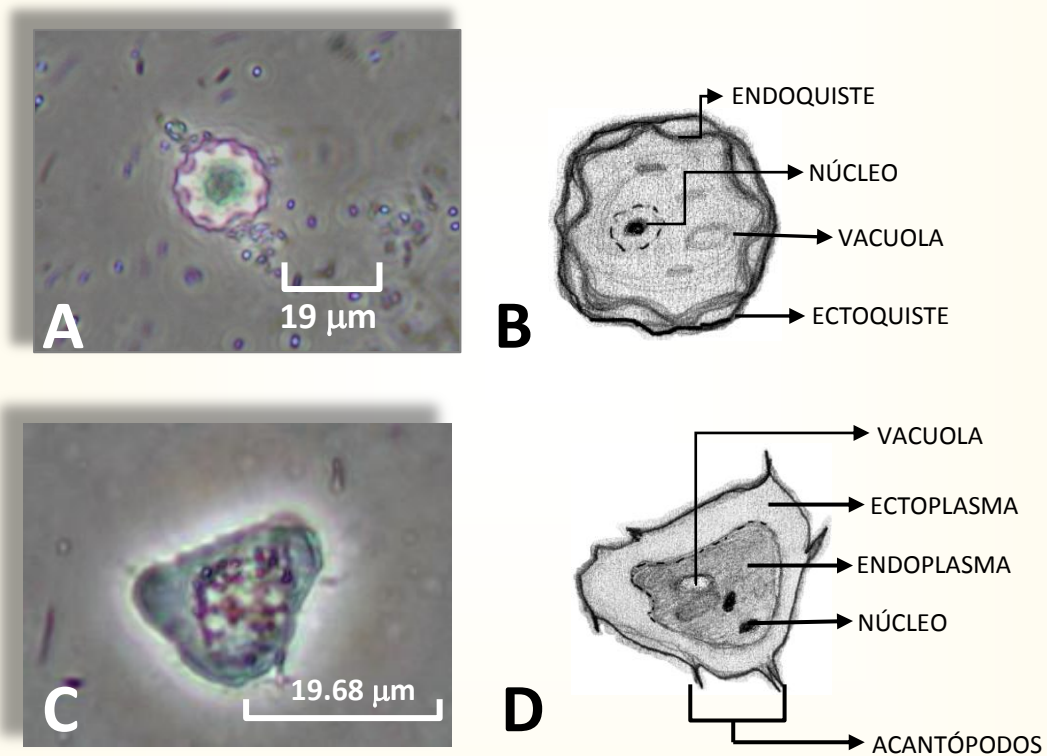


Figura 17. *A. astronyxis* (A) indican el quiste, (C) indican el trofozoíto. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X; (B y D) esquemas del quiste y trofozoíto respectivamente.

Acanthamoeba castellanii Douglas, 1930

Endoquiste a veces estrellado, los brazos del endoquiste en depresión formados por el ectoquiste. Ectoquiste grueso y rugoso, de forma poligonal, raras veces en forma esférica u ovoide. Generalmente con un diámetro menor a 18 μm . Es patógena para el humano, puede infectar el sistema nervioso central, ojos o pulmón. Pertenece al grupo II

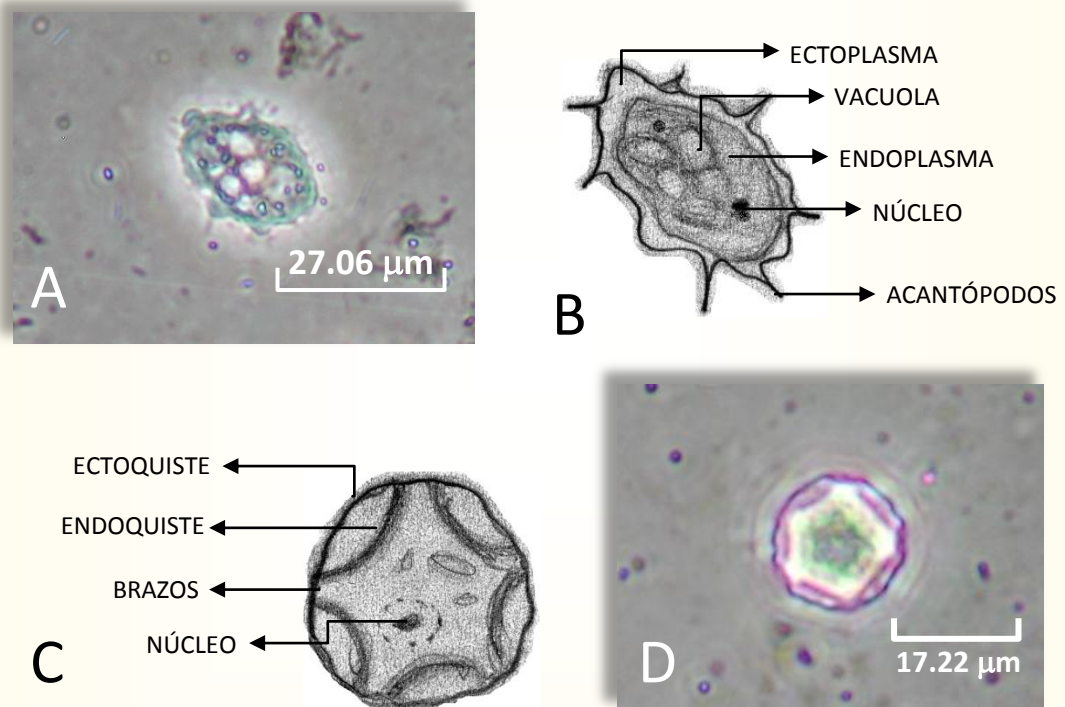


Figura 18. *A. castellanii* (A) indica el trofozoíto y (B) indica el quiste. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X; (C y D) indican el trofozoíto y el quiste respectivamente.

Acanthamoeba culbertsoni Singh y Das, 1970

Pared del ectoquiste muy delgada, endoquiste usualmente redondeado, ectoquiste ondulado o rugoso y muy cercano al endoquiste. De 5-6 poros, aproximadamente de 15-18 μm . Pertenece al grupo III

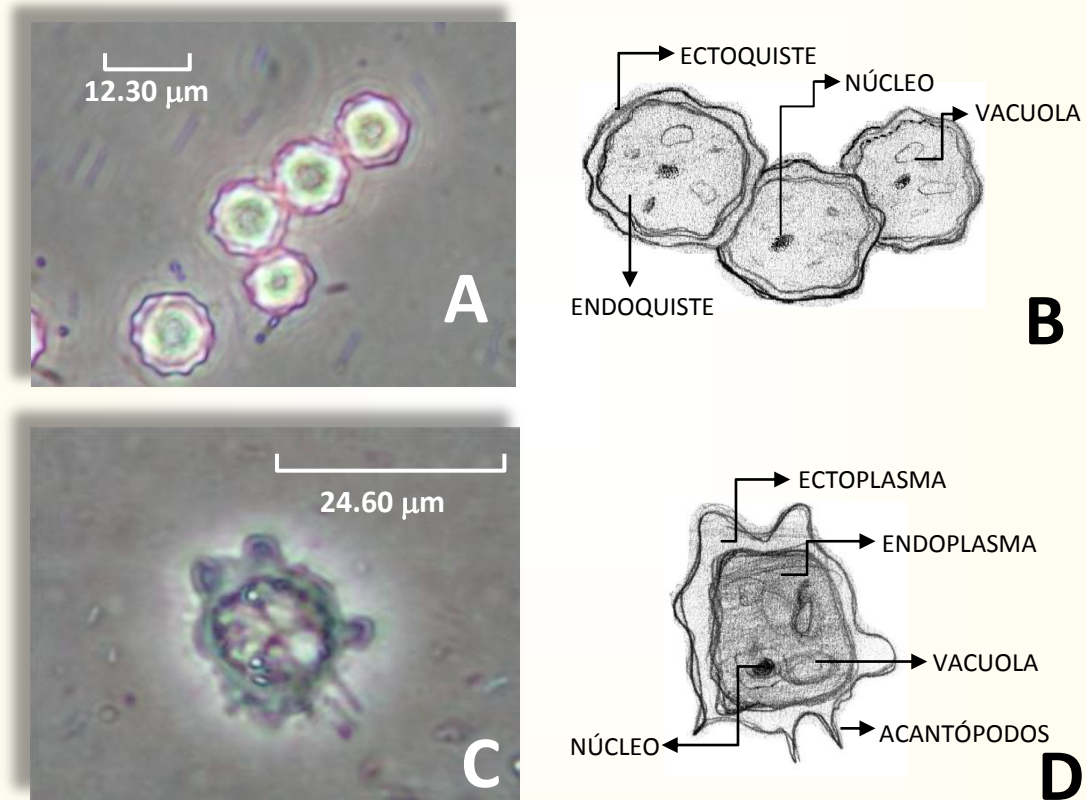


Figura 19. *A. culbertsoni* (A y B) indican el quiste, (C y D) indican el trofozoíto. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Acanthamoeba griffini Sawyer, 1971

