



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“CARACTERIZACIÓN DE LA ERITROFAGOCITOSIS DE *Naegleria fowleri* POR MEDIO DE TRES TÉCNICAS DE MICROSCOPIA Y SU COMPARACIÓN CON *Entamoeba histolytica*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO SILVA FRAGOSO

ASESOR:

DR. VÍCTOR K. TSUTSUMI FUJIYOSHI

CO-ASESOR

DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. DE C.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Caracterización de la eritrofagocitosis de Naegleria fowleri por medio de tres técnicas de microscopía y su comparación con Entamoeba histolytica.

Que presenta el pasante: **José Antonio Silva Fragoso**

Con número de cuenta: **304051797** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de septiembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Marco Antonio Vega López	
SECRETARIO	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
1er. SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/prc*

CRÉDITOS

El presente trabajo fue desarrollado en laboratorio de Patología experimental, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV); bajo la dirección del Dr. Víctor Tsutsumi Fujiyoshi, la Dra. Mineko Shibayama Salas, y la M. en C. Angélica Silva Olivares.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Tsutsumi Fujiyoshi y a la Dra. Mineko Shibayama Salas, por otorgarme el privilegio de integrarme en su equipo de trabajo, por todo el apoyo incondicional hacia mi persona, por sus asesorías en todo momento, por proporcionarme todas las herramientas necesarias y la experiencia adquirida durante mi estancia en el laboratorio, así como, por todos sus consejos para fomentar mi desarrollo tanto profesional como personal. Al igual que por toda su confianza y amistad brindada.

A la M. en C. Angélica Silva Olivares, por su asesoría en todo el tiempo de la duración de este trabajo experimental, sus consejos para la implementación de este proyecto: así como su invaluable apoyo en la parte de Microscopía Electrónica de Transmisión y en la preparación de las muestras para esta técnica de microscopía.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 2 de Patología Experimental, Moisés, Roberto, Daniel, Luz, Suilma, Paula, Nadia, Gabriel, Silvia, Karla, Martita y Don Dago, por toda su amistad brindada, por todos sus consejos, asesorías, enseñanzas y momentos compartidos.

Al Dr. Rogelio Fragoso Soriano del Departamento de Física del CINVESTAV, por su inestimable labor en toda la parte correspondiente a la Microscopía de Fuerza Atómica, así como todo su apoyo incondicional y consejos en la redacción y elaboración del presente trabajo; así como en todo momento.

A la Biól. Lourdes Rojas de la Unidad de Microscopía Electrónica del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV, por su apreciable apoyo en todo lo concerniente a la Microscopía Electrónica de Barrido, así como en el procesamiento de las muestras para esta técnica.

Al M. en C. Jaime Escobar Herrera del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV, por su invaluable apoyo en todo lo correspondiente a la parte de Microscopía Confocal.

DEDICATORIA

A mis padres, la M. en C.E. Xóchitl Fragoso Sandoval y el M. en C.E. José M. Silva Rodríguez. Realmente no tengo las palabras para expresarles toda mi gratitud, por su ejemplo, por su comprensión, por su amor, por su infinita paciencia, por sus consejos, por su sacrificio para darme lo mejor, por ser amigos y confidentes. Por su apoyo incondicional en las buenas, en las malas, y en las peores; por educarme para ser un hombre con valores y principios.

Simplemente, los amo.

A mi hermano, Daniel. Porque tú y yo hemos sido cómplices, amigos y hermanos a la vez. Por tu apoyo y cariño. Al igual que para demostrarte, que por muy complicado que parezca, puedes realizar todo lo que te propongas, solo hay que ponerle empeño, dedicación y disciplina.

A todos los miembros de las Familias Fragoso Sandoval y Silva Rodríguez. Mis abuelitos Antonio Fragoso Romero y Rosalía Sandoval Lozada; Margarito Silva Rivero y María Rodríguez Sandoval. A todos mis tíos y primos, por todo su apoyo y su cariño sin condiciones.

A mis amigos y compañeros; Daniel, Yalid, Toño, Emilio, Cecy, Karen, Tanía, Ángel, Jessy, Paty, Rox, Caro, Montse, Pau, Miguel, Adriana, la Miss Vero, la Miss Sandra y el Dr. Víctor. Por todo lo que me han enseñado, por todo lo que hemos aprendido y recorrido juntos, por todos los momentos que hemos vivido en la escuela y en la vida, al igual que por todos los ratos de alegría, en las buenas y en las malas.

A los siguientes profesores de la FES Cuautitlán, por haberme impartido de manera magistral los conocimientos necesarios para desarrollarme en esta maravillosa profesión, por su paciencia, su entrega, e increíble disposición: M. en C. Sandra Martínez, M. en C. Verónica Castro, Dr. Víctor Zendejas, M.V.Z Gabriela Fuentes, Dr. Marco Vega, M. en C. Erik González, M. en C. Juana Cabrera, I.Q. Sonia Rincón, M. en C. Judith García, Q. Pilar Castañeda, Q.F.B. Elia Granados, Dr. Francisco López, Q. Mario A. Morales, Q.F.B. Brígida Camacho, Q.F.B. Idalia Ávila, Q.F.B. René Damián, M. en C. Ana Laura Vázquez, Q.F.B. Verónica Ruiz, Dra. Luisa Martínez, Dra. Jazmín Flores, M. en C. Guadalupe Avilés, Dra. Adriana Ganem, Q.F.B Amparo Ramos, Q.F.B. Ladislao Palomares, M. en C. Maritere Domínguez, Dr. Enrique Salas, Dra. Alma Núñez, Q.F.B Dulce Ruvalcaba, Dra. Susana Mendoza, Q.F.B. Laura Gricelda Martínez y; por supuesto a la Secretaria Martitha Mejía.

A mis sinodales: M. en C. Juan Pablo Martínez Labat, Dr. Marco Antonio Vega López, M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes, Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón y Q.F.B. Verónica Ruíz Solorio, por su valioso tiempo invertido en revisar y mejorar este trabajo.

Finalmente, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme brindado una educación de calidad, por mi formación como profesional, y mi enriquecimiento en todos los sentidos.

INDICE GENERAL

Índice general.....	I
Índice de figuras.....	IV
Lista de abreviaturas.....	VI
1. Introducción.....	1
1.1 <i>Naegleria fowleri</i>	1
1.1.2 Taxonomía de <i>N. fowleri</i>	2
1.1.3 Biología de <i>N. fowleri</i>	2
1.1.4 Epidemiología.....	5
1.1.5 Diagnóstico.....	6
1.1.6 Tratamiento.....	7
1.1.7 Ciclo Biológico, Patología y Patogenia.....	8
1.1.7.1 Ciclo Biológico.....	8
1.1.7.2 Patología.....	10
1.1.7.3 Patogenia y Mecanismos de Patogenicidad.....	10
1.1.8 Respuesta Inmunitaria hacia <i>N. fowleri</i>	12
1.1.8.1 Complemento.....	13
1.1.8.2 Neutrófilos.....	13
1.1.8.3 Macrófagos.....	14
1.1.8.4 Inmunidad Humoral.....	15
1.1.8.5 Inmunidad mediada por células.....	16
1.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	17
1.2.2 Biología de <i>E. histolytica</i>	18
1.2.3 Ciclo biológico y transmisión.....	20
1.2.4 Epidemiología.....	22
1.2.5 Diagnóstico.....	22
1.2.6 Tratamiento.....	23

1.2.7. Patología y patogenia.....	24
1.2.7.1 Patología	25
1.2.7.2 Patogenia	26
1.2.8 Eritrofagocitosis.....	29
1.2.9 Respuesta inmune del hospedero hacia la amibiasis intestinal.....	32
1.2.9.1 Inmunidad innata.....	32
1.2.9.2 Inmunidad adaptativa	34
1.3 Microscopía electrónica de transmisión	35
1.3.1 Instrumentación	36
1.3.2 Ventajas y desventajas.....	37
1.4 Microscopía electrónica de barrido.....	38
1.4.1 Principio del microscopio electrónico de barrido	38
1.4.2 Instrumentación	39
1.4.3 Ventajas y desventajas.....	39
1.5 Microscopía de fuerza atómica.....	40
1.5.1 Instrumentación	40
1.5.2 Modos de operación en el MFA.....	42
1.5.2.1 Modo de contacto	42
1.5.2.2 Modo de no contacto	42
1.5.2.3 Modo intermitente o “tapping”	43
1.5.3 Preparación de muestras	43
1.5.4 Ventajas y desventajas.....	44
2. Justificación.....	45
3. Hipótesis.....	45
4. Objetivo general	45
4.1 Objetivos particulares.....	45

5. Material y Métodos	46
5.1 Diagrama general de trabajo	46
5.2 Cultivo de amibas	47
5.3 Interacciones de las amibas con eritrocitos	47
5.4 Procesamiento de muestras para MET	48
5.5 Procesamiento de muestras para MEB	48
5.6 Procesamiento de muestras para MFA	49
5.7 Técnica histoquímica para la visualización de Actina	50
6. Resultados	51
6.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET)	51
6.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	52
6.3 Microscopía confocal (MC) de <i>N. fowleri</i>	53
6.4 Microscopía de fuerza atómica (MFA)	53
7. Discusión	72
8. Conclusiones	79
9. Referencias	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>N. fowleri</i> . Trofozoíto, flagelado y quiste.....	4
Figura 2. Estructura química de la Anfotericina B.....	8
Figura 3. Ciclo biológico de <i>N. fowleri</i>	9
Figura 4. <i>E. histolytica</i> . Trofozoíto y quiste	19
Figura 5. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	21
Figura 6. Estructura química del Metronidazol	24
Figura 7. Lesiones macroscópicas de amibiasis humana.....	26
Figura 8. Estructura propuesta de la lectina Gal-Gal Nac.....	27
Figura 9. Esquematización del Ameboporo A de <i>E. histolytica</i>	28
Figura 10. Esquema general del microscopio electrónico de transmisión	36
Figura 11. Esquema del principio del microscopio electrónico de barrido	38
Figura 12. Esquema general del microscopio electrónico de transmisión	39
Figura 13. Esquema general del microscopio de fuerza atómica	41
Figura 14. Esquematización del modo de contacto	42
Figura 15. Esquematización del Modo Intermitente o Tapping.....	43
Figura 16. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía electrónica de transmisión.....	55
Figura 17. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 60 minutos. Microscopía electrónica de transmisión.....	56
Figura 18. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 120 minutos. Microscopía electrónica de transmisión.....	57
Figura 19. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 2 minutos por microscopía electrónica de transmisión.....	58
Figura 20. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 5 minutos. Microscopía electrónica de transmisión.....	59
Figura 21. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía electrónica de transmisión.....	60

Figura 22. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía electrónica de barrido	61
Figura 23. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 60 y 120 minutos. Microscopía electrónica de barrido	62
Figura 24. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 2 minutos. Microscopía electrónica de barrido	63
Figura 25. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 5 minutos. Microscopía electrónica de barrido	64
Figura 26. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía electrónica de barrido	65
Figura 27. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía Confocal	66
Figura 28. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía Confocal	67
Figura 29. Co incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía de fuerza atómica	68
Figura 30. Co-incubación de <i>N. fowleri</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 120 minutos. Microscopía de fuerza atómica	69
Figura 31. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía de fuerza atómica	70
Figura 32. Co-incubación de <i>E. histolytica</i> con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía de fuerza atómica	71

LISTA DE ABREVIATURAS

CP	Cisteín Proteasas
DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
Hb	Hemoglobina
kDa	Kilodaltones
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAP	Meningoencefalitis Amibiana Primaria
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MFA	Microscopía de fuerza atómica
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
Nf	<i>Naegleria fowleri</i>
SFA	Suero bovino adulto
SFB	Suero fetal bovino
°C	Grado Celsius
SNC	Sistema Nervioso Central

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas patógenas y oportunistas de vida libre son protozoarios eucariontes, aerobios que presentan mitocondrias en su citoplasma. Se denominan de vida libre debido a su capacidad de permanecer en la naturaleza sin un hospedero intermediario para su supervivencia, transmisión o diseminación. Sin embargo, en condiciones desconocidas, pueden también comportarse como protozoarios parásitos (endoparásitos), tanto del ser humano como de muchos otros mamíferos, por lo que se consideran organismos anfizóicos (Shibayama-Salas *et al.*, 2006). Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados en muestras de diferentes tipos de suelo y agua de todo el mundo. Hay cuatro géneros que son responsables de infecciones oportunistas o no oportunistas en humanos y otros animales; éstos son *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia* (Trabelsi, *et al.*, 2012). De estos géneros, las especies más estudiadas son *B. mandrillaris*, *N. fowleri*, varias especies de *Acanthamoeba* y *S. pedata*. *Acanthamoeba spp.* y *B. mandrillaris* son patógenos oportunistas que causan infecciones del sistema nervioso central, pulmones y piel. *S. pedata* solo ha sido reportado un caso de encefalitis no fulminante, aunque se ha considerado su potencial patógeno (Visvesvara, *et al.*, 2007). De todas éstas, en el presente trabajo, se analizará a *Naegleria fowleri*, pues es nuestro objeto de estudio.

1.1 *Naegleria fowleri*

El género *Naegleria* consiste de un grupo de ameboflagelados de vida libre. Existen aproximadamente 30 especies de *Naegleria* que se han aislado del ambiente, pero *N. fowleri* es la única que ha sido aislada de humanos. *N. fowleri* causa la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), un padecimiento rápidamente fatal del sistema nervioso central, que ocurre con mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes con historial reciente de actividades acuáticas en cuerpos de agua (Marciano-Cabral y Cabral, 2007). El primer caso de MAP fue identificado y descrito por M. Fowler y R.F. Carter en 1965 en un niño de 9 años, en Port Augusta, Australia, y además, describieron 3 casos más (Fowler, y Carter, 1965). *N. fowleri* se ha encontrado en aguas templadas y salobres, incluyendo

albercas, estanques, lagos, corrientes, aguas termales, aguas contaminadas térmicamente y aguas residuales (Heggie, 2010).

1.1.2 Taxonomía de *N. fowleri*

Las amibas del género *Naegleria* se ubican dentro de la familia *Vahlkamfiide*. La clasificación de las especies de *Naegleria* estaba basada en características morfológicas del quiste, la tolerancia a la temperatura, criterios inmunológicos, patrones enzimáticos y su patogenicidad (De Jonckheere, 2004). Sin embargo, este sistema de clasificación es sumamente subjetivo, ya que se ha demostrado que tales características varían dependiendo de las condiciones y el tiempo que las cepas llevan en cultivos axénicos. Recientemente se ha comenzado a utilizar criterios moleculares para la clasificación de las especies de *Naegleria*, como el análisis de las subunidades del DNA ribosomal (De Jonckheere, 2004). Basados en este parámetro, se ha propuesto la existencia de 36 especies de *Naegleria*, de las cuales, solo *N. fowleri* es patógena para el humano. Otras especies como *N. australiensis*, *N. italica* y *N. philippiniensis* son patógenas en los modelos animales, sin embargo, no se ha reportado ningún caso humano provocado por alguna de estas especies. *N. lovaniensis* ha llamado la atención últimamente, ya que fue la primera especie termofílica no patógena descrita para este género, y mantiene una estrecha relación evolutiva con *N. fowleri*. De tal modo que se ha propuesto como la contraparte no patógena de *N. fowleri* y puede ser sumamente útil en estudios comparativos de mecanismos de patogenicidad; sin embargo, hasta el momento, *N. gruberi* es la especie no patógena que se sigue usando como control en estudios de patogenia (De Jonckheere, 2011).

1.1.3 Biología de *N. fowleri*

Hay 3 estadios morfológicos en el ciclo de vida de *Naegleria*, el trofozoíto, el quiste y el flagelado (Fig. 1). El trofozoíto es la forma activa. En esta etapa del ciclo se lleva a cabo la división celular y la alimentación. La división es de tipo metamitótica, caracterizada por conservar intactas la membrana nuclear y el nucléolo durante la cariocinesis. Cuando los trofozoítos se incuban en

amortiguadores no nutritivos, como solución salina isotónica o amortiguadores de fosfatos, sufren una diferenciación hacia la forma flagelada que no es susceptible de dividirse o alimentarse. Por último, la etapa del quiste se presenta como una fase de resistencia o protección de las condiciones de desecación o de ausencia de nutrientes; regresa a la etapa activa cuando las condiciones nutricionales y ambientales le sean favorables. El trofozoíto constituye el estado activo o invasivo de *N. fowleri*. Cuando esto ocurre, la amiba puede desenquistarse, o bien, la forma flagelada se revierte rápidamente a trofozoíto y de esa forma invade. La forma flagelada y los quistes de *N. fowleri* nunca se han descrito en tejidos ni en muestras de líquido cefalorraquídeo, donde solamente se ha observado la forma del trofozoíto (Shibayama-Salas *et al.*, 2006).

Los trofozoítos miden de 10 a 25 μm . En cultivo son muy activos y cambian de forma constantemente. Presentan proyecciones citoplasmáticas conocidas como pseudópodos o lobópodos relacionados con la locomoción. Además, presentan otras proyecciones citoplasmáticas conocidas como copas alimenticias que la amiba utiliza para la fagocitosis de levaduras, bacterias y restos celulares. A nivel ultraestructural, los trofozoítos de *N. fowleri* presentan las características típicas de las células eucariontes, con excepción de centriolos, que no han sido identificados. Presentan una membrana citoplasmática de unos 10 nm de espesor. En el citoplasma se pueden observar un gran número de ribosomas libres o asociados al retículo endoplásmico. El citoplasma exhibe una fuerte distinción entre el endoplasma y el ectoplasma. También presentan retículo endoplásmico liso al igual que un uroide terminal. Aunque no se observa un aparato de Golgi típico, se ha identificado un complejo similar constituido por un gran número de vesículas. Las mitocondrias tienen forma de copa. Además, mediante reacción histoquímica para fosfatasas ácidas se han identificado lisosomas. El núcleo es prominente y contiene nucléolos conspicuos. La envoltura nuclear es típica de los eucariontes y la membrana nuclear externa está relacionada con los ribosomas (Marciano-Cabral, 1988). Cuando la amiba se encuentra en la fase flagelada, no se alimenta ni se divide. Su rango de tamaño oscila entre los 10 a 16 μm y usualmente se revierte a su forma ameboidea dentro de una hora o menos. En el laboratorio, esta

diferenciación en forma flagelada se obtiene cuando los trofozoítos se incuban en solución salina; implica una serie de cambios en la forma celular y en la síntesis de los organelos relacionados con el aparato flagelar; la transformación completa toma varias horas. Los cambios estructurales con el fenotipo del flagelado de *N. fowleri* no son discernibles durante los primeros 90 minutos. Sin embargo, a las dos horas del proceso de flagelación, disminuye el número de vacuolas citoplasmáticas y cuerpos basales y aparecen los flagelos típicos. El flagelado tiene un núcleo sencillo con un gran nucléolo. El flagelo muestra un arreglo de 9+2 filamentos cubiertos por una membrana citoplasmática continua. El círculo externo del doblete flagelar se continua con el cilindro del triplete de 9 filamentos, que constituye el cuerpo basal. El aparato flagelar maduro consta de dos flagelos, dos cuerpos basales, microtúbulos y una sola base estriada o rizoplasto. La forma quística ofrece al protozoo protección necesaria contra la desecación y la falta de nutrientes del medio. El quiste es normalmente esférico; midiendo entre 7 y 14 μm , y posee una doble pared con un exoquiste grueso cercano a un endoquiste delgado. El género *Naegleria* exhibe en la pared del quiste poros cubiertos por un tapón mucoide. El quiste también posee un núcleo sencillo con un nucléolo prominente (Shibayama-Salas *et al.*, 2006).

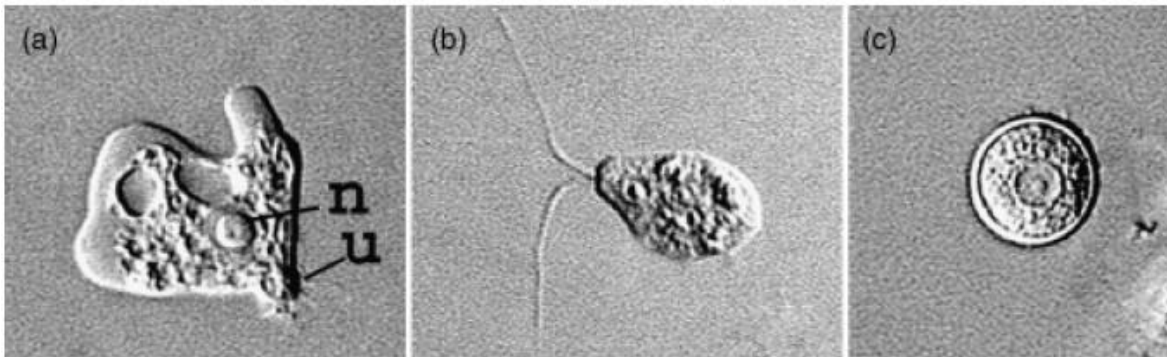


Fig. 1. *N. fowleri*. a) Trofozoíto mostrando el núcleo (n) y el uroide (u), b) flagelado y c) quiste. Visvesvara *et al.*, 2007.

Durante el enquistamiento, la amiba conserva el núcleo y las vacuolas citoplasmáticas, incluidas las alimenticias y las contráctiles. Posteriormente, las mitocondrias se alargan y el retículo endoplásmico se hincha. El material de la pared del quiste se sintetiza y empaqueta, probablemente en el retículo endoplásmico (Shibayama-Salas *et al.*, 2006; Visvesvara, 2013; Visvesvara *et al.*, 2007)

1.1.4 Epidemiología

N. fowleri ha sido detectada en todos los continentes, excepto la Antártida. Solo se han reportado 235 casos de MAP a nivel global, por lo tanto, esta enfermedad es rara en su ocurrencia. La enfermedad casi siempre es fatal, y solo el 5% de los pacientes han podido recuperarse y sobrevivir (Heggie, 2010). En Europa, 24 casos de MAP han sido reportados. Los primeros casos fueron diagnosticados en la República Checa por Cerva y Novak en 1968, donde 16 pacientes se infectaron en una corriente termal, contaminada con agua industrial. En 1981 también, se reportó por Cain y colaboradores en fuentes geotermales de Inglaterra. Además de Bélgica, la República Checa, Italia e Inglaterra, no se han reportado infecciones de MAP en otros países de Europa, aunque en Francia, se han monitoreado sus fuentes naturales de agua y se ha detectado a esta amiba (Van den Driessche *et al.*, 1973).

En Oceanía, la mayoría de los 19 casos de MAP, se han reportado en la región meridional de Australia. Las fuentes de infección han sido las pipas de suministro de agua de la ciudad, piscinas privadas o en el agua de grifo, al proceder a la higiene nasal. En las pipas de agua, el problema radica en que el agua de las corrientes es filtrada inadecuadamente y, a su vez, es transportada a grandes distancias a través del desierto. Por lo tanto, esta agua se calienta por el sol, favoreciendo las condiciones de crecimiento de *N. fowleri*. Solo 9 casos han sido reportados en Nueva Zelanda y todos han sido relacionados por practicar natación en una fuente geotermal. En Asia, un total de 39 casos de MAP han sido reportados, además de 2 casos en Japón. No se logró identificar la fuente de infección de esos casos, pero se sabe que *N. fowleri* se ha aislado de aguas termales y de agua industrial en Japón. En Tailandia se han reportado 12 casos de

MAP, la mayoría por nadar en canales de riego o en lagos. Un caso de MAP ha sido reportado en China, este ocurrió después de que el paciente nadara en una fuente termal, este paciente logró recuperarse. Recientemente en Pakistán se ha reportado un brote de 13 casos de MAP en el lapso de 17 meses, probablemente por el uso de agua de grifo que no fue adecuadamente filtrada o clorada. En las regiones de Medio Oriente, una nueva forma de infectarse con esta amiba se debe a que los musulmanes practican un ritual religioso de ablución, el cual implica introducir agua en las fosas nasales, creando una vía de entrada perfecta para *N. fowleri* y un fácil acceso al cerebro. En India se han reportado 11 casos de MAP. La mayoría de los pacientes se han infectado por nadar o por bañarse en agua proveniente de pozos, estanques o charcos. Se ha confirmado la presencia de *N. fowleri* en albercas, estanques y canales de riego. En Norteamérica, se han reportado 111 casos desde 2008, y 9 casos en México. En Norteamérica, especialmente en los estados sureños de clima cálido de los Estados Unidos, al igual que en México, la mayoría de casos ocurridos de MAP se dan después de nadar en agua naturalmente calentada por el sol. En Estados Unidos, la presencia de *N. fowleri* es frecuentemente reportada en aguas termales contaminadas con agua de las industrias, pero también en lagos calentados por el sol. En California algunos casos ocurrieron después de nadar en aguas geotermales. En Sudamérica, solo se han reportado casos de MAP en Venezuela con 7 casos, y en Brasil con 5 casos. La mayoría de éstos están relacionados con nadar en fuentes naturales de agua y en piscinas que no han sido tratadas adecuadamente (mal cloradas o sin filtrar). En Cuba, un solo caso de MAP se ha registrado, y en Costa Rica, solo se ha diagnosticado un caso de MAP en una vaca. Como se puede ver, *N. fowleri* se encuentra distribuida mundialmente y su forma de adquisición en la mayoría de los casos es común en actividades acuáticas recreativas (De Jonckheere, 2009).

1.1.5 Diagnóstico

Desafortunadamente, la mayoría de los casos de MAP se identifican por autopsia, debido a que las características clínicas son casi indistinguibles de la meningoencefalitis bacteriana o viral, además de que la comunidad médica tiene

pocos conocimientos sobre la MAP. Una meningoencefalitis de aparente origen bacteriano relacionada con antecedentes recientes de actividad acuática, debe alertar a los médicos de una posible MAP. Se puede llevar a cabo el análisis microscópico de una muestra de líquido cefalorraquídeo del paciente, y aunque este sencillo análisis no se lleva a cabo de rutina casi nunca, en el caso de la MAP puede salvar la vida del paciente. Lo que se busca son trofozoítos ameboideos de unos 15 a 25 μm , con pseudópodos digitiformes muy móviles. Para distinguir a *N. fowleri* de otras amibas, se toma una muestra del sedimento de LCR y se incuba en solución salina isotónica durante 2 a 3 h a 37 °C, al cabo de las cuales se debe detectar la presencia de pequeños organismos piriformes biflagelados. Este proceso es conocido como enflagelación, y ayuda a confirmar el diagnóstico de *N. fowleri*, el cual también se puede llevar a cabo mediante inmunodetección con anticuerpos α - *N. fowleri*. Los estudios serológicos no son muy útiles para el diagnóstico de la MAP, ya que la enfermedad avanza con tanta rapidez, que el paciente no es capaz de montar una respuesta inmunitaria humoral adecuada (Shibayama-Salas *et al.*, 2006; Visvesvara, 2013).

1.1.6 Tratamiento

La tasa de supervivencia en esta enfermedad depende de un rápido diagnóstico y de un tratamiento oportuno. El agente terapéutico empleado para la MAP, es la anfotericina B (Fig. 2). Aunque el tratamiento no es específico en contra de esta amiba, ha permitido la recuperación exitosa, a nivel mundial, en un pequeño número de casos. Este fármaco es el único, hasta el momento, con eficacia clínica establecida para el tratamiento de la MAP. El tratamiento puede combinarse con rifampicina, azitromicina, miltefosina, clorpromacina y/o roquitamicina (Da Rocha-Azevedo, *et al.*, 2009). El mecanismo de acción de la anfotericina B radica en la capacidad de alterar las membranas celulares, por su gran afinidad hacia los esteroides tanto de los hongos como de las células eucariontes, lo cual provoca la pérdida de iones de potasio y de otros contenidos celulares (Lizasoain y Aguado, 2008). Debido a que la anfotericina B es insoluble en agua y provoca toxicidad renal, urge el desarrollo de otros fármacos que no provoquen o tengan baja

toxicidad. Actualmente se están desarrollando nuevos agentes terapéuticos contra esta ameba de vida libre para poder superar esta enfermedad (Debnath *et al.*, 2012).

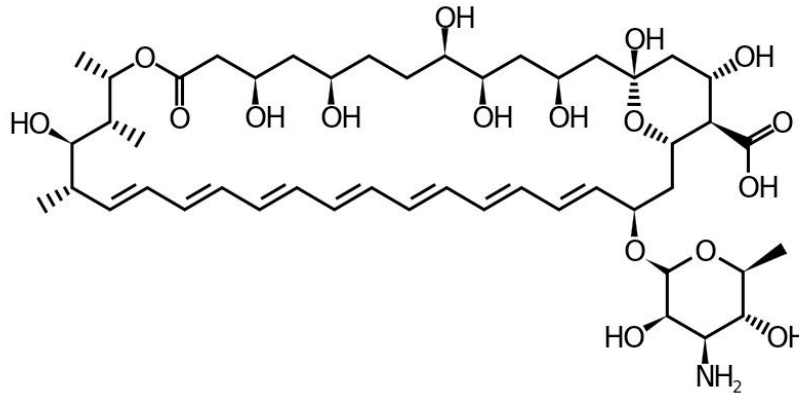


Fig. 2. Estructura química de la Anfotericina B. Tomado de Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica* (Lizasoain y Aguado., 2008)

1.1.7 Ciclo Biológico, Patología y Patogenia

1.1.7.1 Ciclo Biológico

La infección por *N. fowleri* se adquiere por exposición al agua de estanques, albercas o lagos donde la temperatura es alta y permite el crecimiento de las amibas. Los trofozoítos y probablemente los quistes también, inclusive las formas flageladas, entran por las fosas nasales y penetran en el epitelio de la mucosa olfatoria, viajan a lo largo de los nervios olfatorios, cruzan la placa cribiforme y llegan al cerebro (Jarolim *et al.*, 2000) (Fig. 3). Se sabe que en los niños, la placa cribiforme es más porosa que en el adulto, quizá por eso la incidencia de la enfermedad es mayor en niños y jóvenes. Los sitios infectados más cercanos al sistema nervioso central (SNC) son la mucosa y los nervios olfatorios, de modo que las lesiones iniciales se presentan en los lóbulos frontales y olfatorios del cerebro.

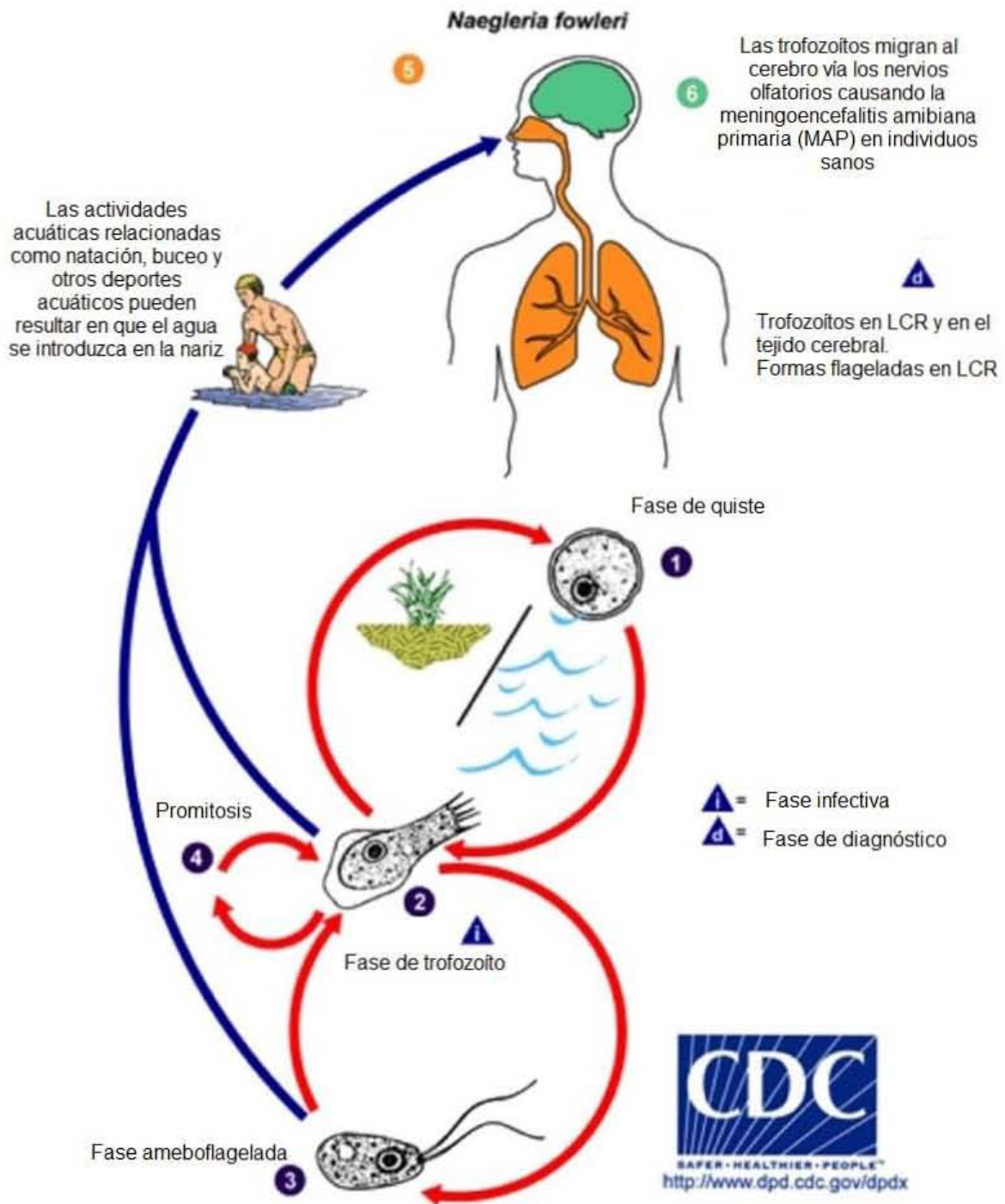


Fig. 3. Ciclo biológico de *N. fowleri*. Tomado del Centro para el Control y Prevención de enfermedades, 2014. <http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/>

1.1.7.2 Patología

El daño más importante que provoca la infección por *N. fowleri* es al SNC y se conoce como MAP. Se trata de una encefalitis aguda que afecta también a las meninges; es fulminante, pues lleva a la muerte de 3 a 10 días posteriores a la aparición de los primeros síntomas. Los síntomas que se han observado incluyen dolor de cabeza severo, náusea, vómito, fiebre, rigidez de la nuca, anormalidades de los sentidos, como en el gusto o el olfato, ataxia, fotofobia, incremento de la presión intracraneal, letargia, confusión y coma. En esta enfermedad, los hemisferios cerebrales y el cerebelo se observan edematosos y muy congestionados. El bulbo olfatorio y las cortezas orbitofrontales presentan necrosis y hemorragia. El exudado fibrinopurulento es escaso. Desde el punto de vista histológico, los trofozoítos rodean a los vasos sanguíneos en el espacio de Virchow-Robin con un número reducido de leucocitos polimorfonucleares. En los espacios subaracnoideos de las meninges es posible observar un exudado purulento que contiene amibas. Los estudios *post mortem* revelan también la existencia de ulceraciones de la mucosa nasofaríngea y necrosis de los nervios olfatorios, así como necrosis hemorrágica en la zona de los bulbos olfatorios. Debido a la ausencia de síntomas distintivos, la MAP puede ser confundida con alguna meningitis piógena o bacteriana, resultando en un diagnóstico equivocado (Shibayama-Salas *et al.*, 2006; Visvesvara, 2013; Visvesvara *et al.*, 2007).