El ectoquiste es de forma variable, algunas veces esféricas u ovoide, el endoquiste tiene pequeños brazos, algunas veces estrellado dando la apariencia de una rueda dentada, el ectoquiste es ondulado, tiene 6 brazos y aproximadamente mide 14 μm . Pertenece al grupo II

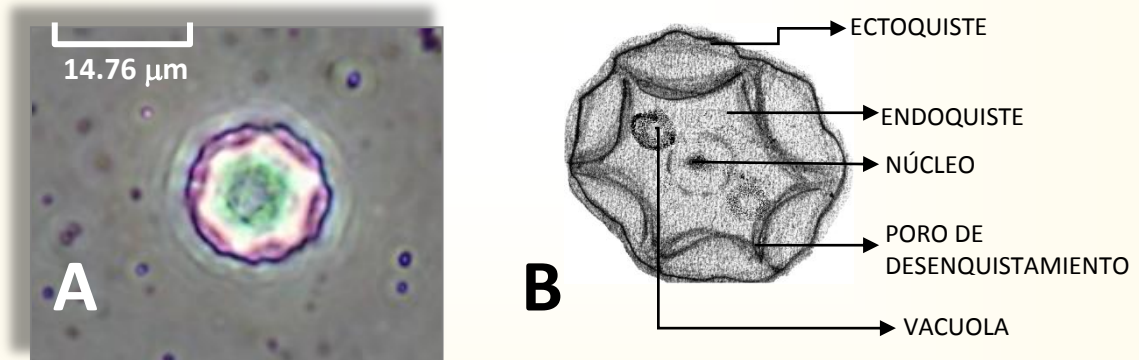


Figura 20. *A. griffini* (A y B) indican el quiste. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Acanthamoeba palestinensis Reich, 1933

Ectoquiste esférico u ovoide raramente con pequeñas protuberancias cónicas, usualmente el endoquiste esta muy cercano al ectoquiste, este es delgado y los poros difícilmente se distinguen, diámetro del quiste entre 17 -18 μm . Este organismo pertenece al grupo III.

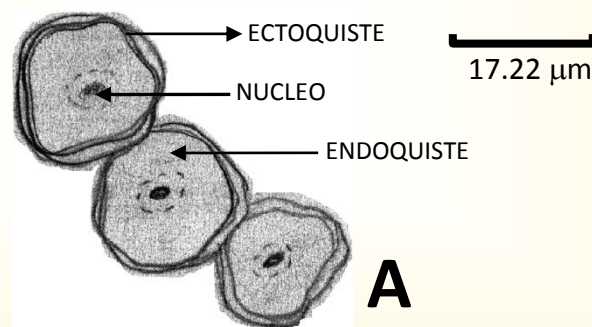


Figura 21. *A. palestinensis* (A) esquema que indica las partes del quiste.

Acanthamoeba polyphaga Puschkarew, 1913

Endoquiste muy irregular, prácticamente nunca estrellado, ectoquiste delgado y extensamente separado del endoquiste, de forma esférica y en ocasiones ovoide, numero de brazos de 4-6 y aproximadamente llega a medir 14 μm . Pertenece al grupo II

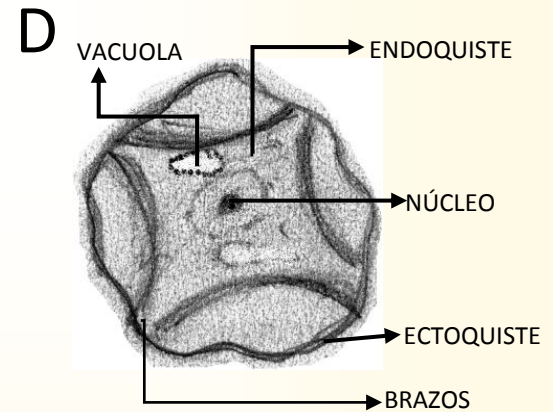
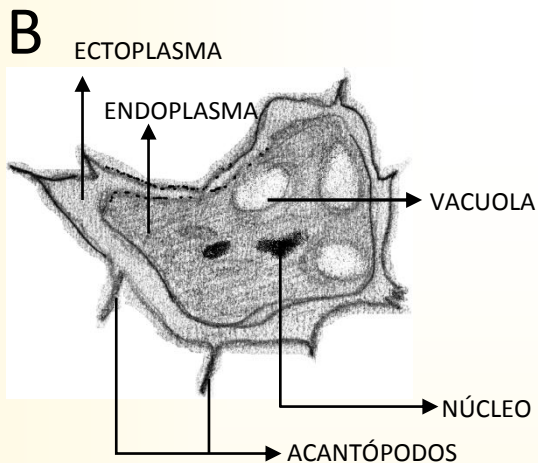
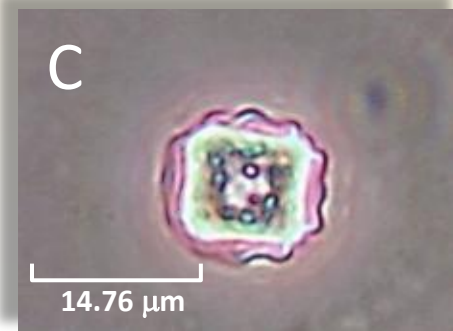
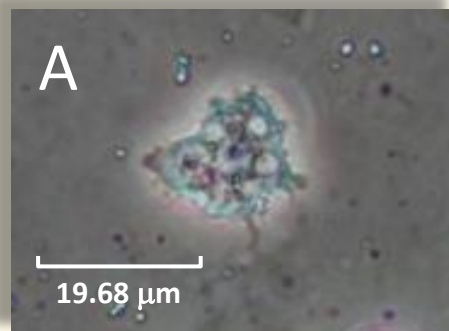


Figura 22. *A. polyphaga* (A y B) indican el trofozoíto, (C y D) indican el quiste. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Acanthamoeba quina Pussard y Pons, 1977

El quiste en ocasiones es esférico u ovoide nunca reticulado, algunas veces cuadrangular o pentagonal, ectoquiste delgado y muy cercano al endoquiste, aproximadamente entre 4-5 brazos en el endoquiste, diámetro del quiste aproximado de 12 μm Pertenece al grupo II

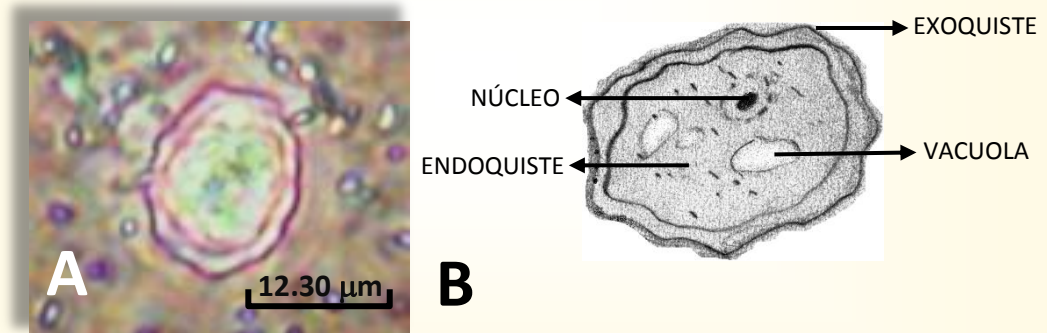


Figura 23. *A. quina* (A y B) indican el quiste. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Acanthamoeba triangularis Pussard y Pons, 1977

Crece en medio bacteriano a 37 °C. Generalmente el ectoquiste es esférico u ovoide Endoquiste generalmente triangular muy raramente cuadrado, con 4 brazos o menos, aproximadamente mide 13 μm y no es patógena en ratones. Pertenece al grupo II