1.1.7.3 Patogenia y Mecanismos de Patogenicidad

La mayoría de los casos de MAP se presentan en niños y jóvenes aparentemente sanos y con antecedentes recientes de haber nadado. Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto de patogenicidad de *N. fowleri*. Pero se podría considerar que engloba los siguientes factores:

- Adherencia: Durante la invasión al hospedero por parte de *N. fowleri*, el primer contacto de los trofozoítos es con la capa mucosa del epitelio olfatorio. Obviamente, la adhesión en *N. fowleri* es un factor muy importante durante el proceso de citopatogenicidad. Más específicamente, la habilidad de los trofozoítos de *N. fowleri* de adherirse a la mucosa nasal, es

probablemente un factor importante para la progresión de la enfermedad. Experimentos *in vitro* han mostrado que los trofozoítos de esta amiba presentan grandes niveles de glicoconjugados de superficie conteniendo α -D-manosa, α -D-glucosa, ácido N-acetilneuramínico y residuos terminales de α -L-fucosa. Esto sugiere que los glicoconjugados que contienen D-manosa participan en la adhesión de *N. fowleri* (Carrasco-Yeppez *et al.*, 2013).

- Citoesqueleto: La actina del citoesqueleto es esencial para todas las células eucariontes. Además de jugar un papel importante en la estructura celular, el arreglo de la actina en filamentos potencia diversos procesos celulares, entre ellos la fagocitosis y la motilidad. La expresión de actividad patogénica requiere de un citoesqueleto dinámico que permite un movimiento rápido, penetración de los tejidos y cambio en la morfología de los protozoarios (Sohn *et al.*, 2010).
- Proteasas: Se ha purificado parcialmente una cisteín proteasa secretada de 30 kDa, que ha mostrado un efecto citopático en células BHK, cuya función es principalmente en la destrucción de tejidos. También se ha reportado la participación de hidrolasas ácidas (Serrano-Luna, *et al.*, 2013).
- Copas fagocíticas o amebostomas: Los trofozoítos de *N. fowleri* exhiben copas alimentarias o amebostomas, las cuales son extensiones citoplasmáticas de su superficie. Las copas fagocíticas, que varían en tamaño y número dependiendo de la especie o de la cepa, mediante las cuales *N. fowleri* ingiere bacterias, levaduras, y restos celulares, son necesarias para que la amiba realice un proceso de fagocitosis mediante “mordisqueos” llamado trogocitosis. La trogocitosis (del griego *trogos*, que significa, roer) es un fenómeno de ingestión por partes de los objetivos celulares por medio de las copas fagocíticas (Joly y Hudrisier, 2003). Esto puede sugerir que las copas fagocíticas pueden jugar un papel importante en la adherencia de los sustratos amibianos y además puede ingerir material particulado (Sohn *et al.*, 2010).
- Fosfolipasas: Al igual que los macrófagos de los mamíferos, las amibas de vida libre son altamente fagocíticas y por lo tanto se espera que exhiban

una alta actividad en el metabolismo de los lípidos. Se ha visto que las amibas expresan una gran cantidad de proteínas fosfolipasa. También se ha comprobado que *N. fowleri* también puede secretar fosfolipasas. Se ha podido reportar que existe una mayor actividad y nivel de secreción en amibas altamente patogénicas, que en cepas avirulentas o no patógenas. También se ha demostrado que la mielina humana es el sustrato para la actividad de las fosfolipasas secretadas, sugiriendo que esta enzima puede estar involucrada en el papel de la lisis de las células nerviosas en la encefalitis amibiana (Barbour y Marciano-Cabral, 2001).

- Naegleriaporos: Son proteínas asociadas a membrana que exhiben actividad hemolítica en los eritrocitos. Se han aislado dos proteínas formadoras de poros, las cuales han sido designadas como Naegleriaporo A y B, las cuales se ha demostrado que son altamente patogénicas al contacto de las células humanas (Herbst *et al.*, 2002).

1.1.8 Respuesta Inmunitaria hacia *N. fowleri*

Se han usado varios modelos *in vivo* para descifrar la patogénesis, mecanismos de virulencia y la respuesta inmune del hospedero ante la MAP. El uso de ratones como modelo para estudiar los eventos histopatológicos durante la patogénesis de la MAP han mostrado estas características: 1) no hay inflamación durante el proceso migratorio de la amiba desde el epitelio hasta los bulbos olfatorios, excluyendo la inflamación observada en la cavidad nasal debido a la penetración de la amiba en los tejidos epiteliales, 2) el daño tisular no es evidente durante las etapas tempranas de la infección y la amiba realiza poco o nada de citotoxicidad *in vivo*, 3) una intensa respuesta inflamatoria se puede observar durante las etapas tardías de la infección, y esto puede asociarse con áreas líticas necróticas y hemorrágicas, sugiriendo que la inflamación es importante en el daño tisular (Cervantes-Sandoval, *et al.*, 2008). *N. fowleri* ha evolucionado hacia un patógeno exitoso, porque ha desarrollado mecanismos para esquivar el sistema inmune del hospedero (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

1.1.8.1 Complemento

El sistema del complemento, que constituye el primer sistema de defensa contra los organismos invasores, es activado por los trofozoítos de *Naegleria* (Whiteman y Marciano-Cabral, 1987). En estudios tempranos, usando el modelo de la MAP en ratón, mostraron que la cepa de ratones más susceptible (A/HeCR) para la infección por *N. fowleri* fue la deficiente en complemento (C5) (Haggerty y John, 1978). Estas observaciones *in vivo* son acordes con aquellas obtenidas *in vitro*, las cuales indican que las especies débiles o no patogénicas de *Naegleria*, son sensibles al complemento y son lisadas por el MAC del complemento. A su vez, las cepas de *N. fowleri* que han sido pasadas a través de animales de experimentación y aquellas que son más patogénicas, son más resistentes al complemento (Whiteman y Marciano-Cabral, 1987). Con estudios *in vitro* se ha podido demostrar que las cepas altamente patogénicas de *N. fowleri* al menos emplean dos medios para evadir el daño por el complemento: 1) expresión de proteínas complemento-regulatorias y 2) encubrimiento del MAC (C5b-C9) en vesículas (Toney y Marciano-Cabral, 1992).

1.1.8.2 Neutrófilos

El examen histopatológico de las lesiones cerebrales humanas que tienen trofozoítos amibianos revela un infiltrado inflamatorio que consiste en neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Los neutrófilos activados dentro de estas lesiones podrían jugar un papel muy importante en la fase temprana de las infecciones por *Naegleria*. Martínez (1985) reportó un marcado incremento de los neutrófilos en el conteo sanguíneo de las células blancas durante las infecciones por *Naegleria* y los neutrófilos predominaban en el líquido cefalorraquídeo obtenido de individuos infectados. Un papel de los neutrófilos en la inmunidad contra *Naegleria* fue reportado por Ferrante y Mocatta (1984), quienes indicaron que los neutrófilos activados por linfocinas fueron capaces de eliminar *Naegleria in vitro*. Ferrante *et al.*, también sugirieron que el sistema halido-H₂O₂-mieloperoxidasa de los neutrófilos juega un papel muy importante en la expresión de actividad anti-amiba. Se ha sugerido también, que los productos de activación del complemento

provocan una intensa respuesta quimiotáctica, resultando en la acumulación de neutrófilos alrededor de las amibas, que desemboca en su destrucción (Rowan-Kelly *et al.*, 1980). Así, mientras, el mecanismo definitivo por el cual los neutrófilos tienen actividades anti-*Naegleria* aún queda por ser definido, es aparente que ellos juegan un papel importante en la destrucción de las amibas y que el proceso de su reclutamiento a sitios locales de localización de las amibas que es mediado por una cantidad abundante de factores solubles incluyendo citosinas y componentes del complemento.

1.1.8.3 Macrófagos

Hay evidencia de que los macrófagos también participan en la defensa del hospedero en contra de *Naegleria*. Hay varios datos que indican que los macrófagos activados sirven como eficientes células citotóxicas contra células tumorales y patógenos mediante la producción de intermediarios reactivos de oxígeno durante el estallido respiratorio, provocando la liberación de óxido nítrico (NO) y mediadores no oxidativos incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en inglés) y la interleucina 1 (IL-1) (Cleary y Marciano-Cabral, 1986). Los macrófagos, activados por diferentes inmunomoduladores, destruyen a *N. fowleri* mediante un proceso de contacto-dependencia y de la secreción de factores citolíticos solubles (Cleary y Marciano-Cabral, 1986). En estudios usando la microglía; los cuales son los macrófagos que residen en el cerebro, sugieren que estas células pueden jugar un rol importante en la resistencia del hospedero hacia *Naegleria* y, en efecto, puede comprender la primera línea de defensa contra la invasión al SNC. Resultados de estudios *in vitro* con microglía de ratas neonatales, indican que débilmente pueden destruir amibas patogénicas de *N. fowleri*, mientras que amibas de *N. fowleri* altamente patogénicas, en vez de servir como objetivos, destruyen a la microglía. Las cepas altamente patogénicas de *N. fowleri*, pasadas en ratón, pueden destruir el tejido cerebral, y esto se puede comprobar por medio de microscopía electrónica (Cleary y Marciano-Cabral, 1986). Ensayos de RNAsas, realizados en RNA total obtenido de cultivo, revelan que ambas cepas débilmente y fuertemente patogénicas de *N.*

fowleri, inducen la producción de mRNAs de citocinas proinflamatorias de la microglía. La producción de esas citocinas, al parecer no confiere protección contra la infección. También se ha reportado que, aunque *N. fowleri* induce la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , sin embargo, destruye la microglía por medio de un proceso fagocítico. Estos datos sugieren que la observación de citocinas proinflamatorias en el cerebro, en la respuesta hacia *N. fowleri*, además de que no confieren una actividad protectora, la gran cantidad de estos factores inflamatorios pueden contribuir al curso de la patogenia (Oh *et al.* 2005). Así, *Naegleria* puede provocar un daño físico intenso al rodear células neuronales u otros tipos celulares cerebral mediante efectores directos célula-objetivo-célula por contacto, o por la liberación de factores solubles citolíticos. En segundo lugar, *Naegleria* puede provocar un proceso inmunopatológico en el cerebro. Esto es, los factores citotóxicos liberados, en conjunto con los restos generados mediante la lisis de las neuronas y de otras células en el cerebro, pueden servir como atrayentes de la microglía hacia sitios focales de la infección. Consecuentemente la activación de la microglía puede llevar a una activación secundaria de los astrocitos y la generación de una cascada de citosinas inflamatorias que pueden resultar en hiperinflamación, ruptura de la barrera hemato-encefálica y entrada de células inmunes desde sitios no neuronales con efectos catastróficos (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

1.1.8.5 Inmunidad humoral

La respuesta inmune humoral hacia *Naegleria* ha sido estudiada en animales experimentales y en humanos. Algunas muestras de suero de pacientes sanos han sido examinadas para buscar anticuerpos contra *N. fowleri*, en muchas partes del mundo (Reilly *et al.*, 1983; Marciano-Cabral *et al.*, 1987; Curson *et al.*, 1980; y Cerva *et al.*, 1989). La mayoría de los sueros de individuos sanos resultaron positivos para *N. fowleri*, esto puede indicar que la exposición hacia *N. fowleri* es algo común. Varios estudios se han realizado con la finalidad de determinar el papel de los anticuerpos por idiotipo en la resistencia del hospedero hacia la infección por *Naegleria*. Rivera *et al.* (2001) realizaron un estudio para detectar IgA

en el suero y saliva en individuos del norte de México; áreas donde *Naegleria* es endémica, en comparación con aquellos que viven en áreas no endémicas. En áreas donde la amiba es endémica, los títulos de anticuerpos IgA hacia *N. fowleri* encontrados en el suero y saliva de los pacientes fueron significativamente más altos en los pacientes que tenían infecciones las vías respiratorias altas en comparación con aquellos individuos sanos. Los autores indicaron que esos niveles de IgA y de IgM, presentes en las secreciones de las mucosas, podrían jugar un papel importante en la prevención de la infección por la amiba mediante el bloqueo de la adhesión de los trofozoítos a la mucosa epitelial. Sin embargo, otros autores (Cain *et al.*, 1979) han indicado que los niveles de IgA presentes en el suero no podrían tener un papel de gran significancia, y que la protección podría darse por el esquema medicamentoso empleado para esta infección. Por lo tanto, se deben de hacer más estudios para discernir esta conclusión.

1.1.8.5 Inmunidad mediada por células

El papel de la inmunidad mediada por células (IMC) en respuesta hacia *N. fowleri* ha sido estudiada *in vivo* usando la respuesta de hipersensibilidad tipo IV o retardada y también *in vitro* usando el ensayo de migración de los macrófagos. La importancia de este tipo de hipersensibilidad se debe a que es mediada por la respuesta celular de los linfocitos citotóxicos y linfocitos liberadores de linfoquinas. Diffley *et al.* (1976), demostraron que la sensibilización intradérmica de animales de experimentación, como los cueros, con *N. fowleri* y con otras especies de *Naegleria*, indujeron reacciones cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardada cuando se retaron contra inyecciones intradermales con antígenos homólogos y heterólogos de *Naegleria*. Cursons *et al.*, (1980) midieron el papel de la IMC usando un ensayo *in vitro* de inhibición de macrófagos y uno *in vivo* de hipersensibilidad tipo IV. En el estudio *in vitro*, extractos solubles de *N. fowleri*, fueron adicionados a linfocitos de sangre periférica de cueros que fueron inmunizados con antígenos homólogos y heterólogos de *Naegleria*. Se usó medio condicionado (medio de cultivo que contiene productos secretados por las amibas en un tiempo determinado) recolectado de los cultivos de los linfocitos, para probar

la respuesta de los macrófagos. La migración de estos fue inducida con el factor de inhibición de la migración de los macrófagos (FIM) obtenido de los linfocitos sensibilizados con antígenos de *Naegleria*. Los autores sugieren que la exposición hacia los antígenos de *Naegleria* provoca la inmunidad mediada por células, aunque la exposición a los antígenos homólogos es más eficiente que la de los antígenos heterólogos en la inhibición de la migración de los macrófagos. Gracias a esto, se puede concluir que la inmunidad mediada por células no constituye tampoco una gran línea de defensa contra *N. fowleri*. Al igual que la inmunidad humoral, el papel de la inmunidad mediada por células contra la infección debida a esta amiba, permanece incierto.

1.2 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un protozoo de la clase *Rhizopoda* y del género *Entamoeba*, monocelular, parásito espontáneo exclusivo del hombre y de ciertos primates en cautiverio. *E. histolytica* es la causante de la enfermedad denominada amibiasis; esta enfermedad se ha conocido y descrito desde tiempos antiguos. Celso e Hipócrates la describen como una enfermedad ulcerativa intestinal, refiriéndose a la disentería y a diferentes variantes de esta patología, las relacionó con el consumo de agua en condiciones insalubres. Además también se ha hecho referencia de esta enfermedad en el Antiguo Testamento y en la Medicina Interna Clásica de Huang Ti (González Vázquez *et al.*, 2012).

Para 1875, el Dr. Fedor Aleksandrevitch Lösch publicó los resultados de las observaciones y experimentos que hizo en el caso de la disentería que padeció J. Markow, un campesino de 24 años de edad, al noroeste de Rusia. El enfermo presentaba la sintomatología de la disentería; tenía de 7 a 9 evacuaciones diarias, líquidas, dolor abdominal, tenesmo, fiebre, debilidad muscular y edema en miembros inferiores. Las evacuaciones eran de poco volumen, de color pardo rojizo, con grumos purulentos y mucosos. Su examen microscópico reveló presencia de abundantes formaciones celulares dotadas de movimiento propio, las cuales, inmediatamente fueron identificadas como amibas. Dicho paciente falleció en condiciones de anemia avanzada y agotamiento total. La necropsia registró

edema e hiperemia en la mucosa de la mitad posterior del íleon; y lesiones semejantes pero mucho más intensas, en el ciego, donde había una gruesa capa mucosanguinolenta que cubría zonas engrosadas, con cicatrices y úlceras. El examen histopatológico de las lesiones reveló infiltración celular en la submucosa, con la presencia de amibas como las halladas antes en las heces, a las que denominó como *Amoeba coli* (Lösch, 1975). No conforme, reprodujo la enfermedad en perros, con la que pudo concluir que, cuando estos parásitos se multiplicaban en el intestino, provocaban una intensa inflamación que podía llegar a la desintegración del tejido afectado (Campos Peralta *et al.*, 2011).

En México, los primeros relatos se remontan a 1611, cuando fray García Guerra, Arzobispo de México y Virrey de la Nueva España, falleció al poco tiempo después de llegar a México, debido a que presentó un cuadro caracterizado por fiebre y dolor en el área hepática; que fue descrito por el médico azteca, Martín de la Cruz (Fournier Villada, 1956).

1.2.2 Biología de *E. histolytica*

E. histolytica adopta dos formas importantes en su ciclo biológico, desde el punto de vista médico, la forma de resistencia y la invasiva, que morfológicamente corresponden a los quistes y a los trofozoítos respectivamente. Los quistes son estructuras unicelulares redondeadas u ovoides, generalmente tetranucleadas, que miden de 3.5 a 25 μm de diámetro, rodeadas por una gruesa capa de quitina. La membrana nuclear es delicada y muestra condensaciones de cromatina agregadas a la superficie interna. Los trofozoítos son células móviles, de 6 a 40 μm de diámetro, con un exoplasma que forma pseudópodos y contiene pocos organelos. Es característico de *E. histolytica* que no posea mitocondrias, ni retículo endoplásmico ni aparato de Golgi; los ribosomas se encuentran dispersos o formando pequeños grupos en el citoplasma. *E. histolytica* se multiplica por división binaria. La transformación de quiste a trofozoíto se hace después de la digestión de la cápsula de quitina y por fragmentación del citoplasma tantas veces como el número de núcleos; estas pequeñas amibas (metaquistes) aumentan de tamaño hasta convertirse en trofozoítos, los que a su vez, después de varias

divisiones, baja su motilidad, se redondean y disminuyen de tamaño (prequistes), secretan la cápsula y después de 2 a 3 divisiones del núcleo, queda formado el quiste (Fig. 4). Esta transformación solo ocurre *in vivo*, en la luz intestinal; es muy difícil observarla *in vitro* y los quistes de *E. histolytica* nunca se han descrito en el seno de las lesiones amebianas.

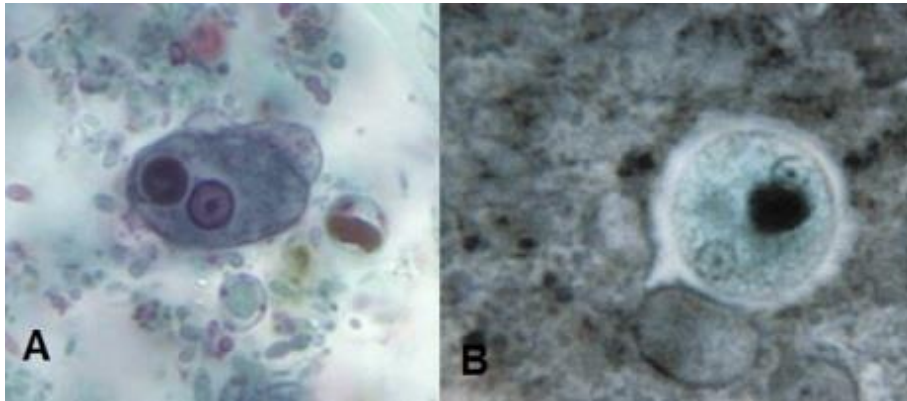


Fig. 4. *E. histolytica*. Trofozoíto (A) y quiste (B). Fetcher *et al.*, 2012; Stanley, 2003.

Mucho de la biología de *E. histolytica* se ha podido conocer gracias a la posibilidad de cultivar *in vitro* a sus trofozoítos en condiciones axénicas, logrado en 1961 por Louis Diamond. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las condiciones del cultivo axénico de los trofozoítos de *E. histolytica* son muy diferentes de las que el parásito encuentra en la luz del intestino y de otros tejidos, por lo que la extrapolación de datos obtenidos *in vitro* a las situaciones *in vivo* debe hacerse con mucha cautela. Dos de las características de los cultivos axénicos de trofozoítos que difieren de la *E. histolytica* invasora en los tejidos son: 1) la rareza de su transformación en quistes, y 2) la pérdida progresiva de su virulencia en cultivos prolongados. (Pérez Tamayo, 2006).

Debido a que *E. histolytica* solo infecta a los humanos y a los primates; el éxito para establecer un modelo animal reproducible de amebiasis es muy limitado. Esto debido a que ningún modelo animal puede imitar el ciclo completo de infección que ocurre en el padecimiento humano; pero muchos estudios llevados a cabo en animales de laboratorio normales, o genética o quirúrgicamente modificados, han

contribuido a una mejor comprensión de la patogénesis e inmunología de la lesión amibiana (Tsutsumi, y Shibayama, 2005).

1.2.3 Ciclo biológico y transmisión

E. histolytica pasa por 4 estadios con diferente morfología (quiste, metaquiste, trofozoíto y prequiste) y con distinta importancia médica. La forma infectante es el quiste tetranucleado, gracias a su capacidad para permanecer viable hasta 8 días en las heces, en agua, o en el suelo a temperatura ambiente, y durante más tiempo a 10 °C, así como para resistir la acción del jugo gástrico y de otras enzimas digestivas. La forma habitual de infección humana por esta amiba es la ingestión de quistes del parásito, que pueden venir en el agua o en los alimentos. Estos se contaminan por dos mecanismos principales: 1) manejo por sujetos portadores de *E. histolytica* con hábitos higiénicos deficientes, y 2) por agua contaminada por fertilizantes fecales o por fecalismo al aire libre, en ambos casos, por saneamiento ambiental inadecuado o inexistente (Fig. 5). Experimentalmente se ha demostrado que la infección humana por este protozoo requiere de la ingestión de 2000 a 4000 quistes, y los parásitos empiezan a aparecer en las heces del sujeto infectado en un lapso promedio de dos semanas, pero que varía entre dos días y dos meses, por razones no conocidas (Pérez Tamayo, 2006).

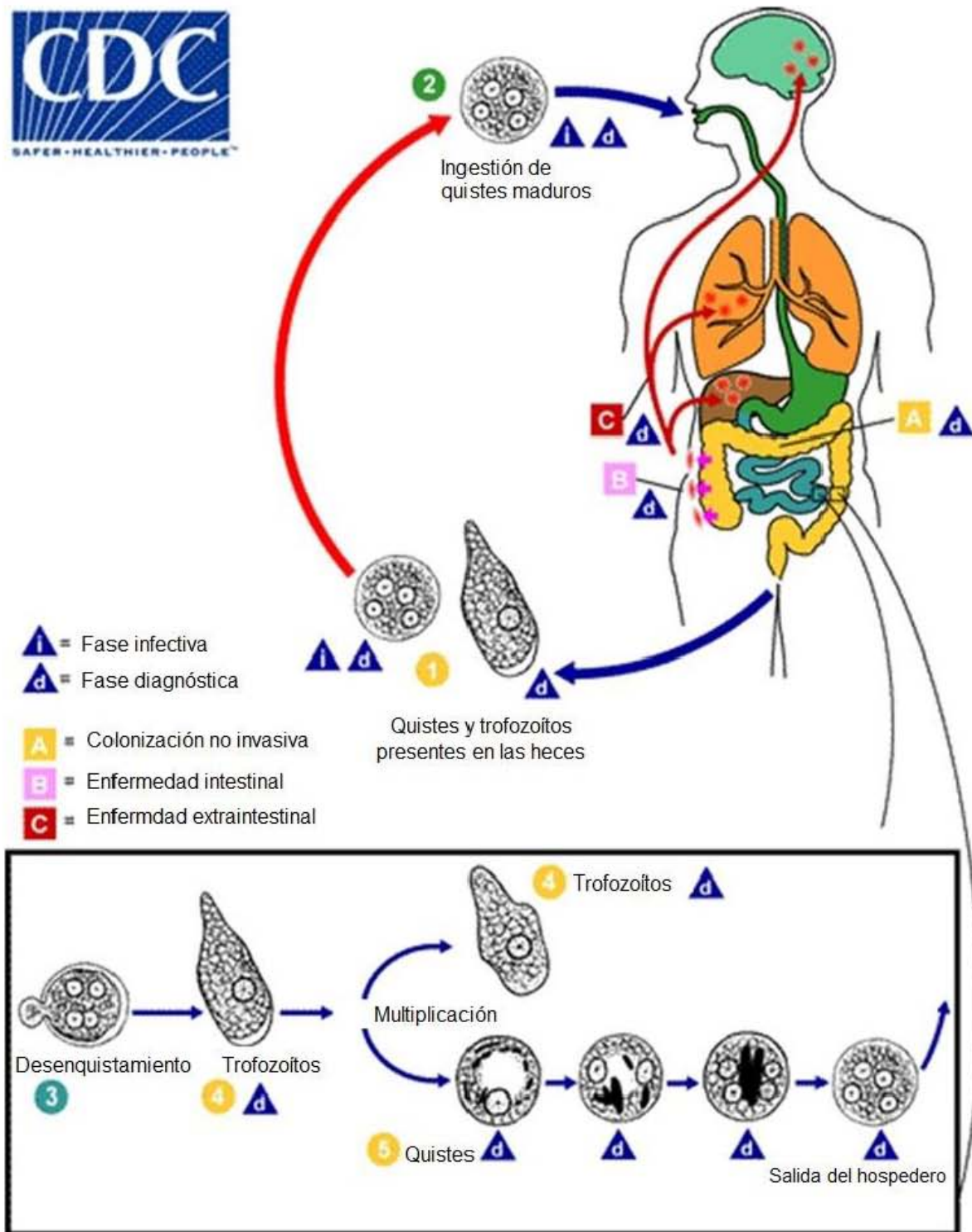


Fig. 5. Ciclo biológico de *E. histolytica*. Tomado del Centro para el Control y Prevención de enfermedades, 2014. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>

1.2.4 Epidemiología

E. histolytica es endémica en áreas tropicales de México, Centro y Sudamérica, Asia, África, y las islas del Pacífico, donde su transmisión ocurre vía oral por ingestión de comida y agua contaminada con quistes de la amiba. La amibiasis es más frecuente en regiones tropicales, climas cálidos y templados, pero más aún en áreas pobres y mal saneadas donde priva el hacinamiento y el mal manejo de aguas y de excretas. De hecho se ha reportado que afecta del 10 al 20 por ciento de la población mundial y alcanza prevalencias de 30 y hasta 55 por ciento en regiones tropicales y subtropicales mal saneadas. *E. histolytica* también es común en partes de Asia y Australia en donde la transmisión puede ser por relaciones homosexuales. Las infecciones por *E. histolytica* pueden extenderse más allá de las regiones donde es endémica, ya que es la tercera causa de diarrea crónica en viajeros. A la fecha se sigue considerando como la tercera parasitosis causante de muerte en el mundo, sólo después del paludismo y la esquistosomiasis, con un rango de 40 a 110 mil muertes. Estimar la morbilidad mundial de la amibiasis es complicado debido a las capacidades limitadas de diagnóstico y supervivencia en la mayoría de las áreas donde *E. histolytica* es endémica. Adicionalmente, hay una gran variabilidad en los periodos de incubación y de presentación de la enfermedad. Solo del 10 al 20% de las infecciones por la amiba resultan en enfermedad (Marie y Petri Jr., 2014). Los datos más recientes sobre la prevalencia de la infección en México, evaluados mediante un método molecular (PCR) muestran que existe una prevalencia de infección por *E. histolytica* de 13.8%, mientras que para la especie *Entamoeba dispar* (morfológicamente indistinguible de *E. histolytica*) es de 9.7%. Esto equivale a un total de 21% de la población infectada con *Entamoeba* (Ramos *et al.*, 2005).

1.2.5 Diagnóstico

La enfermedad amibiana intestinal es uno de los padecimientos infecciosos más sobrediagnosticados, no solo en México, sino en todo el mundo. El diagnóstico de amibiasis intestinal basado solo en las manifestaciones clínicas (diarrea o disentería) y la presencia de quistes de *E. histolytica* en las heces es totalmente

inadecuado. El diagnóstico de la enfermedad amibiana intestinal requiere de la conjunción de 4 elementos:

- 1.- Los signos y síntomas clínicos; que serán mencionados posteriormente en la patología de cada una de las tres formas de presentación del padecimiento.
- 2.- La identificación de trofozoítos (no de los quistes) de *E. histolytica* con eritrofagocitosis en las heces del paciente, en por lo menos 3 muestras clínicas.
- 3.- Demostración endoscópica de lesiones ulcerosas características en la mucosa intestinal, por parte de personal con experiencia.
- 4.- Serología antiamebiana positiva, sobre todo en pacientes con más de 7 días de evolución de los síntomas de enfermedad intestinal.

El diagnóstico diferencial debe hacerse con las demás causas de diarrea y disentería, incluida las bacterianas. En los casos del ameboma, el diagnóstico diferencial debe de hacerse con las neoplasias de colon. El pronóstico, en la mayoría de los casos de la enfermedad amibiana intestinal, es generalmente benigno, siempre y cuando el diagnóstico se haga correctamente y el tratamiento adecuado se inicie de inmediato; en esos casos, la curación se alcanza en unos cuantos días, no deja secuelas, pero no resulta en inmunidad (Wiser, 2011).

1.2.6 Tratamiento

Debe tenerse presente que la enfermedad amibiana es fácilmente previsible y que su profilaxis, depende de hábitos higiénicos sencillos y de medidas sanitarias elementales. El número de fármacos que han demostrado actividad contra *E. histolytica* es amplio y los esquemas en que éstos han sido utilizados son variados. El elemento común en la mayoría de ellos, con independencia del esquema empleado, es su alta eficacia. Estos fármacos, en mayor o menor grado, actúan contra los trofozoítos de *E. histolytica* y, en general, son incapaces de penetrar la pared de los quistes (Pérez Tamayo, 2006). En el tratamiento para infecciones asintomáticas se recomienda usar paromomicina o iodoquinol. Para la enfermedad sintomática intestinal y extraintestinal, los fármacos de elección son el metronidazol o el tinidazol, seguido de un tratamiento inmediato con paromomicina o iodoquinol (Gonzales *et al.*, 2012).

El metronidazol es un agente sintético antibacteriano y antiparasitario que se encuentra clasificado dentro de la clase de nitroimidazoles (Fig. 6).

El metronidazol es relativamente inactivo hasta que es metabolizado dentro de los organismos susceptibles; es activado cuando se reduce, postulándose que su mecanismo de acción es a través de la eliminación del potencial reductor de microorganismos anaerobios y microaerofílicos (Bendesky y Menéndez, 2001). En el parásito, el grupo nitro reactivo del metronidazol se reduce de manera monovalente principalmente por: 1) la ferredoxina reducida, originada por la descarboxilación del piruvato catalizada por la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) en la glucólisis; 2) la oxidasa EhNO_{1/2} y 3) la tiorredoxina reductasa. Esta reducción origina el intermediario radical libre nitro que posteriormente es reducido a nitrosoimidazol. Este último compuesto es capaz de formar aductos; los cuales son complejos unidos por enlaces covalentes, con el ácido desoxirribonucleico (DNA) y los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos y proteínas, lo cual causa citotoxicidad a los trofozoítos (Olivos-García *et al.*, 2011).

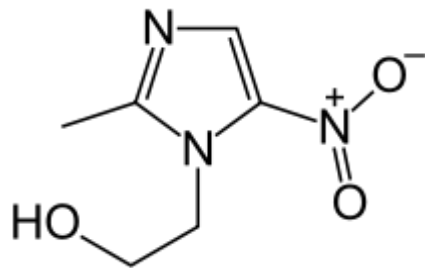


Fig. 6. Estructura química del Metronidazol. Tomado de Metronidazol: una visión integral (Bendesky y Menéndez, 2001).

1.2.7 Patología y patogenia

La amibiasis es una enfermedad infecciosa endémica causada por *E. histolytica*. Sin embargo, es útil distinguir entre la infección por la amiba y la enfermedad causada por ella. Estos dos tipos de relación hospedero-parásito pueden darse aislados o en combinación como sigue: 1) infección asintomática por *E. histolytica*, que termina por desaparecer; 2) infección asintomática por *E. histolytica* que finalmente desarrolla enfermedad amibiana; y 3) infección sintomática por la amiba, o sea enfermedad amibiana.