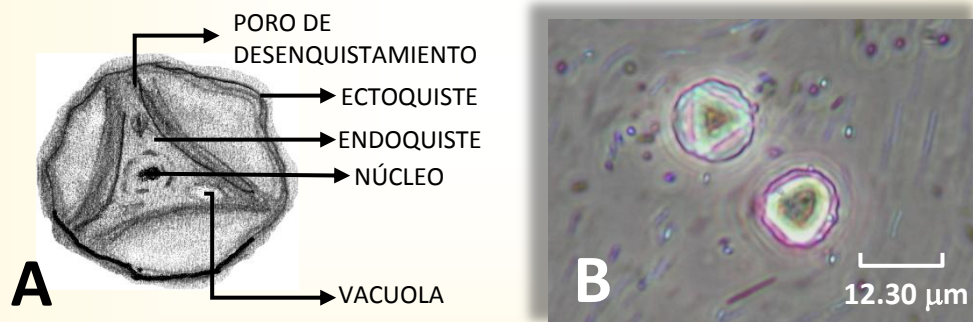


Figura 24. *A. triangularis* (A y B) indican el quiste. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

b) Género: *Naegleria****Naegleria fowleri* Carter, 1970**

Crece a una temperatura de 30-45°C, el quiste es totalmente liso y no se alcanzan a observar los poros en un microscopio de luz, este tiene un diámetro aproximado de 7-15 μm . Tiene forma limax en su fase trófica aunque también puede presentar fase amebo-flagelar. Esta especie es patógena en humanos y ratones causante la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP)

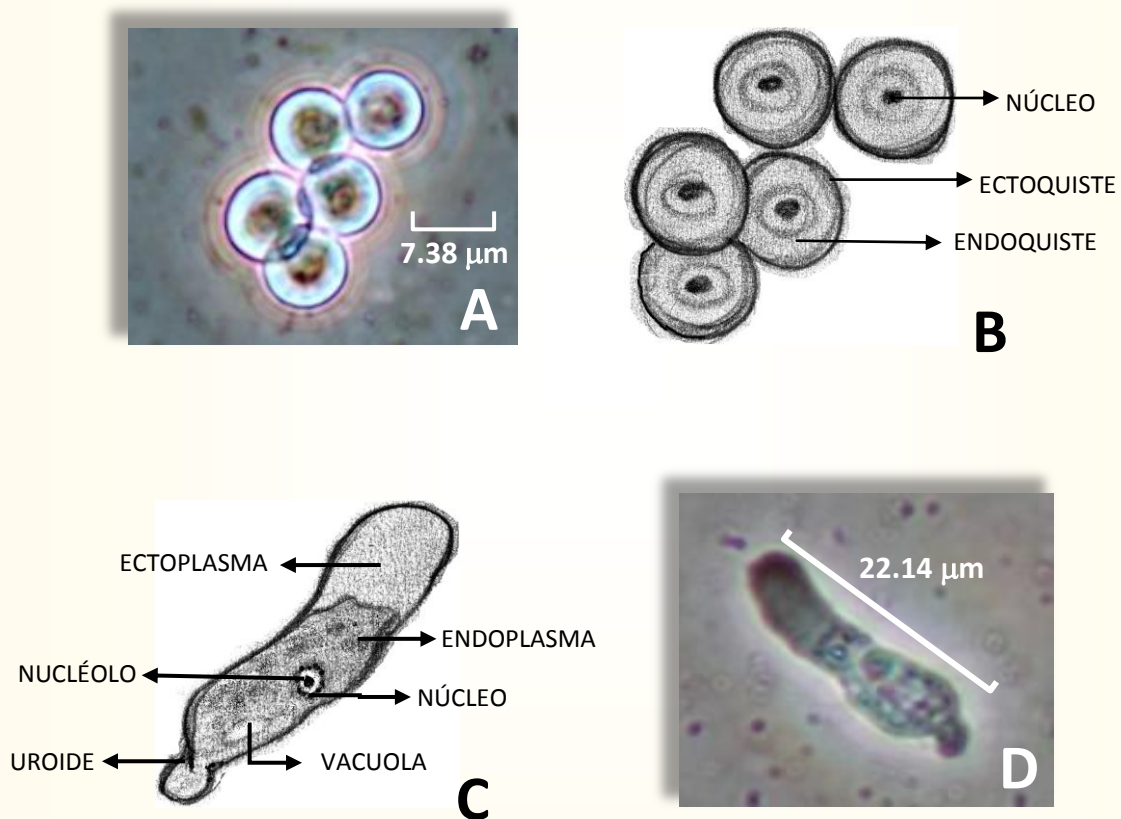


Figura 25. *N. fowleri* (A y B) indican el quiste, (C y D) indican el trofozoíto. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Naegleria gruberi Scharding, 1899

Generalmente crece a una temperatura de 20-30 °C, aunque en ocasiones también puede crecer a una temperatura de 37 °C. El quiste es totalmente liso rara vez es áspero y esta ligeramente engrosado en la zona donde se encuentra el poro, mide aproximadamente de 10-16 μm de diámetro. No es patógena para humanos y ratones.

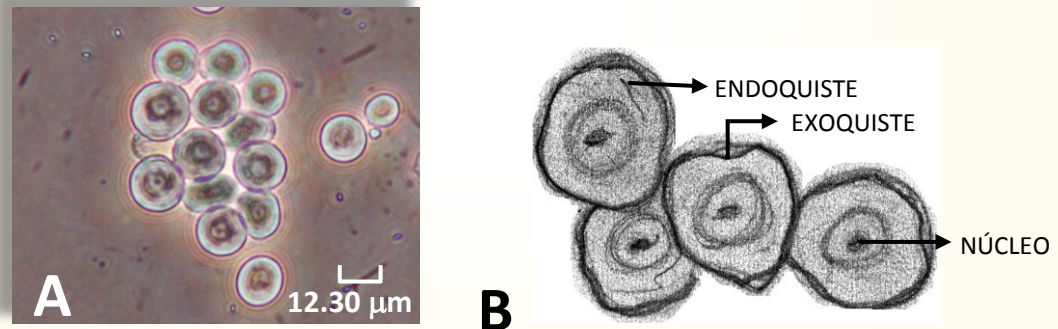


Figura 26. *N. gruberi* (A y B) indican el quiste. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

c) Género: *Vahlkampfia****Vahlkampfia avara*** Page, 1967

Quiste con capa gelatinosa y pared lisa, ocasionalmente circular, con un diámetro aproximado de 7-14 μm , la forma trófica a menudo llega a tener la presencia de uroide y esta llega a medir de 14.5-33 μm

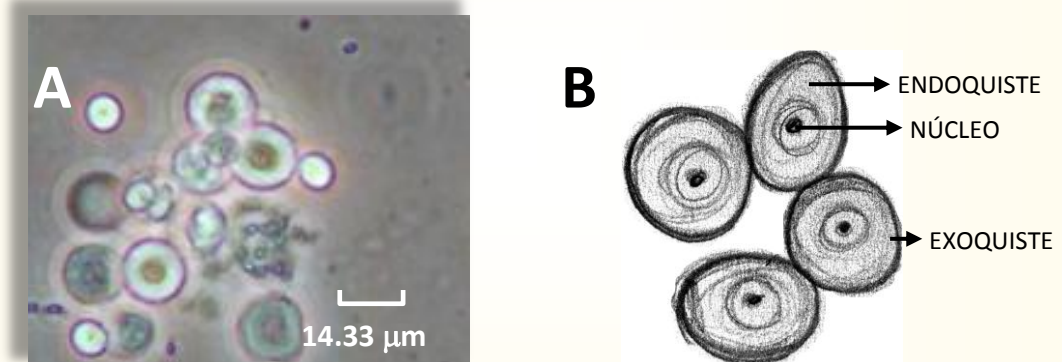


Figura 27. *V. avara* (A y B) indican el quiste. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Vahlkampfia enterica Page, 1974

Amiba generalmente eruptiva, frecuentemente cambia de dirección en cuanto a su movimiento, el quiste mide aproximadamente 8.5-17 μm , este en ocasiones es multinucleado. Crece a una temperatura de 23-37 $^{\circ}\text{C}$ no es patógena para el humano.

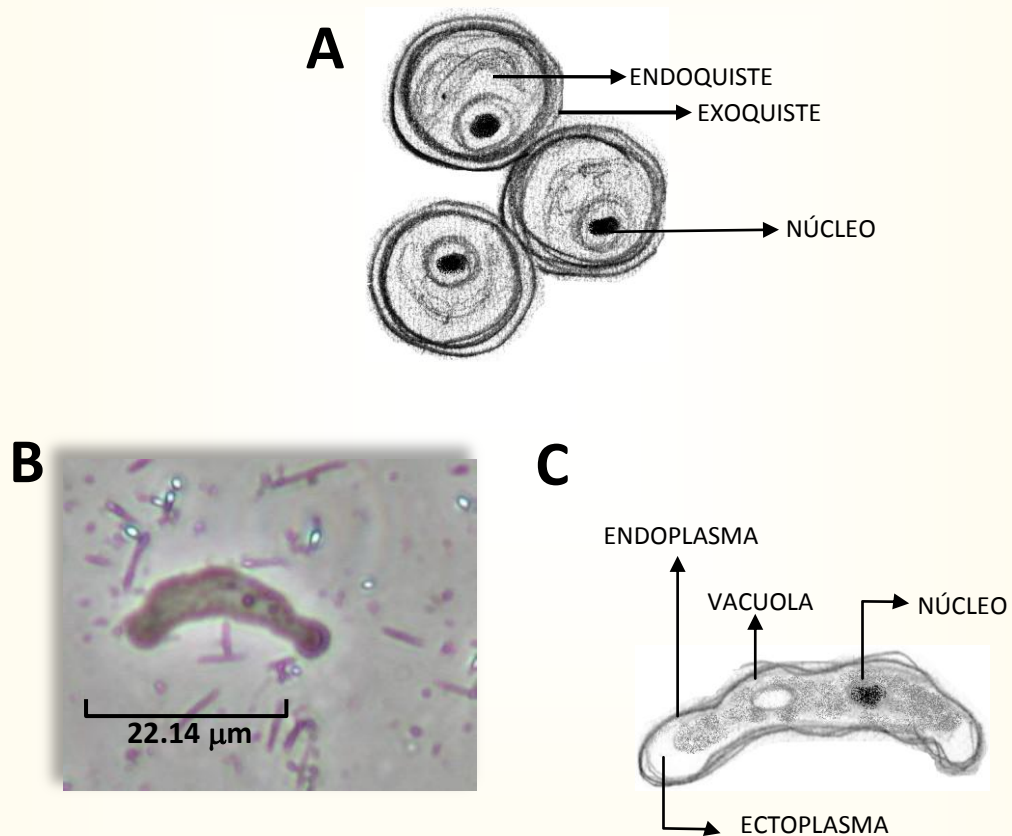


Figura 28. *V. enterica* (A) indican el quiste y (B y C) fotografía de trofozoíto y (C) esquema de trofozoíto. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Vahlkampfia ustiana Page, 1974

La amiba llega a medir de 30-65 μm . quiste de forma oval, reniforme o piriforme de forma irregular, pero nunca esférica, mide aproximadamente entre 12-21 μm y puede ser multinucleado.

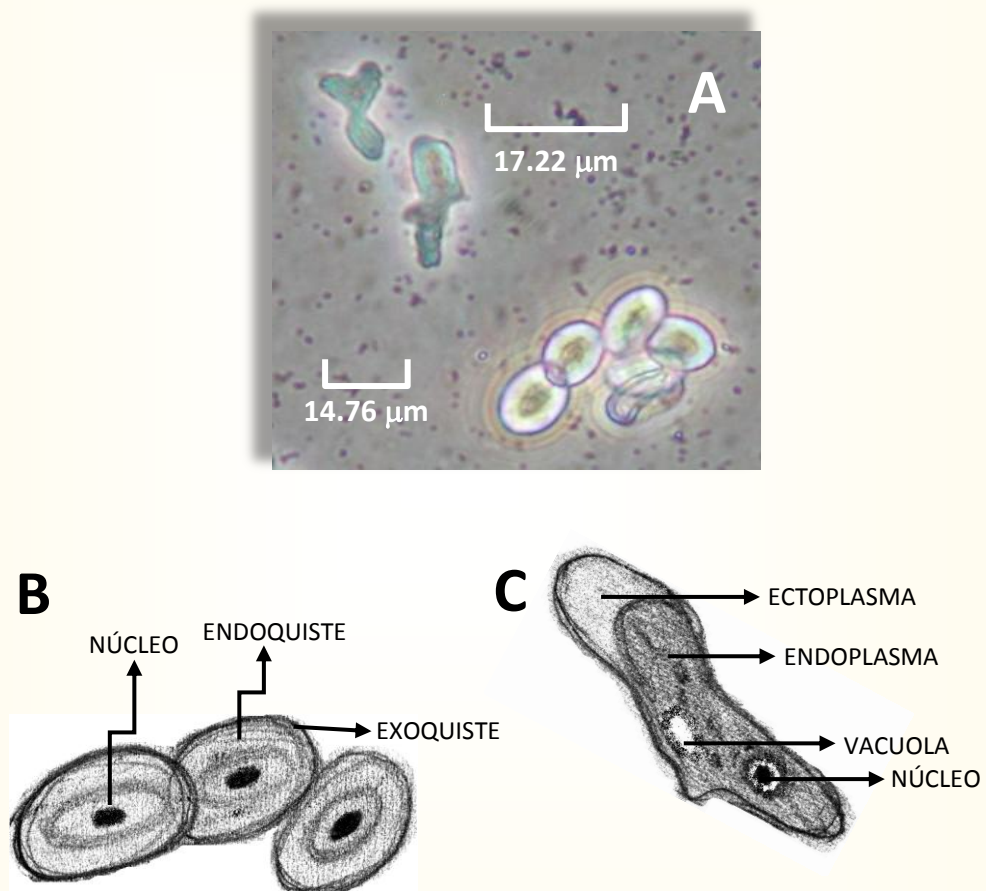


Figura 29. *V. ustiana* (A) indican el quiste y el trofozoíto. . Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X. (B y C) esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto respectivamente

d) Género: *Hartmannella**Hartmannella cantabrigiensis* Page, 1974

El quiste posee una capa hialina, usualmente de tamaño llegan a medir entre 7-13 μm pequeño y contorno liso, de forma esférica u ovoide y la pared del endoquiste como del exoquiste están muy cercanas. Las formas flotantes de esta especie suelen ser de contorno liso y con pseudópodos hialinos

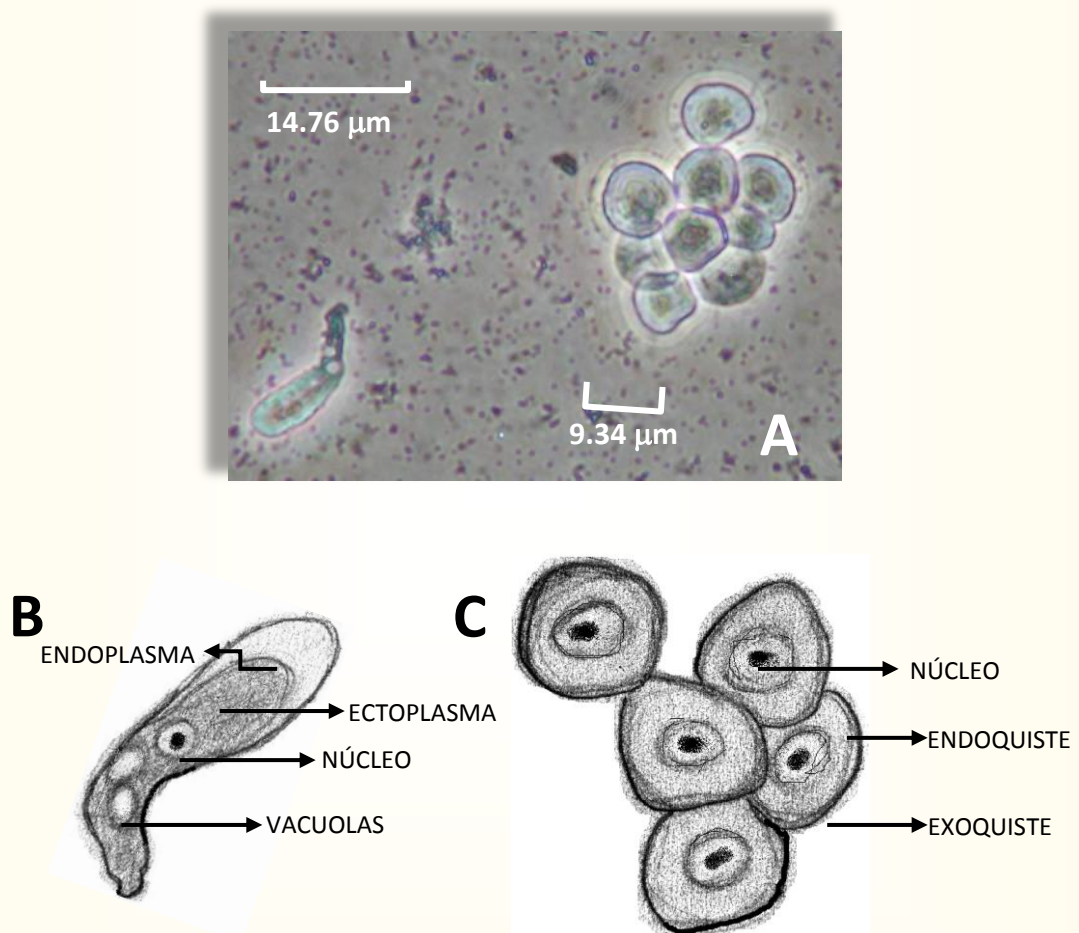


Figura 30. *H. cantabrigiensis* (A) indican el quiste y el trofozoíto. (B y C) esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto respectivamente. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

Hartmannella vermiformis Page, 1967

El quiste tiene una capa hialina siempre presente, es de forma esférica u ovoide, presentan un diámetro aproximado de 4-9.5 μm . En la fase trófica de esta amiba las zonas antero-posterior están ensanchadas.