1.2.7.1 Patología

La enfermedad amibiana es primariamente un padecimiento intestinal; cuando se hace invasora extraintestinal, afecta principalmente al hígado, y solo en casos muy graves puede producir lesiones en otros órganos; como la piel, el pulmón, etc (Fig. 7). En el intestino afecta principalmente al colon, y puede producir 3 tipos de lesiones; 1) colitis ulcerosa, 2) megacolon tóxico y 3) ameboma. Otra lesión intestinal es la apendicitis amibiana. De estas cuatro formas de daño intestinal, la más frecuente (>90% de los casos) es la colitis ulcerosa, que afecta al ciego, al sigmoides y al recto, en ese orden de frecuencia. Se caracteriza por lesiones ulcerosas focales pequeñas (0.1 a 0.5 cm), redondeadas y elevadas sobre la mucosa, con centro necrótico rodeado por un anillo de tejido edematoso; el centro de la úlcera está cubierto de material mucoide amarillento (mezcla de tejido necrótico y fibrina) y la mucosa que separa las úlceras es de aspecto normal; ocasionalmente hay hemorragia. Otra forma de úlcera amibiana es de mayor tamaño (1.0 a 5.0 cm), irregular o serpiginosa, poco profunda y con bordes amplios elevados; el cráter de la úlcera está cubierto por fibrina y la mucosa intestinal no afectada, está congestiva y edematosa. Estos dos tipos de úlceras con frecuencia coexisten en el mismo intestino. El megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante es una forma muy rara y muy grave de colitis, que ocurre en sujetos desnutridos o de edad avanzada. Todo el colon está muy distendido y todo el espesor de la pared (mucosa, submucosa y capas musculares) está destruido, de modo que en algunos sitios solo queda el peritoneo; las perforaciones múltiples, con peritonitis aguda purulenta, pero las hemorragias son raras. El ameboma es también menos frecuente, ocurre en el ciego y en colon ascendente en forma de masa gigante (5 a 30 cm) nodular y firme de tejido que afecta la pared y que ocluye parcialmente la luz del intestino; la mucosa es muy delgada y muestra úlceras irregulares, mientras que el resto de la pared está muy engrosada y fibrosa. Las complicaciones más temibles de la amibiasis intestinal son la perforación, la diseminación hematológica y la extensión a la piel. El absceso hepático es la complicación extraintestinal más frecuente de la amibiasis y una de las más graves. El absceso hepático amibiano suele ser único y afectar

principalmente al lóbulo derecho, aunque en la autopsia con frecuencia es múltiple y se distribuye en todos los lóbulos del órgano. Su tamaño oscila entre puntiforme y muy grande (1-40 cm) y puede llegar a destruir más del 90% del hígado. Se presenta como un área bien delimitada en la que el parénquima hepático está reemplazado por una masa de material necrótico de color amarillento y de consistencia cremosa, rodeada de un anillo delgado de tejido hepático congestivo; el contenido del absceso puede ser solido o semilíquido, y solo es hemorrágico después de haber sido puncionado. Las principales complicaciones del absceso hepático amibiano son la rotura y la diseminación. La metástasis de la infección amibiana a otros órganos, como cerebro, bazo y huesos, son muy raras y casi nunca ocurren en ausencia del absceso.

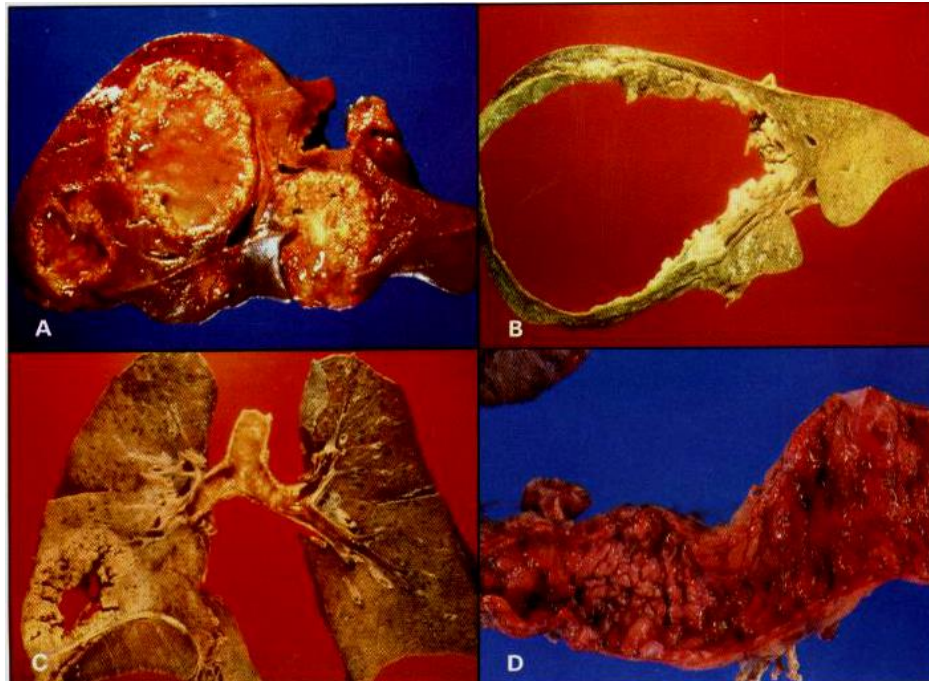


Fig. 7. Lesiones macroscópicas de amibiasis humana. A) y B) abscesos hepáticos amibianos, C) absceso pulmonar amibiano y D) megacolon tóxico. Para una descripción más detallada, consultar el texto (Pérez Tamayo, 2006).

1.2.7.2 Patogenia

Se han sugerido algunos factores moleculares por medio de los cuales *E. histolytica* pudiera causar daño celular, tisular o ambos:

- Lectinas (proteínas de superficie que reconocen carbohidratos). La adherencia de *E. histolytica* a las células del hospedero es mediada por actividad de una lectina que se expresa en la superficie de los trofozoítos. Esta lectina se une a la galactosa (Gal) o a la N-acetil-D-galactosamina (GalNac) con una gran afinidad. Además, la lectina Gal/GalNac puede estar involucrada en la resistencia a la lisis mediada por el complemento debido a su habilidad de unirse a las moléculas que componen al complemento. Debido a su potencial papel en la adherencia y virulencia, y desde que los IgA fecales anti-lectina protegen contra la colitis amibiana, la lectina Gal/GalNac es un candidato potencial para ser usado como vacuna. La Lectina Gal-Gal Nac es un heterodímero consistente de una cadena pesada de 170 kDa asociada a una cadena ligera de 31 o 35 kDa por medio de puentes disulfuro. Una subunidad intermedia de 150 kDa está asociada covalentemente con el heterodímero. La cadena pesada posee dominios transmembranales y un dominio de unión a carbohidratos (Fig. 8).

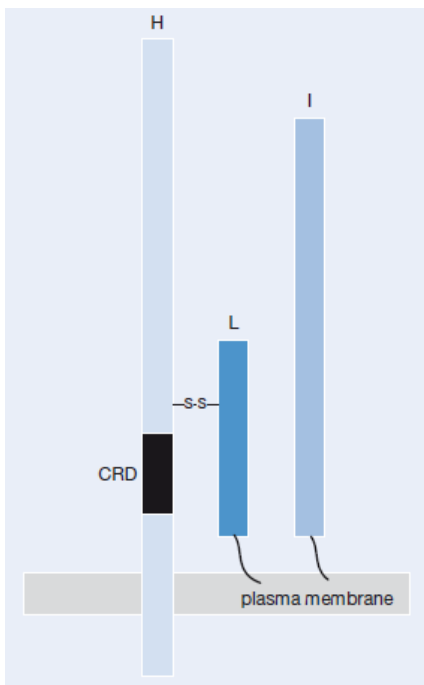


Fig. 8. Estructura propuesta de la lectina Gal-Gal Nac. Tomado de Protozoan and Human Disease (Wiser, 2010).

- Ameboporo. Una familia de polipéptidos precursores de formación de poro ha podido identificarse. Estos han sido designados como ameboporo A, B y C, de los cuales, el ameboporo A es el que se expresa en niveles mayores. El polipéptido maduro es una cadena de 77 aminoácidos y que forma dímeros a pH bajo. Tres de estos dímeros se arreglan en estructuras vacías en forma de anillos (Fig. 9). Este hexágono entonces puede intercalarse dentro de las membranas celulares, induciendo la formación de poros de 2 nm resultando en la muerte celular. El proceso de formación del poro es dependiente del arreglo de estos dímeros. El ameboporo está localizado en compartimientos vacuolares dentro del trofozoíto y es más activo a pH ácido, lo cual sugiere, que la principal función del ameboporo es el de lisar bacterias ingeridas por la ameba (Leippe y Herbst, 2004; Leippe *et al.*, 2005).

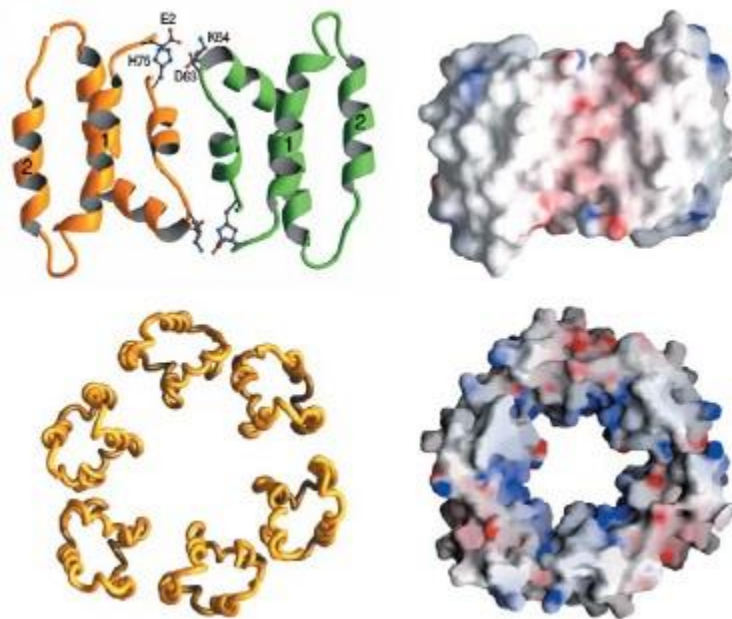


Fig. 9. Esquematización tridimensional del Ameboporo A de *E. histolytica* (Leippe, *et al.*, 2005).

- Proteasas: Las cisteín proteasas (CP's) son un tipo particular de proteasas. Al menos 20 diferentes genes de proteasas se han identificado en *E. histolytica*. Las proteasas CP1, CP2, y CP5 son las más expresadas en la

amiba (Wiser, 2010). La CP1 es una proteasa monomérica tiol dependiente que se localiza en la superficie celular. Su punto máximo de actividad es a pH = 4.4 con un peso de 27 kDa. Esta proteasa es capaz de digerir colágena tipo 1. La CP2 también está localizada en la superficie celular, además de que también puede encontrarse en las membranas internas de la amiba. Su rango de pH óptimo de actividad varía entre 5.5 a 9.5. Esta pesa de 26-29 kDa, y degrada proteoglicano cartilaginoso y colágena basal de los glomérulos renales. También se ha visto que puede despegar células de sus sustratos *in vitro* y se sugiere que pueden jugar un papel en la invasión tisular. La CP5 es una proteína soluble con un peso de 30 kDa y también se localiza en la superficie celular. Se ha confirmado que CP5 es capaz de degradar una extensa variedad de sustratos biológicos y sintéticos, como la mucina, fibrinógeno, colágena, hemoglobina, albúmina sérica bovina, gelatina, IgG, etc. Debido a esta capacidad, se ha sugerido que la CP5 tiene un papel potencial en la destrucción de tejido (Serrano-Luna, *et al.*, 2013).

1.2.8 Eritrofagocitosis

La fagocitosis es el proceso por el cual, las células internalizan partículas de hasta 0.5 μm en vacuolas por un mecanismo que requiere la polimerización de actina. Es un fenómeno complejo iniciado por la interacción de las superficies de las moléculas tanto de la célula ingerida como de la célula fagocítica (Rabinovitch, 1995).

En los organismos del orden de los metazoa, la fagocitosis además de estar implicada en la defensa contra agentes patógenos, e ingesta de algunos nutrientes, está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular con la eliminación de desechos celulares necróticos y apoptóticos. A diferencia de los metazoa, los protozoarios se valen de la fagocitosis como un mecanismo de internalización de nutrientes del medio exterior, pero tanto en organismos del grupo de los metazoa como en los protozoarios, la fagocitosis suele ser dividida en diversos pasos de acuerdo a los cambios bioquímicos y morfológicos que se presentan, los cuales son:

- 1) reconocimiento de partículas o células por la unión de ligando-receptor
- 2) la activación de diversas series de eventos, incluyendo vías de señalización y la reorganización del citoesqueleto que llevan a la extensión de pseudópodos
- 3) el cierre de los pseudópodos alrededor de la partícula formando el fagosoma, el cual se fusiona secuencialmente con endosomas tempranos o tardíos
- 4) la fusión del fagosoma con el lisosoma llevando a la digestión de la partícula internalizada.

Muchos trabajos realizados sobre este tema indican que la especificidad de las interacciones entre la partícula y los receptores de superficie activan vías de señalización que guiarán el destino de la partícula fagocitada y, por ende, la respuesta montada por la célula fagocítica (Mancilla Herrera, 2010). Uno de los factores de patogenicidad que presenta *E. histolytica*, es su gran capacidad fagocítica. La endocitosis de *E. histolytica* puede ser categorizada generalmente en: pinocitosis, la cual involucra el consumo de fluidos y de pequeñas macromoléculas; y la fagocitosis, la cual es la ingestión regulada de partículas más grandes, incluso de células enteras, como es el caso de los eritrocitos. La fagocitosis es un evento fuertemente regulado por receptores que depende de un número de componentes intracelulares de señalización y del citoesqueleto de actina, y podría estar mediado por una variedad de moléculas de adhesión diferentes. La adhesión es de vital importancia para la patogenicidad de *E. histolytica*. Se ha demostrado que las balsas lipídicas o rafts están involucradas en los procesos de adhesión y pinocitosis en *E. histolytica* (Laughlin, *et al.*, 2004). Ahora, las balsas lipídicas o rafts, son microdominios de membrana ricas en colesterol y esfingolípidos que están firmemente compactados, que sirven como plataformas donde las interacciones proteína-proteína o proteína-lípidos ocurren. Además de la adhesión, estos rafts o balsas lipídicas también tienen papeles en las vías de señalización regulando procesos como la motilidad, la secreción y la invasión. Estos rafts han podido ser identificados en una gran variedad de protozoarios parásitos incluyendo a *E. histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Leishmania*

spp., *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma* spp (Goldston *et al.*, 2012). Las proteínas guanosín trifosfatasa (GTPasas) están también involucradas en procesos celulares como la endocitosis, la secreción, el tráfico de vesículas, los eventos de fusiones de membranas, señalización intracelular y rearrreglo del citoesqueleto de actina. También, muchas proteínas Rab y GTPasas han demostrado su función en ambos procesos endocíticos de *E. histolytica*. La EhRabB se ha demostrado que se localiza en vesículas intracelulares y que se transloca en las bocas fagocíticas durante la eritrofagocitosis. El papel de la EhRab5 en la fagocitosis ha sido demostrada *in vitro* por varios autores, y se le ha atribuido la formación de vacuolas pre-fagosomales (Saito-Nakano, *et al.*, 2005). Las GTPasas de bajo peso molecular típicamente se han involucrado en la transducción de señales o en la organización del citoesqueleto de actina al igual que en la endocitosis. En otros eucariontes, las RacGTPasas son conocidas por ser potentes activadores de polimerización de actina a través de la interacción de proteínas como la treonina/serina cinasa p21 activada (PAK). En *E. histolytica*, EhRacA ha mostrado que regula la polimerización de actina, y al hacerlo, influye en la fagocitosis. Diversos estudios han demostrado la importancia de moléculas como la proteína cinasa C (PKC), la tirosín cinasa y la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3 cinasa) en la patogenicidad de *E. histolytica*. Se ha establecido desde hace tiempo que tanto la actina como la miosina son componentes estructurales importantes de las células eucariontes y son vitales en una gran variedad de procesos celulares, incluidos el tráfico de vesículas y la endocitosis. Diversos estudios han demostrado un mecanismo actina-dependiente en la eritrofagocitosis y en la pinocitosis; así como un aumento en ambos niveles; de polimerización de actina y la transcripción de actina tras el contacto con las células del hospedero (Laughlin y Temesvari, 2005). La proteína base de la actina, la miosina IB, también se ha demostrado que se localiza en las bocas fagocíticas de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis y alrededor de los fagosomas en maduración (Voigt *et al.*, 1999). Además de la adhesión del trofozoíto a las células del hospedero, en este caso, a los eritrocitos, para comenzar el proceso de eritrofagocitosis, *E. histolytica* produce la activación de factores apoptóticos en los eritrocitos e induce a su vez

que estos externalicen fosfatidilserina en su superficie y proceder a fagocitarlos (Boettner *et al.*, 2005). Estos autores, además proponen un modelo por etapas de la eritrofagocitosis de *E. histolytica*. Primero, la lectina Gal/GalNac es utilizada por la amiba para adherirse a los residuos terminales de galactosa de las células del hospedero. Una vez que las membranas celulares de ambas, están próximas, ocurre la secreción del ameboporo y de las cisteín proteasas para dañar a las células del hospedero, permitiendo el flujo de calcio dentro de las células para activar factores apoptóticos. Como resultado del daño directo, la fosfatidilserina es expresada en la superficie de los eritrocitos, donde los receptores del trofozoíto los puedan reconocer y unirse a ellos. Este reconocimiento estimula la maquinaria fagocítica produciendo la ingestión de los eritrocitos.