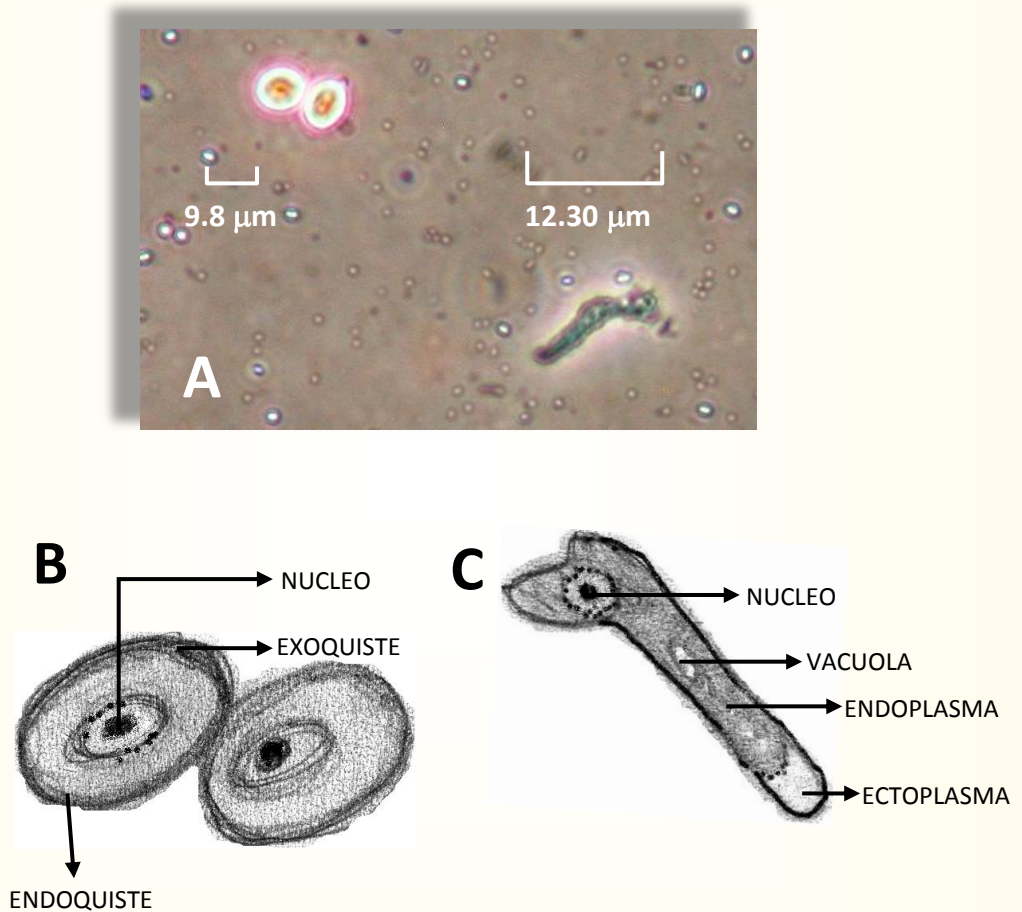


Figura 31. *H. vermiformis* (A) indican el quiste y el trofozoíto. (B y C) esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto respectivamente. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

e) Género: *Echinamoeba**Echinamoeba exudans* Page, 1967

Amiba de forma elongada o flabelada a menudo con pocos pseudópodos y en ocasiones llega a desarrollar una forma limax, el borde anterior de la amiba es irregular y posee núcleos pequeños, la forma trófica mide aproximadamente de 7-22 μ m. El endoquiste está muy separado del ectoquiste. Y mide aproximadamente de 3.8-8.4 μ m

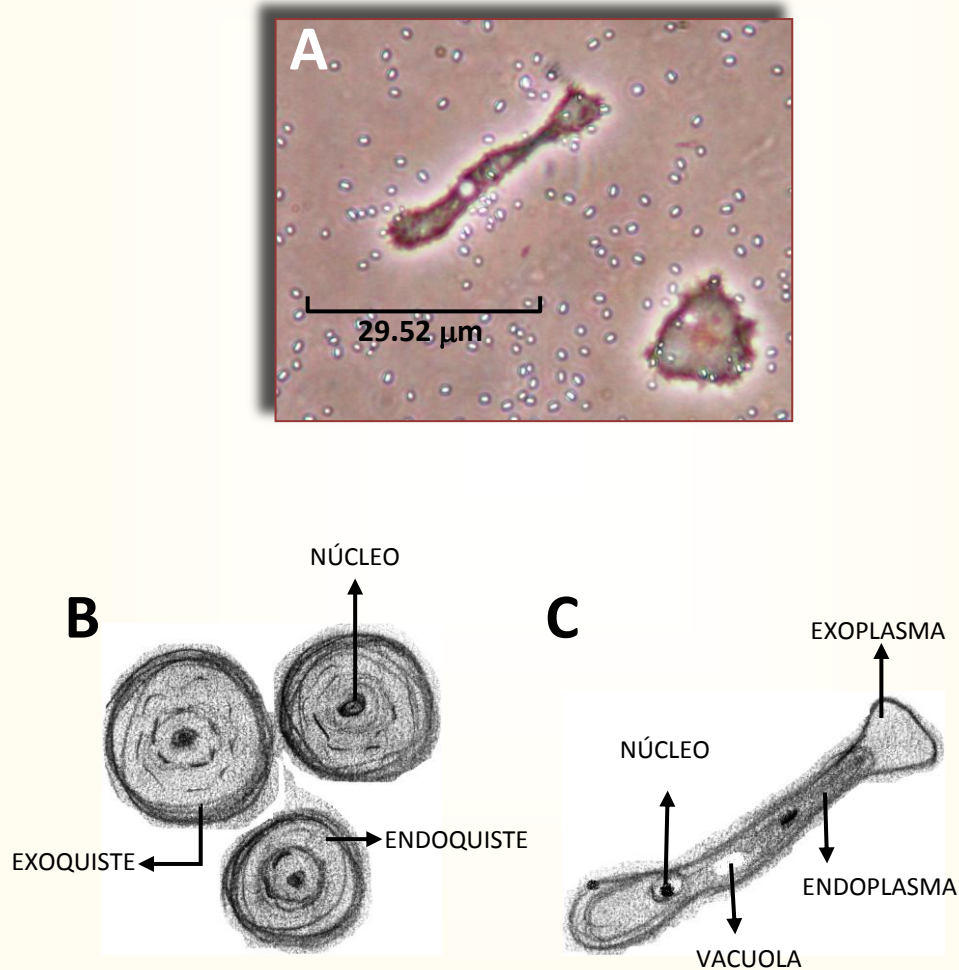


Figura 32. *E. exudans* (A) indican el quiste y trofozoito (B y C) esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoito respectivamente. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

f) Género: *Vannella**Vannella platypodia* Gläser, 1912

La forma locomotiva de esta amiba es generalmente flabelada y a menudo semi-circular con un ancho margen hialino, sin arrugas longitudinales, la forma flotante de este organismo tiene marcados pseudópodos. Es multinucleada y puede llegar a medir de 10-30 μm , y no presenta fase quística.

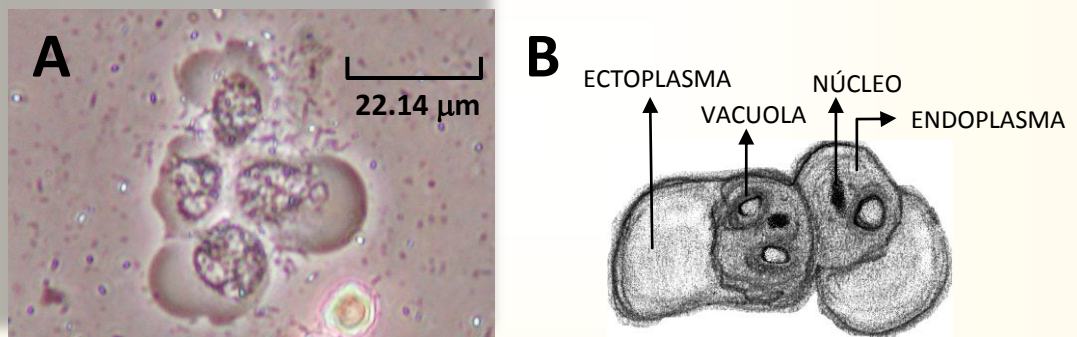


Figura 33. *V. platypodia* (A) indican el trofozoíto. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X; (B) esquema que indica cada una de las partes del trofozoíto.

g) Género: *Cochliopodium**Cochliopodium actinophorum* Auerbach, 1856

Forma locomotora mide aproximadamente entre 15-80 μm , el tectum es claramente visible formando una especie de joroba, raramente se producen pseudópodos en el borde anterior. El quiste puede ser esférico u oval, el endoquiste puede ser de pared lisa y gruesa y el ectoquiste de forma irregular, llega a medir aproximadamente entre 18.5-27 μm .

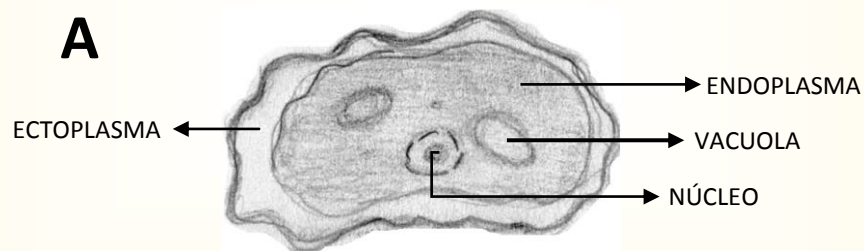


Figura 34. *C. actinophorum* (A) indica el trofozoíto. Esquema que indica cada una de las partes del trofozoíto.

h) Género: *Leptomyxa****Leptomyxa reticulata*** Goodey, 1914

Amiba reticulada y siempre multi-lobulada nunca en forma limax. Quiste multinucleado, con las dos capas muy bien separadas, el diámetro del quiste varía entre 32-65 μm

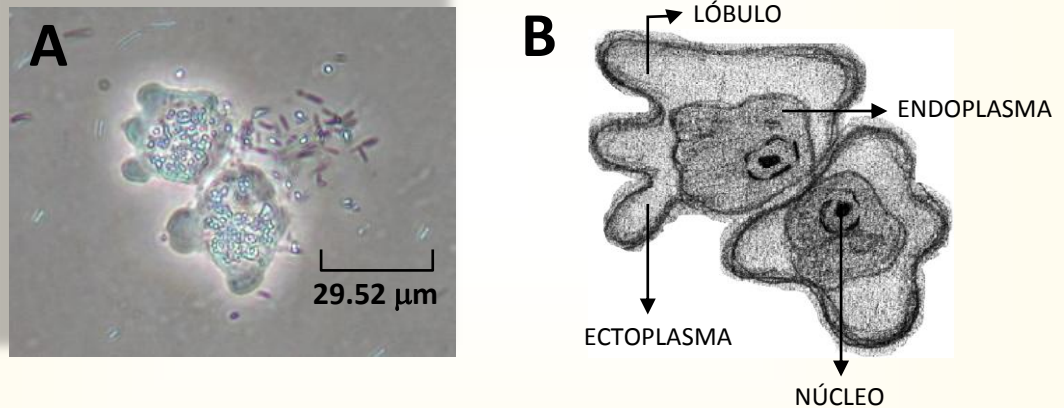


Figura 35. *L. reticulata* (A y B) indican el trofozoíto. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X; esquema que indica cada una de las partes del quiste.

i) Género: *Saccamoeba****Saccamoeba limax*** Dujardin, 1841

Amiba en forma limax con presencia de uroide, con una longitud de aproximadamente 35-85 μm alargada, multinucleada, crece en medios bacterianos.

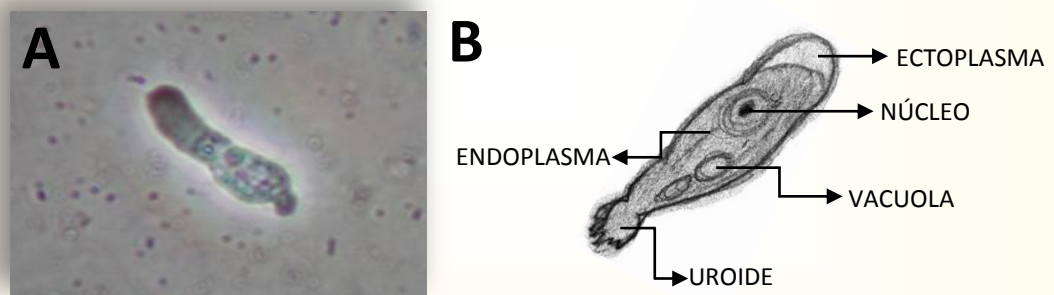


Figura 36. *S. limax* (A y B) indican el trofozoíto. Fotografía tomada con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X; esquema que indica cada una de las partes del quiste

j) Género: *Rhizamoeba**Rhizamoeba flabellata* Goodney, 1914

Raramente o nunca reticulada, pueden adquirir forma flabelada o una forma expandida irregularmente, con tendencia a ser multinucleada. Quiste con dos paredes bien separadas, varían en tamaño de acuerdo al número de núcleos que posea, excepcionalmente alargadas. Con aproximadamente no menos de 10 núcleos y no más de 50 núcleos

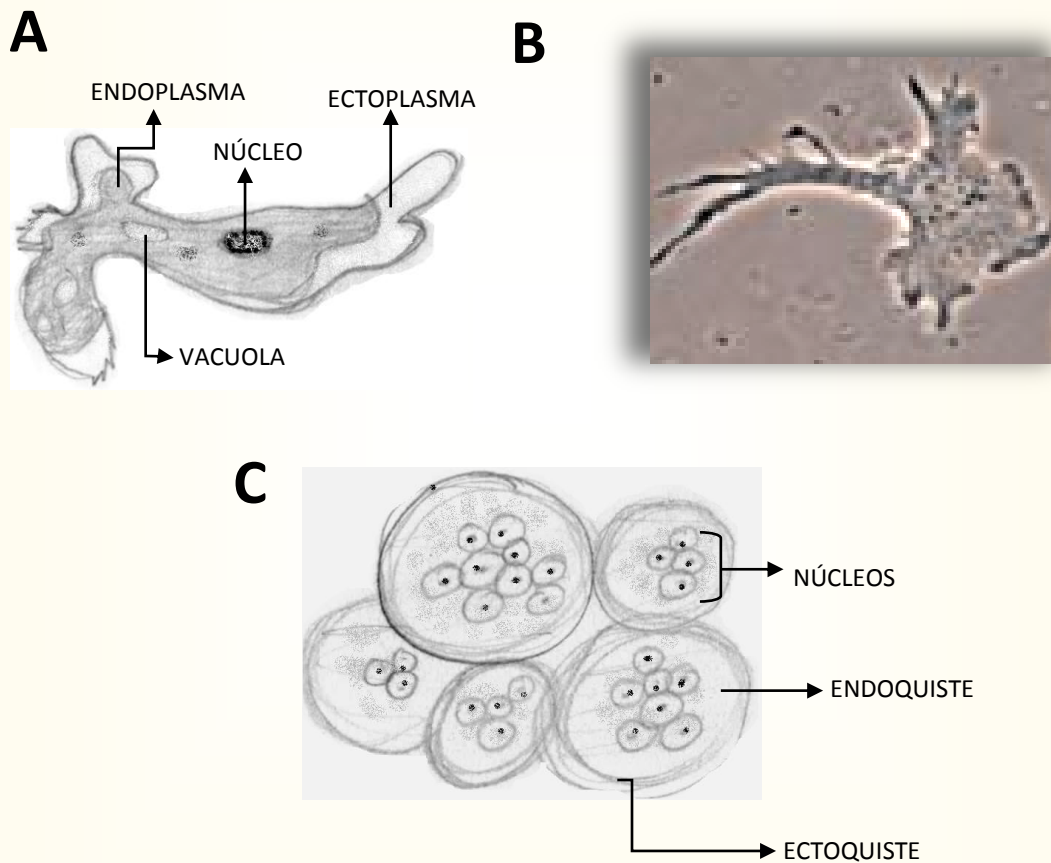


Figura 37. *R. flabellata* (A y B) indican el trofozoíto y (C) el quiste. Esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto respectivamente.