1.2.9 Respuesta Inmune del hospedero hacia la amibiasis Intestinal

E. histolytica es un parásito invasivo entérico que causa la amibiasis. Globalmente, esta enfermedad diarreica es la segunda causa de muerte, después de la neumonía en niños menores de 5 años, y es una de las 10 primeras causas de diarrea severa en los países en desarrollo. Actualmente, no hay una vacuna disponible para esta enfermedad, por lo que una comprensión de la respuesta inmunológica humana hacia el parásito podría intensificar la habilidad de desarrollar inmunoterapias efectivas (Bartelt *et al.*, 2013). El hospedero despliega una serie de defensas contra el parásito al tiempo que este invade el colon. La amiba, sin embargo, ha desarrollado estrategias complejas para evadir las defensas del hospedero y fomentar su propia sobrevivencia (Mondal *et al.*, 2012).

1.2.9.1 Inmunidad Innata

Los ácidos estomacales sirven como la primera línea importante de defensa en contra de los enteropatógenos así como la habilidad para matar microorganismos sensibles a los ácidos. Sin embargo, los quistes amibianos son altamente resistentes y sobreviven al pasaje a través del ambiente ácido del estómago. En el intestino, la siguiente capa de las defensas innatas podría ser la capa de moco, que se piensa que actúa como una barrera protectora, previniendo la invasión de *E. histolytica* hacia las células epiteliales del intestino (IECs). La mucina, el

componente mayoritario de la capa intestinal mucosa, es una glicoproteína secretada por las células caliciformes y las glándulas submucosas. Las glucoproteínas de la mucina se unen entre sí para inhibir la lectina Gal/GalNac de adherencia del parásito, previniendo *in vitro* la adherencia y muerte de las células (Chadee *et al.*, 1987). Los trofozoítos, sin embargo, pueden romper la capa de moco y la barrera intestinal mediante la secreción de cisteín proteasas (CPs) y glicosidasas para permitir la penetración de la mucosa del colon. Específicamente la cisteín proteasa 5 de *E. histolytica* (CP5) degradan la mucina-2 (MUC2) y las proteínas de matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés) (Bansal *et al.*, 2009). El sistema de complemento es una barrera del sistema inmune no específico y que ejerce un papel protector en la diseminación hematogena del parásito. En este contexto, también participa en la patogénesis de la amibiasis. Algunos estudios han demostrado que los trofozoítos responden a esta defensa activando la vía clásica y alterna del complemento en la ausencia de anticuerpos anti-amibianos a través de la CP de 56 KDA (Reed *et al.*, 1986). Esta CP degrada los componentes del complemento C3, C4, C5 y C9, evitando efectos fisiológicos de anafilotoxinas C3a y C5a, como: el incremento de la permeabilidad vascular, la contracción del músculo liso, la supresión de la proliferación de las células T, la liberación de histaminas e IL-1, y limita la quimiotaxis de neutrófilos.

Las IECs expuestas hacia los trofozoítos de *E. histolytica* secretan potentes quimiocinas, tales como la IL-8, resultando en un reclutamiento de las células inmunes y una infiltración del epitelio intestinal y de la lámina propia. (Yu *et al.*, 1997). Los neutrófilos son de las primeras células inmunes en responder a la invasión de la amiba. Son activados por el interferón γ (INF- γ), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), o por lipopolisacáridos (LPS); y llevan a cabo una función amebicida *in vitro* mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y péptidos antimicrobianos. (Guerrant *et al.*, 1981). No obstante, se ha demostrado que la amiba interfiere con su actividad, interrumpiendo las actividades de NADPH oxidasa y resistiendo; a través de la peroxirredoxina de 29 kDa, el estrés oxidativo (Arbo, *et al.*, 1990). Se ha demostrado también que *E. histolytica* puede inducir la apoptosis de los neutrófilos (Bruchhaus, *et al.*, 1997).

Los macrófagos también juegan un papel crucial en la respuesta inmune del hospedero en contra de la amibiasis intestinal. Estas células, se vuelven amebicidas después de su estimulación con INF- γ o con TNF- α (Ghadirian *et al.* 1992). Se sabe que muchos antígenos amibianos son capaces de activar estas células por vía de patrones de reconocimiento de receptores. La expresión de los receptores tipo Toll-2 (TLR-2) en los macrófagos está sobre regulada cuando se exponen hacia la lectina Gal/GalNac de *E. histolytica*, desencadenando la producción de citosinas pro-inflamatorias mediante la vía de activación del NF- κ B (Kammanadiminti *et al.* 2004). La actividad amebicida de los macrófagos es la producción de óxido nítrico (ON) derivado de la L-arginina, mediante la enzima óxido nítrico sintetasa (Seydel *et al.*, 2000). El ON ha demostrado ser un importante mediador de la citotoxicidad de los macrófagos, capaz de inhibir las CPs y la alcohol deshidrogenasa 2 del parásito (Maldonado-Bernal *et al.*, 2005). La modulación de esta respuesta, por parte de la amiba, ha sido suprimir el estallido respiratorio y disminuir los niveles de ON, TNF- γ , e IFN- γ . (Siman-Tov *et al.*, 2003). Los mecanismos y moléculas amibianas que participan en esta modulación se conocen solo parcialmente. Se ha sugerido que son inmunorreguladores amibianos, como una supuesta arginasa expresada por *E. histolytica*, proteínas similares a la prostaglandina E2 (Dey *et al.*, 2003) y un factor inhibidor de la migración de macrófagos.

1.2.9.2 Inmunidad adaptativa

El interferón gama (INF- γ) mediado por células parece proveer protección contra la amibiasis debido a su habilidad de activar a los neutrófilos y macrófagos para eliminar al parásito. En un estudio prospectivo con células mononucleares de sangre periférica de infantes, dichas células, fueron estimuladas con extractos solubles amibianos, para poder medir los niveles de INF- γ producidos. Los niños con una producción alta de INF- γ tuvieron una disminución significativa en la incidencia de diarrea por *E. histolytica* (Haque *et al.*, 2007). Este resultado se ha podido respaldar con estudios de vacunación en roedores, que muestran que la inducción por vacunación de la protección hacia la infección contra *E. histolytica*

puede ser transferida pasivamente hacia animales neo-natos mediante la producción de INF- γ por las células T (Guo *et al.*, 2009).

1.3 Microscopia electrónica de transmisión (MET)

El microscopio electrónico de transmisión, fue desarrollado por Ernst Ruska y colaboradores entre 1930 y 1933 (Ruska, 1986). La MET originalmente fue desarrollada como una herramienta de observación para materiales inorgánicos a aproximadamente una resolución de 1000 veces mejor de la que se podría observar en la microscopía de luz. En comparación con la microscopía óptica, existen varias diferencias. La primera de ellas es la fuente de energía, la cual en la MET son los electrones, en lugar de ondas de luz o fotones, y estos electrones son capaces de pasar a través de los especímenes y así se nos permite su visualización. Para poder hacer que el haz de electrones se pueda dirigir a la muestra, es necesario tener un alto vacío porque a diferencia de las ondas de luz, los electrones en el aire pueden ser fácilmente deflactados al punto de ser totalmente inservibles. En segunda, al momento de incidir el haz de electrones en la muestra, esos electrones deben de ser acelerados a una gran velocidad o voltaje en el rango de los kilo volts. Una vez que es alcanzado este parámetro, la temperatura de la interacción de los electrones con la muestra, alcanzará un valor muy alto. Para evitar que la muestra se dañe, debe de ser embebida en un medio tal que le pueda proveer de un soporte rígido y de la capacidad de obtener cortes más delgados. Los medios idóneos para su uso son las resinas epóxicas. Su elección se basa en la capacidad de unión de la densidad del tejido o muestra y de la densidad del plástico.

Ya que el tejido está óptimamente montado en un medio apropiado, es posible observar su ultraestructura. Por lo tanto otro punto importante a considerar es la fijación del tejido o muestra usando glutaraldehído, puesto que proporciona una gran capacidad de preservación de las proteínas intracelulares. Ahora, para poder visualizar las estructuras, es necesario que la muestra sea capaz de absorber o deflactar los electrones. Esto requiere que las tinciones sean realizadas con metales pesados, permitiendo que los electrones pasen por las secciones de la

muestra o que sean deflectados o absorbidos por los metales pesados. Las tinciones más comúnmente utilizadas contienen sales de metales pesados, como el plomo y el uranio. El acetato de uranilo y el citrato de plomo son los reactivos comúnmente usados. El tetraóxido de osmio (OsO_4) es un fijador extremadamente reductor, pero al ser un metal pesado, tiene capacidad de contrastar. La combinación y reacciones entre el osmio, el uranilo y el plomo conduce a un contraste mucho mejor de la muestra. Estos contrastes generalmente se realizan secuencialmente con acetato de uranilo por 15 minutos en primer lugar, seguido de citrato de plomo de 2 a 5 minutos con lavados de agua destilada entre cada reactivo (Gordon, R.E., 2014).

1.3.1 Instrumentación del MET

La instrumentación de este microscopio se puede resumir en 4 sistemas principales (Fig. 10):

- La fuente de electrones.
- Un sistema de lentes electromagnéticas.
- Soporte de muestra
- Sistema de imagen.

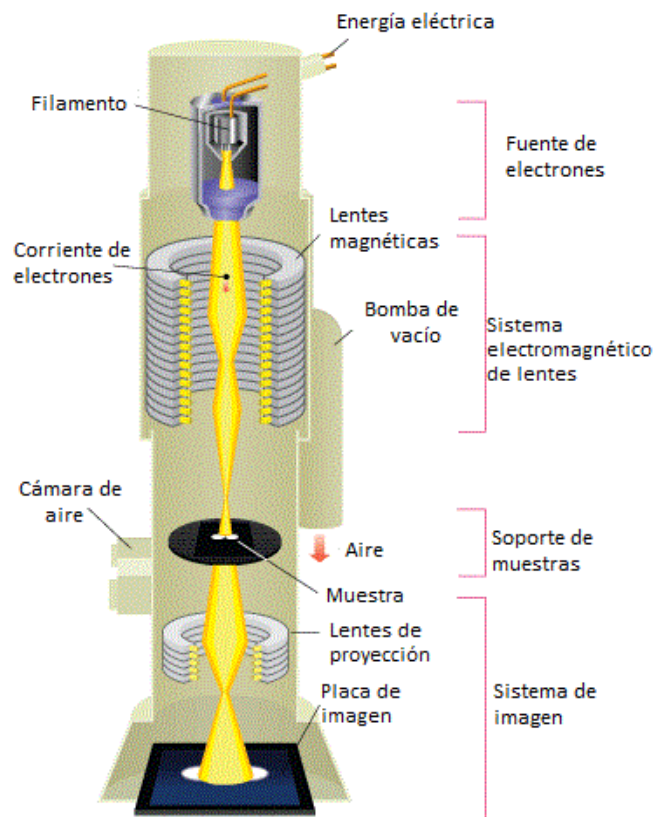


Fig. 10. Esquema general del microscopio electrónico de transmisión. Tomado de Basic Principle of Transmission Electron Microscopy. n.d.

1.3.2 Ventajas y desventajas del MET

Una de las principales ventajas que ofrece este tipo de microscopía es la capacidad de resolución que se puede obtener. Esta técnica de microscopía tiene una capacidad de resolución con la que se obtienen más detalles que en la microscopía óptica convencional, debido a que el haz de electrones posee una longitud de onda mucho más corta que la de la luz visible que es requerida en la microscopía óptica. Su límite de resolución puede llegar a los 0.2 nm. Otra de las ventajas que presenta es la capacidad de aumento de las imágenes que se pueden obtener; esto debido al “poder” que tienen las lentes electromagnéticas, especialmente, el objetivo magnético. Esta capacidad es posible, debido al alto voltaje aplicado al objetivo electromagnético. Por eso, una de las mayores aplicaciones de la MET en las ciencias biológicas, es el estudio de los detalles intracelulares de las células, y una de las principales ventajas, por ejemplo, es que las proteínas u otras moléculas, pueden ser visualizadas en las secciones procesadas mediante la aplicación de anticuerpos conjugados con partículas de oro.

Ya que se enumeraron las ventajas de esta técnica, también se deben de tener en cuenta las principales desventajas al momento de trabajar con este sistema. Primero, no es posible observar especímenes vivos debido a que todo el sistema debe estar en un ambiente de vacío para poder generar la imagen a observar. También, las micrografías obtenidas no pueden tenerse a color, solo en escala de grises o a blanco y negro. Otra desventaja concerniente a las micrografías generadas, es su formato en 2-D, esto se debe a que las muestras a procesar deben de ser extremadamente delgadas con el fin de que los electrones puedan penetrarlas, por lo tanto, no hay ningún “grosor” que pueda verse en 3D. Al momento de preparar las muestras, se debe de tener en cuenta el que se va a procesar, ya que para algunas se usan reactivos específicos, los cuales pueden introducir daños estructurales al espécimen, y al igual que considerar que las muestras deben ser muy delgadas. Otra desventaja, es que pueden producirse la aparición de artefactos durante el procesado de la muestra, para lo cual, al momento de interpretar las micrografías se requieren experiencia y práctica, en

adición al conocimiento utilizado para preparar las muestras; ya que los artefactos que se presentan en las micrografías generalmente se deben al proceso de preparación y no a la muestra en sí (Wilson y Basic, 2012).

1.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), es una de las técnicas más versátiles usada para investigación y desarrollo. Al mismo tiempo del desarrollo del MET, Max Knoll en 1935, tuvo la idea de desarrollar un microscopio capaz de poder trabajar con muestras compactas o gruesas, y demostró el principio básico para un dispositivo para generar imágenes mediante un barrido de electrones usando dos tubos de rayos catódicos. Posteriormente, Manfred von Ardenne en 1937, pudo perfeccionar este microscopio mediante la implementación de lentes electromagnéticas para enfocar el haz (Ardenne, M.v., 1937).

1.4.1 Principio del microscopio electrónico de barrido

El principio básico del MEB, está basado en el experimento de Knoll y de la instrumentación de von Ardenne. En un proceso similar a la del barrido del haz de electrones en un tubo de rayos catódicos (trc) el haz enfocado de electrones “barre” línea a línea la superficie de la muestra dentro de la columna del microscopio y transmite señales basadas en las interacciones entre la muestra y el haz, las cuales son detectadas electrónicamente y amplificadas por un equipo adecuado (Michler, 2008) (Fig. 11).

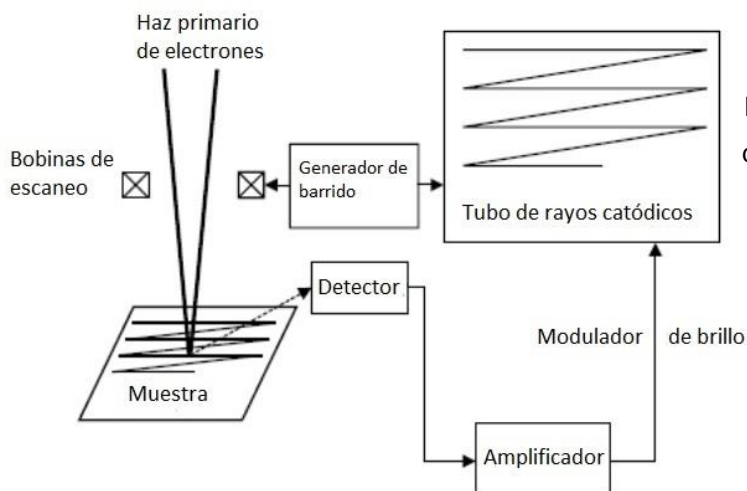


Fig. 11. Esquema del Principio del Microscopio Electrónico de Barrido. Tomado de Fundamental of Electron Optics and signal generation (Michler, 2008).

1.4.2 Instrumentación del MEB

La instrumentación de este microscopio se puede resumir en 5 sistemas principales (Fig. 12):

- La fuente de electrones.
- Sistema de lentes electromagnéticas
- Soporte de muestra
- Detector de electrones secundarios
- Sistema de imagen.

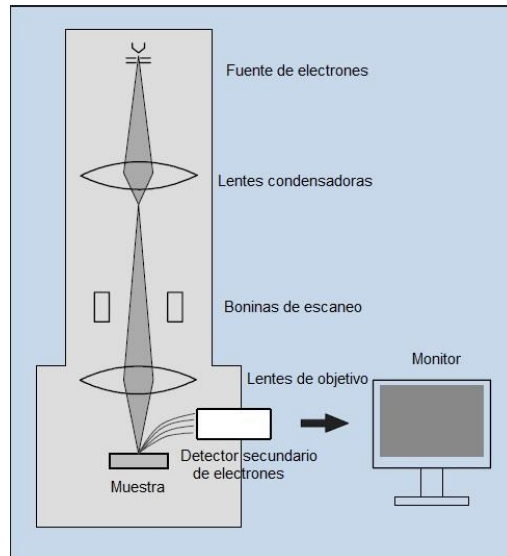


Fig. 12. Esquema General del Microscopio Electrónico de Transmisión. Tomado de Scanning Electron Microscopy A to Z (JEOL, 2009).