k) Género: *Rosculus****Rosculus ithacus* Hawes, 1963**

La forma locomotiva alcanza un tamaño aproximado de 5-17 μm , algunas veces se llegan a expandir un poco más. El quiste es liso, de forma oval o esférica, y pequeños de tamaño llegando a medir aproximadamente entre 3.5-8.8 μm

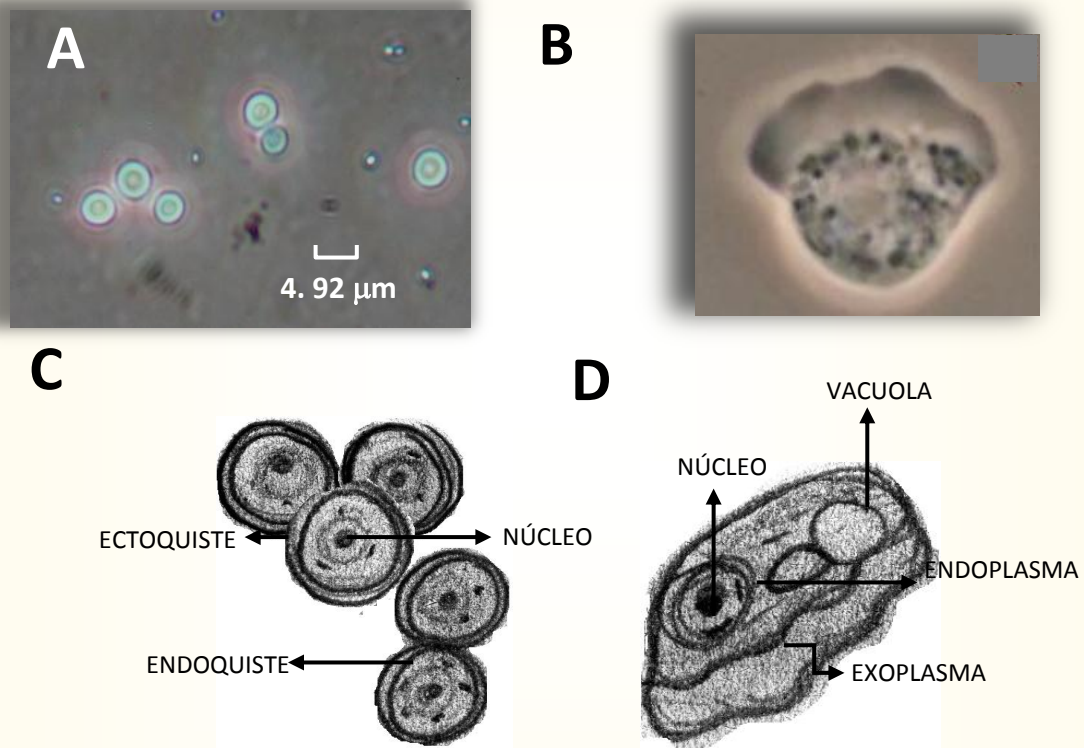


Figura 38. *R. ithacus* (A y B) indican el trofozoíto y el quiste, (C y D) esquemas que indican cada una de las partes del quiste y trofozoíto respectivamente. Fotografías tomadas con un microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

IX. CONCLUSIONES

La información recabada del estudio de la diversidad de las AVL presentes en las cuevas del mundo y en particular en México es muy escasa, lo cual resulta complicado el estudio ya que no se tiene un método estandarizada para la recolección de muestras, el aislamiento y la posterior identificación de las AVL.

El presente estudio contribuyó al conocimiento de las AVL generando un antecedente de la presencia de estos organismos en una cueva y dos grutas de la República de México.

En las Grutas de Tziranda y Karmidas y la Cueva de la Joya se encontraron los cuatro biotopos estudiados: agua, suelo, musgo y guano, aún con las diferentes características de cada biotopo, las condiciones no limitan la supervivencia de las AVL, pues se demostró la presencia de estos organismos en los cuatro biotopos.

Se aislaron e identificaron 135 organismos amebianos divididos en 11 géneros, siendo los más representativos *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Hartmannella*, lo cual demuestra que el ambiente cavernícola no es una limitante para el crecimiento de las AVL, pues estos ambientes se caracterizan por intervalos amplios de temperatura, humedad, dióxido de carbono (CO₂), diferencias en la calidad de agua, ausencia total o parcial de luz y en ocasiones escasez de alimento.

Se aisló e identificó morfológicamente a cuatro especies de importancia médica: *N. fowleri*, *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *A. culbertsoni* las cuales están reportadas ampliamente como especies patógenas para el humano, este registro muestra el posible riesgo que podría presentar ingresar a estas cuevas sin la precaución debida ya que en la actualidad estos espacios son considerados turísticos y eso aumenta la probabilidad de probables infecciones.

X. BIBLIOGRAFÍA

Adl,S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Sergei, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. y Taylor, M. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**:399–451

Armstrong, M. 2000. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infect. Dis. Rev.* **2**: 65-73.

Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J. Y y Alizadeh, H. 2002 Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J. Parasitol.* **88**: 621–623.

Barker, J. y Brown, M. R. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.***140**: 1253-1259.

Bastian, F., Alabouvette, C. y Jimenez, C. 2009. Bacteria and free-living amoeba in the Lascaux Cave. *Microbiol. Res.* **160**. 38:40

Bonilla, P. 2000. *Heterogeneidad de las Amibas de Vida Libre con potencial Patógeno Aisladas de la Atmósfera de la Ciudad de México*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias-UNAM.

Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón A., Gallegos, E. y Hernández. D. 2000. Ocurrence of free-living amoebae in aquatic systems of Huasteca Potosina, Mexico. *En*: Munawar, M., Lawrence, S y Malley, D. (eds.). *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers (Ed.), Holanda. pp. 37-44

Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Eslava, C. 2001. Ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. *Microbiología ambiental.***1**:68-82

Bottone, E. J. 1993. Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: An overview and basic microbiologic correlates. *Mount Sinai. J. Med.* **60**: 260-270.

Carter, R. F. 1972. Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**: 193-213

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. *Free-living Amebic Infections*. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/FreeLivingAmebic.htm>. (Consultada en septiembre de 2012)

Corliss, J. O. 1998. Clasificación de protozoa and protest: the current status. **En:** Coombs, G.H. Vickerman, K., Sleigh, M. A. y Warrren A. (eds.) *Evolutionary Relationships Among Protozoa*. Kluger Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands p. 409-447.

De Jonckheere, J. F. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 751-757.

Espinaza, P. R. 1994. Origen y distribución de las cavernas de México. *Ciencias.* **36**: 45-49

Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa. The Biology of Free-living Phagotrophic Protists*. Springer-Verlag. New York, U.S.A. p. 197.

Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasitic Immunol.* **13**: 31-47.

Fowler, M. y Carter, R. F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: A preliminary report. *Br. Med. J.* **2**: 740-743

Gallegos, E. N. 1997. *Amibas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis de Doctorado en Biología. Facultad de Ciencias UNAM. México. 132 pp

Gelman, B. B., Rauf, S.J., Nader, R., Popov, V., Bokowski, J., Chaljub, G., Nauta, H.W. y Visvesvara, G. S. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA.* **285**: 2450–2451

Golemansky, V. y Bonnet, L. 1994. Protozoa. **En:** Juberthie, C. y Decu, V. (eds.). *Enciclopedia Biospeologica*. Societe Biospealogie, Francia, 23-33

Goudot, S., Herbelin, P., Mathieu, L., Banas, S. y Jorand, F. 2012. Growth dynamic of *Naegleia fowleri* in microbial freshwater biofilm. *Water Res.* **46**: 3958-3966

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

Hoffmann, A., Palacios-Vargas, J. G. y Morales-Malacara, J. B. 1986. *Manual de Bioespeleología (con Nuevas Aportaciones de Morelos y Guerrero, México)*. Lab. de Acarología. Fac. de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 274 pp.

Hsu, B., Huang, C., Chen, J. y Huang, J. 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res.* **45**: 5171-5183

John, D. T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. *En*: Kreier, J. P. y Baker, J. R. *Parasitic Protozoa*. Academic Press, San Diego California, U.S.A., **2** (3): 143-246.

John, D. T. 1982. Primary amebic meningo encephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**: 101-23

Khan, N. A. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb. Pathog.* **34**: 277-285

Keeling, P. J. 2003. Congruent evidence from a tubulin and b tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *fungal Genet. Biol.* **38**:298-309.

Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. *J. Protozool.* **33**: 422-434.

Lasake, I., Korte, J., Kaneshiro, E., Marciano-Cabral, F. y Oerther, D. 2009. Identification of *Naegleria fowleri* in warm ground water aquifers. *J. Environ. Qual.* **39**: 147-153

Lehmann, O. J., Green, S. M., Morlet, N., Kilvingston, S., Keys, M. F., Matheson, M. M., Dart, J. K. G, McGill J. I. y Watt, P. J. 1998. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *IOVS.* **39**:7:1261-1265.

Lloyd, D., Turner, N. A., Khunkitti, W., Hann, A. C., Furr, J. R. y Russell, A. D. 2001 Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 11-16.

Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R. y Cabral, G. A. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Euk. Microbiol.* **47**: 29-36.

Marciano-Cabral, F. y Cabral G. 2003. *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in Humans. *Clin. Microbiol.* **16**(2):273.

Martinez, A. J. 1985. *Free-living Amebic: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease.* Press. Boca Raton, Florida. 156 pp.

Martinez, A. J. y Janitsschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; A review. *Infection.* **13**: 251-256.

Martinez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* **7**: 583-598

Mejía-Ortiz, L. M. 2008. Adaptaciones de los crustáceos a la vida subterránea. **En:** Álvarez, F. y Rodríguez- Almaraz, G.A.(eds.). *Crustáceos de México, Estado Actual de su Conocimiento.* Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. P. 419- 458

Morales, J. B. y Vázquez R. I. 1984. *Bioespeleología de la Gruta "La Joya" Taxco, Guerrero. Zoología.* No. 110, Biología de Campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 110 pp.

Michel, R., Muller, K. D., Amann, R. y Schmid, E. N. 1998. *Legionella*-like slender rods multiplying within a strain of *Acanthamoeba* sp. isolated from drinking water. *Parasitol. Res.* **84**: 84–88.

Secretaria de Turismo de México (SECTUR), 2012. *Michoacán Identidad. Grutas de Tziranda. El Alma de México.* <http://www.visitmichoacan.com.mx/> (consultada, septiembre de 2012)

Oddó, D., Ciani, S. y Vial, P., 2004. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*. Primer caso diagnosticado en Chile. *Rev. Chil. J.* **2**:740-2.

Omaña, M. 2011. *Acanthamoeba castellanii*: morphological analysis of the interaction with human cornea. **En:** Issues in Life Sciences: Bacteriology, Parasitology, and Virology: A Scholarly Editions eBooks. Georgia, E.U.A. 807 p.

Osorio-Tafall, B. F. 1943. Observaciones sobre la fauna acuática de las cuevas de la región de Valles, San Luis Potosí (México). *Rev. Soc. Mex. de Hist. Nat.* **4**(1-2):43-71

Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*, Freshwater Biological Association. Cumbria, England. 122 pp.

Peralta, R. M. y Ayala, O. J 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uninorte*. **2**: 280-292

Pernin, P. y Pélandakis, M. 2001. About some aspects of the ecology and biodiversity of the *Naegleria* amoebae. **En**: IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity. *John Libbey Eurotext*. París, Francia. p. 81-85.

Pereira, A. y Pérez, M. 2003. Amebas de vida libre. *Ámbito Farmaceutico*.**6**: 114-117

Pussard, M. y Pons, R.1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. **13**:557–598.

Ramírez, E. y Bonilla, P. 1995. Epidemiología de las amibas en México. *Rev. Información Científica y Tecnológica*. **17**:15-17.

Rivera, F., Ortega, A., López, E y Paz, M. 1979. A quantitative morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **98**:465-469.

Rivera, F., Ramirez, P., Vilaclara, G., Robles, E., y Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environ. Res.* **32**: 205–211.

Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramírez, E. y Bonilla, P. 1986. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water Air Soil Pollut.* **28**:185–198.

Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortíz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air Soil Pollut.* **74**: 65-87.

Rodríguez E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectol.* (México). **4**: 263-66.

Rodriguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 225-241

Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. y Marciano-Cabral, F. 2009. *Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae*. Hindawi Publishing Corporation. 14pp.

Rondanelli, E. G. 1987. *Amphizoic Amoebae Human Pathology, Infection Diseases*. Ed. Piccin Nuova libreria. Padua, Italy. 279 pp.

Simpson, A. G. B. y Roger, A. J. 2002. Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Curr. Biol.* **12**: 691–693.

Simpson, A. G. B. y Roger, A. 2004. Excavata and the origin of the amitochondriate eukaryotes. **En**: Hirt, P. H. y Horner, D. S., *Organelles, Genomes and Eukaryotic Phylogeny*. CRC Press, Boca Raton. P.27–53

Schuster, F. L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Microbiol. Rev.* **3** : 342-354

Schuster, F. L., Dunnebacke T. H., Glaser C., Vugia D., Bakardjiev A., Azimi P., Maddux-Gonzalez M., Visvesvara G. S., 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** : 342-354

Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* **34**:1001–1027

Scott, W. 1907. An ecological study of the plankton of shawnee cave. with notes on the cave environment. *Biol. Bull.* **6**: 386-407

SEGOB. 2009. Enciclopedia de los municipios de México. <http://www.desdelocal.gob.mx/wb/ELOCAL/ELOC> Enciclopedia (consultada en septiembre de 2012)

Sigala, R.I. 2008. *Registro Protozoológico en Cinco Biotopos de los Riscos Querétaro, México*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. México, UNAM. 110 p.

Sígala-Regalado, I. y R. Mayén-Estrada. 2008. Diversidad y aspectos ecológicos de protozoos en el Sistema Xaltégoxtli I, Puebla, México. *Mundos Subterráneos*, 18-19: 1-7

Sigala, R. I. 2011. *Diversidad de Protozoos Ciliados en Cinco Biotopos de Cuevas de México*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. México, UNAM. 150 p.

Sígala-Regalado, I., Mayén-Estrada, R. y Morales-Malacara, J. 2011. Spatial and temporal distribution of protozoa at Cueva de los Riscos, Querétaro, México. *J. Cave Carst. Studies*. 73 (2): 55-62

Sminorv, A. y Thar, R. 2003. Spatial dstrubution of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in brackish-water sediments at the sacale of centimeters and milimeters. *Protist*. **154**: 359-369

Thomas, V., Loret, J. F., Jousset, M. y Greub, G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol.* **10**(10): 2728–2745

Visvesvara, G. S. y Mcguire, J. H. 2006. Pathogenic and opportunistic free-living amebas: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **En**: Guerrant, R. L., Walker, D. H. y Weller, P. F. (eds.) *Tropical Infectious Diseases*. Philadelphia, USA. Pp. 1114–1125

Visvesvara, G. S., Moura, H. y Shuster, F. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *Immunol. Med. Microbiol.* **50**: 1-26

Visvesvara, G. S., Schuster, F. L. y Martinez, A. J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N .Sp., agent of amebic meningoencephalitis in human and other animals. *J. Euk. Microbiol.* **40** (4): 504-514

ANEXO

Medio NNE, agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes*

El medio NNE proporciona sales y principalmente una fuente de carbono que proviene de las bacterias, ambos elementos son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las amebas.

Se preparan los componentes de la solución salina de Neff y el agar bacteriológico a una concentración de 1.5 % (De Jonckheere, 1977).

Na Cl-----	0.120 g
MgSO ₄ 7H ₂ O-----	0.004 g
CaCl ₂ 2H ₂ O-----	0.004 g
Na ₂ HPO ₄ -----	0.142 g
KH ₂ PO ₄ -----	0.136 g
Agar bacteriológico-----	15.00 g
Agua destilada-----	1000 ml

Este medio se prepara mezclando los componentes en seco y después se agrega el agua destilada que es calentada hasta ebullición, se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y se deja enfriar, posteriormente se vacía en las placas Petri previamente esterilizadas.

Cuando el agar solidifica, se agrega una 0.5 ml de una suspensión de bacterias *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor a 70 °C por 30 minutos, la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie del medio con una varilla acodada.

Las placas se dejan reposar una hora y finalmente son guardadas en bolsas de plástico selladas con cinta adhesiva en el refrigerador.