1.4.3 Ventajas y desventajas del MEB

Entre las principales ventajas que podemos tener al usar este sistema de microscopía se encuentra que debido a la capacidad de resolución que puede alcanzar, nos permite examinar detalladamente la morfología tridimensional de las células y tejidos. También podemos usarla para poder ver una gran variedad de muestras. Sin embargo, entre las desventajas que tenemos que para usar esta técnica, las muestras deben de ser sólidas y deben de tener un tamaño adecuado para poder ser introducidas en la cámara del microscopio. Otra desventaja es que, las muestras deben de ser capaces de conducir la electricidad, por lo que se

requiere un recubrimiento con metales pesados; generalmente oro coloidal, y este recubrimiento es costoso (El Abed, *et al.*, 2012).

1.5 Microscopía de fuerza atómica (MFA)

La microscopía de Fuerza Atómica fue desarrollada por Gerd Binnig, Calvin Quate y Christoph Gerber en la década de los 80 (Binnig *et al.*, 1986), en un principio para visualizar imágenes de materiales no conductores con resolución a nivel atómico. Cabe decir que fue tal la innovación, que en 1986, recibieron el Premio Nobel de Física, junto con Ernst Ruska, por esos trabajos.

Desde su desarrollo, se ha usado en múltiples disciplinas, como la física, la química, la farmacéutica, la clínica y por supuesto las ciencias biológicas. En un inicio se empezó a trabajar con biomoléculas, y posteriormente se pasó a tejidos, cristales e incluso células vivas, esto debido a su principal característica, que consiste en obtener imágenes con una resolución a nivel nanométrico (Colton *et al.*, 1997).

1.5.1 Instrumentación del MFA

Todos los microscopios de fuerza, tienen esencialmente cinco componentes:

- Una punta afilada montada en un muelle suave y elástico
- Una manera de sensar la desviación del muelle
- Un sistema de retroalimentación para supervisar y controlar la desviación (y fuerza de la interacción)
- Un sistema de barrido mecánico (normalmente un piezoeléctrico) que mueve la muestra con respecto a la punta a manera de rastreo
- Un sistema de despliegue que convierte los datos medidos en una imagen (Rugar y Hansma, 1990).

El haz láser es reflejado hacia la parte trasera del cantilever o sonda. El foto detector está dividido en cuatro cuadrantes, el cual tiene la oportunidad de medir simultáneamente la flexión y torsión del cantilever, correspondiendo a la fuerza normal y lateral de este. El posicionamiento de la muestra se controla usualmente con un dispositivo piezoeléctrico hecho normalmente de materiales cerámicos que

mueven la muestra relativamente en 3 dimensiones (x , y , z). La flexión del cantilever, la cual es medida por la interacción sonda-muestra, es a menudo determinada por un sistema óptico de deflexión. En el modo de contacto, la punta de la sonda y la muestra se encuentran en contacto y la punta es simplemente arrastrada a través de la superficie de la muestra, lo que nos da como resultado una imagen topográfica de la muestra. El escaneo es usualmente hecho bajo un sistema de retroalimentación donde la muestra se mueve cerca o lejos del cantilever, así la flexión del cantilever se mantiene constante (Fig. 13).

El movimiento de arrastre de la punta, combinado con fuerzas adhesivas o laterales, puede causar daños substanciales tanto a la muestra como a la punta. Para resolver esta dificultad, el modo de operación intermitente o Tapping es el que se puede utilizar. Para realizarlo, la punta puede empezar a oscilar cerca de la muestra y lentamente acercarse (Kirat, *et al.*, 2005).

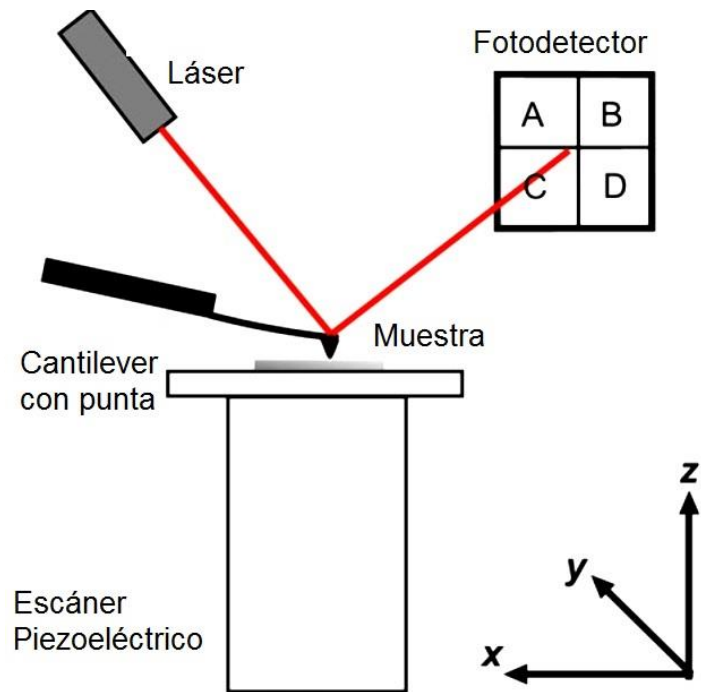


Fig. 13. Esquema de la Instrumentación del Microscopio de Fuerza Atómica. Tomado de Atomic Force Microscopy of Living Cells (Alsteens y Dûfrene, 2014).

1.5.2 Modos de operación en el MFA

Para la generación de imágenes con esta microscopía, se disponen de 3 modos de operación, que son los más utilizados; el modo de contacto, el modo de no contacto, y el modo intermitente o de Tapping.

1.5.2.1 Modo de contacto

El modo de contacto, también llamado el modo de fuerza constante, es el más directo de la MFA, en donde la punta se mantiene en contacto con la superficie de la muestra y la deflexión del cantilever se mantiene constante durante el escaneo (Fig. 14). El contraste de la imagen depende de la cantidad de fuerza aplicada, la cual de nuevo depende de la deflexión del cantilever (Ricci y Braga, 2004).

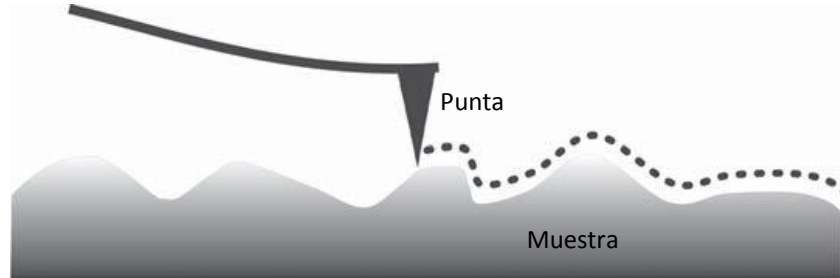


Fig. 14. Esquematación del Modo de Contacto. Tomado de Imaging Methods in Atomic Force Microscopy (Ricci y Braga, 2004).

1.5.2.2 Modo de no contacto

El cantilever oscila, y se aproxima un poco (pero sin tocar) a la superficie de la muestra. Este modo se basa en “sentir” a las fuerzas atrayentes de van der Waals que inducen un cambio de frecuencia en la rigidez del cantilever. En este modo, las imágenes se pueden generar, manteniendo una frecuencia constante de cambio mientras se está escaneando y este usualmente se realiza monitoreando la amplitud mediante la cual el cantilever oscila. La interacción entre la muestra y la punta es demasiado pequeña en este modo de operación, y por lo tanto, se puede alcanzar una buena resolución (Ricci y Braga, 2004).

1.5.2.3 Modo Intermitente o “Tapping”

El esquema general es similar al modo de no contacto, pero en este caso, durante la oscilación la punta es puesta en contacto con la superficie de la muestra; de modo que ocurre un amortiguamiento en la amplitud de oscilación del cantilever debido a las fuerzas repulsoras existentes en la superficie de la muestra (Ricci y Braga, 2004) (Fig. 15).

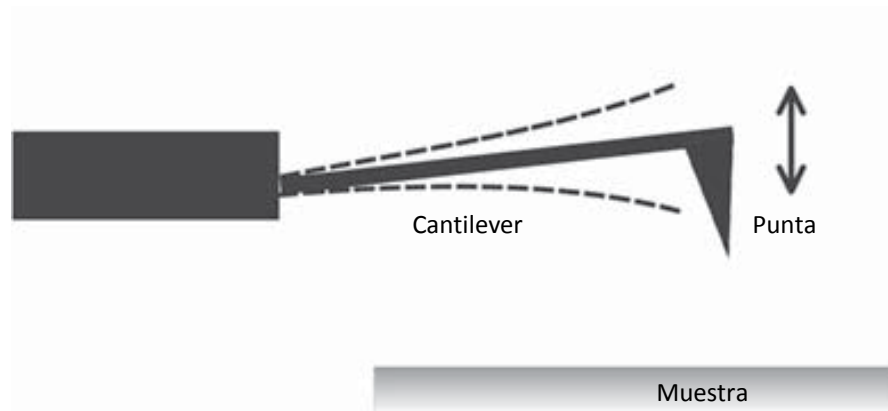


Fig. 15. Esquemización del Modo Intermitente o Tapping. Tomado de Imaging Methods in Atomic Force Microscopy (Ricci y Braga, 2004).

1.5.3 Preparación de muestras para MFA

Una de las metas principales cuando se usa este sistema de microscopía al momento de investigar procesos biológicos en tiempo real y bajo condiciones fisiológicas es el de montar la muestra apropiadamente mientras se evita su alteración y desnaturalización. Un método eficiente para inmovilizar células adherentes es aprovechar su habilidad natural de propagarse y/o adherirse a las superficies. Las células animales, pueden ser procesadas en superficies sólidas como el cristal. Algunos procariontes pueden ser fácilmente procesados sin ningún tratamiento químico previo. Cuando se trata con bacterias, la mayoría de ellas no se adhieren espontáneamente a las superficies; pero se han desarrollado métodos para resolver este problema. La elección dependerá del tipo de célula y de los objetivos de investigación, por ejemplo, las bacterias en forma de bastón son a menudo inmovilizadas en soportes pretratados con policaciones o retenidas mediante un anclaje a la superficie. (Alsteens y Dûfrene, 2014).

1.5.4 Ventajas y Desventajas del MFA

Las imágenes en MFA pueden mostrar información significativa acerca de las superficies con una claridad sin precedentes. El MFA puede examinar cualquier superficie lo suficientemente rígida tanto en aire, o si el espécimen se encuentra inmersa en un líquido. En adición a su superior resolución en comparación con los microscopios ópticos, el MFA tiene esa ventaja clave sobre los otros microscopios electrónicos. Comparado con el MEB, el MFA proporciona un contraste topográfico superior, en adición de que se pueden realizar mediciones directamente en la superficie, proporcionando datos cuantitativos.

Otra ventaja, es que la muestra no necesita ser eléctricamente conductiva, así que un recubrimiento metálico en la muestra no es requerido. Por lo tanto, tampoco se requiere una deshidratación de la muestra como en la microscopía de barrido, y así pueden ser procesadas en su ambiente hidratado (Ricci y Braga, 2004). Ahora, las principales desventajas que presenta esta microscopía, son varias. Una de ellas, comparada con el MEB es el tamaño de imagen. El MEB puede procesar un área de imagen de la orden de milímetros; en tanto que el de fuerza atómica solo puede hacerlo en la orden de los micrómetros. Otro inconveniente que presenta es que, para obtener una gran resolución, la calidad de la imagen está limitada por el radio de curvatura de la punta de la sonda, ya que una incorrecta elección de la punta para alguna resolución determinada, puede llevar a generar imágenes de artefactos. Otra de las desventajas es que en el MFA, no se puede escanear la muestra tan rápido como en el de barrido; lo que conlleva demasiados minutos para un escaneo típico, mientras que en barrido, este proceso es un poco más rápido (Kirat *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

La meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), es una encefalitis aguda que afecta al sistema nervioso central, y generalmente es fulminante. Usualmente el diagnóstico se realiza en casos *post mortem*, ya que no genera una sintomatología característica que la distinga de otras meningitis de diversas etiologías. Tomando en cuenta lo anterior, y conociendo que el bulbo olfatorio y la corteza orbitofrontal presentan necrosis y hemorragia, se pretende caracterizar el proceso eritrofagocítico en los trofozoítos de *N. fowleri*.

3. HIPÓTESIS

El proceso eritrofagocítico en *Entamoeba histolytica* en estudios *in vitro* e *in vivo* es altamente conocido. En el caso de *Naegleria fowleri* se desconoce el proceso de fagocitosis de eritrocitos y su papel en la fisiopatología en la meningoencefalitis amibiana primaria, una enfermedad altamente mortal para el humano.

4. OBJETIVO GENERAL

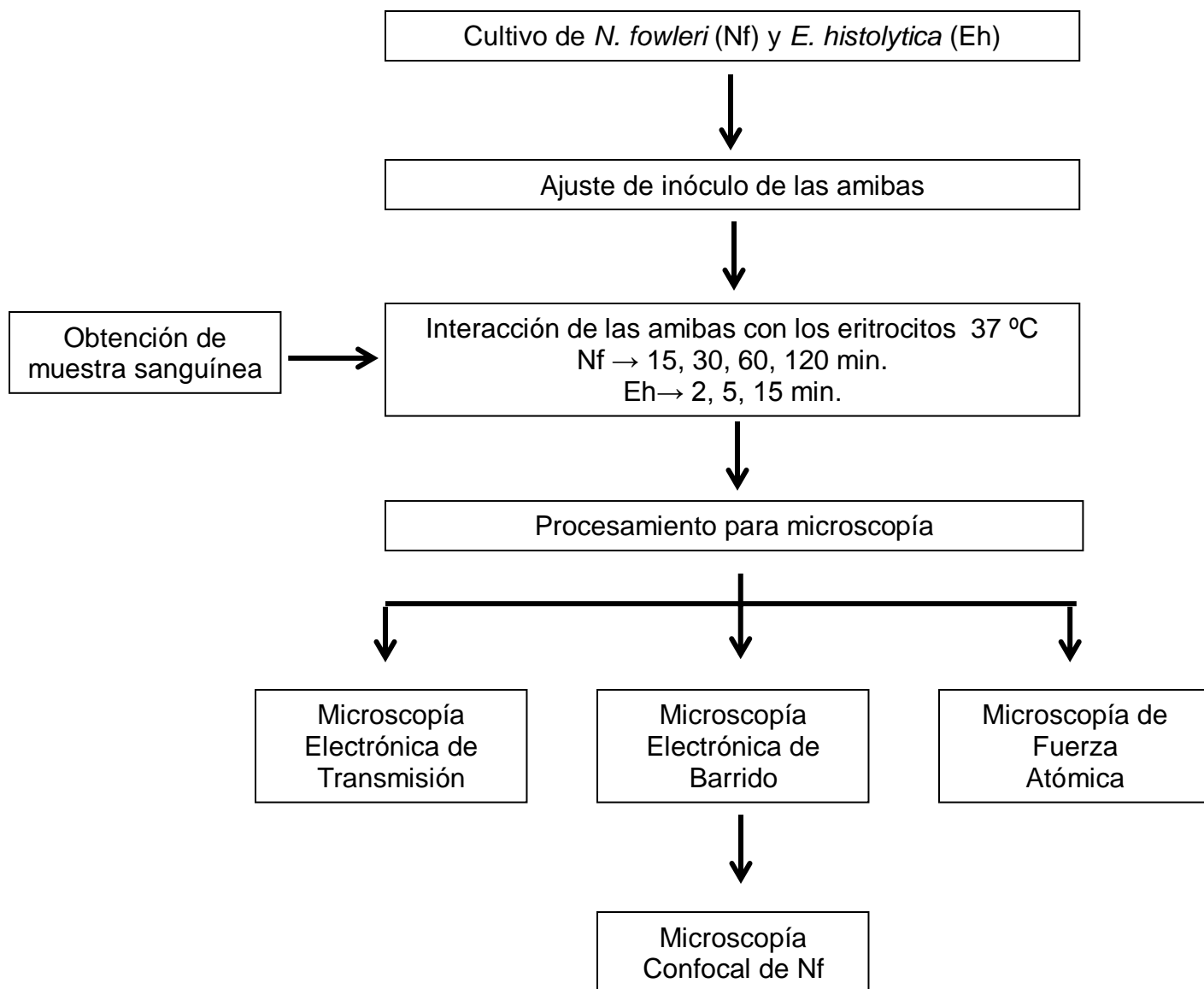
- Estudiar y caracterizar el fenómeno de eritrofagocitosis en trofozoítos de *Naegleria fowleri* por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía de fuerza atómica (MFA); para su posterior comparación con *Entamoeba histolytica*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer y realizar todo el proceso de preparación de muestras biológicas para la realización de las técnicas microscópicas anteriormente mencionadas.
- Realizar la técnica de interacción amibiana con eritrocitos humanos, previamente estandarizada, para la posterior caracterización microscópica.
- Comparar el proceso de eritrofagocitosis de *Entamoeba histolytica*, con el de *Naegleria fowleri*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diagrama General de Trabajo



5.2 Cultivo de las amibas

En todos los ensayos se utilizaron trofozoítos de *N. fowleri* (ATCC 30808 del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, E.E.U.U.) y de *E. histolytica* HM1-IMSS. Las cepas se cultivaron axénicamente en medio de Bactocasitona (BD-Difco, Sparks, Maryland, E.E.U.U.) al 2% suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Microlab, México, D.F.) al 10% para amibas de vida libre y medio de Diamond (Diamond *et al.*, 1978) suplementado con suero bovino adulto (SFA) (Microlab, México, D.F.) al 20% respectivamente para *E. histolytica*; a una temperatura de 37 °C. Para la expansión amibiana, las cepas se cultivaron en cajas de cultivo celular de 75 cm² (Corning Incorporated, Nueva York, E.E.U.U.). Posteriormente, se cosecharon los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento (48 h) en un baño de hielo durante 20 minutos. Se revisó y se observó que las amibas se despegaran en su totalidad. A continuación, se colocaron en tubos Falcon de 15 mL y se centrifugaron a 646 g por 5 minutos. Se utilizó una cámara de Neubauer para realizar el ajuste de amibas a 6×10^5 trofozoítos de *N. fowleri* y 2×10^5 de *E. histolytica*. Se ajustó el inóculo resultante en 1 mL de medio de Bactocasitona o Diamond dependiendo del tipo de amiba.

5.3 Interacciones de las amibas con eritrocitos

Para los ensayos de las interacciones se realizaron siguiendo las metodologías propuestas por Orozco, *et al.*, 1983; Tsutsumi *et al.*, 1992 y Herrera Verdugo, *et al.*, 1997.

Se obtuvo sangre venosa humana con EDTA como anticoagulante. Posteriormente la sangre se diluyó 1:50 con PBS pH= 7.2. Los inóculos correspondientes de las amibas se colocaron sobre cubreobjetos cortados en una placa de plástico Costar de 24 pozos con fondo plano (Corning Incorporated, Nueva York, E.E.U.U.). La placa se incubó 1 hora para facilitar la adherencia de las amibas en los cubreobjetos. Pasado este tiempo, se adicionaron 200 µl de sangre diluida 1:50 y se incubaron a 37 °C por los siguientes tiempos; 15, 30, 60 y

120 minutos para cuantificar el proceso eritrofagocítico en *N. fowleri*; y, 2, 5 y 15 minutos para *E. histolytica*. Pasado este tiempo, se procedió a fijar cada pozo con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Estas muestras se procesaron para MET, MEB y MFA.

5.4 Procesamiento de muestras para MET

Las interacciones de las amibas con los eritrocitos, se hicieron mediante la técnica de suspensión con agitación suave. Posteriormente se fijó con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M pH= 7.4., por 1 h. Después, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación constante con cacodilato de sodio 0.1M. Posteriormente, se post-fijó en OsO₄ al 2% en cacodilato de sodio 0.2M durante 1 h en agitación suave. Se hizo una segunda serie de lavados con cacodilato de sodio 0.1M. Las muestras se deshidrataron en un tren de alcohol a concentraciones crecientes (70%, 80%, 90%) y dos veces en alcohol al 100%, todos por intervalos de 10 minutos. Se agregó óxido de propileno a cada muestra para deshidratar 2 veces en un intervalo de 20 minutos. Se pre-incluyó con resina Epon y óxido de propileno 1:1 por 12 h; después se incluyeron las muestras en resina Epon a 60 °C por 24 h. Se hicieron cortes semifinos de 120-150 nm sobre portaobjetos y se tiñeron y contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Posteriormente se realizaron cortes finos de 50-120 nm que se observaron en un el Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM-910 (Carl-Zeiss, México, D.F.).

5.5 Procesamiento de muestras para MEB

Los cubreobjetos con las interacciones amiba/eritrocito se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M pH= 7.4., por 1 h. Después, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación constante con cacodilato de sodio 0.1M. Posteriormente, se post-fijó en OsO₄ al 2% en cacodilato de sodio 0.2M durante 1 h en agitación suave, esto se realizó en campana de extracción. Se hizo una segunda serie de lavados con cacodilato de

sodio 0.1M. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90%) y dos veces en alcohol al 100%, todos por intervalos de 10 minutos. Después, se introdujeron en el desecador de punto crítico (Samdri-975/Tousimis, Research Corporation, Rockville, E.E.U.U.) con un intervalo de 10-20 min. Las muestras fueron expuestas al punto crítico para retirar la mayor cantidad de etanol con CO₂ durante 4 minutos a 21 °C y 1200 psi. Posteriormente, se pasaron las muestras al aparato sombreador de metales (Denton Vacuum Desk V, Tousimis Research Corporation, Rockville, E.E.U.U.) para cubrirlas con oro durante 2 minutos a 25mA. Posteriormente se observaron con el microscopio electrónico de Barrido JEOL JSM-6510LV (JEOL U.S.A. Inc., Maryland, E.E.U.U.).

5.6 Procesamiento de las muestras para MFA

Los cubreobjetos con las interacciones se fijaron en cada pozo con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M pH= 7.4., por 1 h. Después, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación suave con cacodilato de sodio 0.1M. Posteriormente, se post-fijó en OsO₄ al 2% en cacodilato de sodio 0.2M durante 1 h en agitación constante. Se hizo una segunda serie de lavados con cacodilato de sodio 0.1M. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90%) y dos veces en alcohol al 100%, todos por intervalos de 10 minutos. Se realizaron dos cambios de óxido de propileno de 20 minutos cada uno. Se pre-incluyó con resina Epon y óxido de propileno 1:1 por 12 horas; después se procedió a incluir las muestras en resina Epon y se incubaron a 60 °C por 48 horas. Se realizaron cortes semifinos de 0.3 µm de espesor que se colocaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina. Posteriormente se analizaron con el Microscopio de Fuerza Atómica AutoProbe CP Research AFM (Thermomicroscopes Corporate, California, E.E.U.U.) a una frecuencia de barrido de 2 a 3 hertz, una fuerza de 10 nN y una ganancia de 0.5 unidades arbitrarias. Se usó una punta de silicio de 100 Å de radio de curvatura, montada en un cantilever de 0.6 µm, el microscopio fue operado con los actuadores piezoeléctricos disponibles, de desplazamiento horizontal de 100 µm, 10 µm y 5 µm.

5.7 Técnica histoquímica para visualización de Actina

Se realizaron interacciones de *N. fowleri* con eritrocitos en una relación 1:300 sobre cubreobjetos previamente silanizados por 15 y 30 minutos. Posteriormente las muestras se fijaron con paraformaldehído al 2% por 20 min. Después se permeabilizaron con 1 mL de tritón al 0.2% en PBS por 30 min y se hicieron 3 lavados con PBS pH= 7.2. Posteriormente se adicionó 50 µL de Faloidina Rodaminada (Invitrogen, México, D.F.) (1:150) por 40 minutos y se volvieron a lavar por triplicado con PBS. Después se añadió 1 mL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen, México, D.F.) al 2.5% por 5 min y se realizaron lavados con PBS por triplicado. Se montaron en un portaobjetos con 3 µL de resina Vecta Shield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Ca., E.E.U.U.). Posteriormente se observaron en el microscopio confocal Axio Imager Z.2 (Carl-Zeiss, México, D.F.).

6. RESULTADOS

Se procedió a caracterizar la interacción entre los trofozoítos de *N. fowleri* y *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+), así como los cambios morfológicos de ambas amibas; mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB), y microscopía de fuerza atómica (MFA).

6.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Con la microscopía electrónica de transmisión, fue posible observar ultraestructuralmente los cambios morfológicos de ambos protozoarios al momento de la eritrofagocitosis.

En el caso de *N. fowleri*, a los 30 minutos, se pudo observar que al inicio de la eritrofagocitosis; además se visualizaron los organelos típicos de esta amiba de vida libre, hay una zona electrondensa en la zona de contacto entre las membranas citoplasmáticas de la amiba y del eritrocito. También pudo apreciarse la deformación de la amiba para comenzar con la ingesta del eritrocito. (Fig. 16).

A los 60 minutos, se observó, además de las zonas electrondensas en el área de contacto entre el trofozoíto y el glóbulo rojo; y vacuolas con contenido fibrilar. También se pudo observar el proceso de trogocitosis al momento de fagocitar al eritrocito, así como el inicio de la degradación de los glóbulos rojos (Fig. 17).

Por último, al tiempo de 120 minutos, se pudieron apreciar varias etapas de digestión de eritrocitos, dentro de diferentes trofozoítos, así como el reacomodo de sus organelos para poder degradarlos (Fig. 18).

Con *E. histolytica*, a los 2 minutos, se pudo observar, la fagocitosis de los glóbulos rojos, además de la proyección de las bocas fagocíticas; y también, diversos eritrocitos en el interior de diversas vacuolas (Fig. 19).

En un tiempo de 5 minutos, se visualizaron múltiples eritrocitos fagocitados, tanto con su morfología conservada, como en diversas etapas de degradación y numerosas vacuolas con material fibrilar (Fig. 20).

Por último, se observó que a los 15 minutos; además del desplazamiento de sus organelos, la degradación de los eritrocitos en las vacuolas, además de contener eritrocitos simultáneamente intactos (Fig. 21).

6.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Con la microscopía electrónica de barrido, es posible observar los cambios morfológicos a nivel de superficie, tanto de los trofozoítos de *N. fowleri* como de *E. histolytica*, además de los eritrocitos en el momento de su interacción.

A los 15 minutos de interacción entre *N. fowleri* y los eritrocitos O Rh (+), se observó la formación de la boca fagocítica en la superficie del trofozoíto, al tiempo que está rodeado de glóbulos rojos. También se pudo observar la deformación de la morfología del eritrocito al tiempo que éste es fagocitado, además de la formación de placas de adhesión o lamelopodios (Fig. 22).

A los 60 y 120 minutos de interacción, *N. fowleri*, fue capaz de fagocitar varios eritrocitos simultáneamente, a pesar de su tamaño. También se pudieron observar el cierre de las bocas fagocíticas y la formación de placas de adhesión o lamelopodios (Fig. 23).

En *E. histolytica*, a los dos minutos, se visualizó la formación de varias bocas fagocíticas simultáneamente, además de la deformación del eritrocito, cuando el trofozoíto lo ingiere (Fig. 24).

A los 5 minutos de interacción, se pudo ver como los trofozoítos son rodeados por múltiples eritrocitos, además de la proyección de bocas fagocíticas para ingerirlos. También se puede observar la presencia de eritrocitos ya deformados que serán fagocitados posteriormente (Fig. 25).

Por último, a los 15 minutos de interacción, *E. histolytica* fue capaz de polarizar o de mostrar el fenómeno de “capping”, en un polo del trofozoíto y fagocitar múltiples eritrocitos. Se pudo apreciar, que conforme avanza el tiempo, el número de eritrocitos ingeridos aumenta (Fig. 26).

6.3 Microscopía confocal (MC) de *N. fowleri*

Debido a la presencia de placas de adhesión de *N. fowleri* al barrido, se procedió a realizar la técnica citoquímica de visualización de actina, mediante el uso de faloidina rodaminada y DAPI.

A los 15 y 30 minutos de interacción con eritrocitos y *N. fowleri*; se pudo visualizar la distribución de actina en los trofozoítos, además de que se observó una mayor concentración de actina en las placas de adhesión y en las bocas fagocíticas formadas por los protozoarios. Además de la presencia de actina en los trofozoítos, se pudo observar la localización del núcleo característico teñido con DAPI (Fig. 27 y 28).

Al parecer, no se observó ningún cambio apreciable en la actina presente en *N. fowleri*, conforme pasa el tiempo de interacción.

6.4 Microscopía de fuerza atómica (MFA)

La implementación de esta técnica de microscopía en el presente trabajo, se hizo, debido a sus ventajas, anteriormente explicadas, así como por su posible utilidad.

Se analizaron ambos protozoarios por este método, encontrándose diversas características, tanto de ultra estructura, como de su superficie.

A los 30 minutos de interacción de *N. fowleri* con los eritrocitos se pudo observar, que el trofozoíto contiene múltiples vacuolas, al igual que se apreció el contacto entre la superficie del trofozoíto junto con la del eritrocito (Fig. 29).

Al tiempo de 120 minutos, fue posible ver vacuolas con posible material fibrilar, que pudiera corresponder a eritrocitos ya degradados, así como la observación de la deformación del eritrocito que está siendo fagocitado (posiblemente por el mecanismo de trogocitosis), como la deformación de la membrana del trofozoíto (Fig. 30).

En el caso de *E. histolytica*, a los 15 minutos de interacción con eritrocitos, se observó una cantidad considerable de eritrocitos ya fagocitados en su interior, así

como vacuolas con material fibrilar, que posiblemente corresponde a eritrocitos en degradación. También se observaron cambios en la membrana de la amiba, así como deformación en la morfología del eritrocito, al tiempo que éste es fagocitado (Fig. 31).

Al tiempo de 120 min de interacción entre la amiba y los eritrocitos, se pudo observar una gran cantidad de vacuolas con posible material fibrilar, que podría corresponder a eritrocitos ya degradados por la amiba, así como la internalización de un eritrocito, al tiempo que este es deformado; al igual que los cambios que presenta la membrana del parásito (Fig. 32).

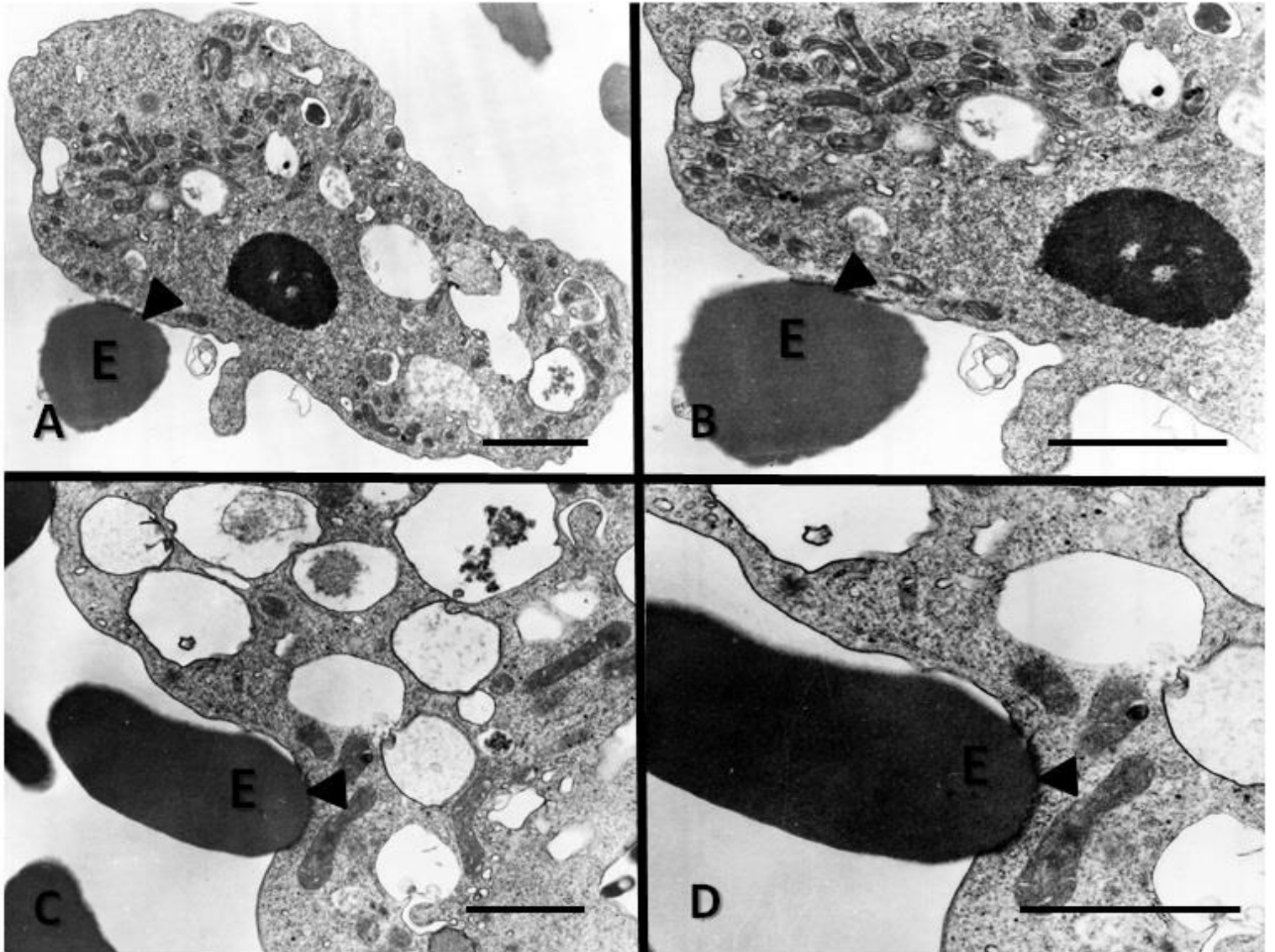


Fig. 16. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía electrónica de transmisión. A) y C). Se observa la interacción entre el trofozoíto (Nf) y el eritrocito (E), por medio de sus membranas citoplasmáticas (cabeza de flecha). Se puede observar en todas las micrografías una zona electrodensa en la zona de contacto. B) y D). Aumentos. Barra = 2 μ m.

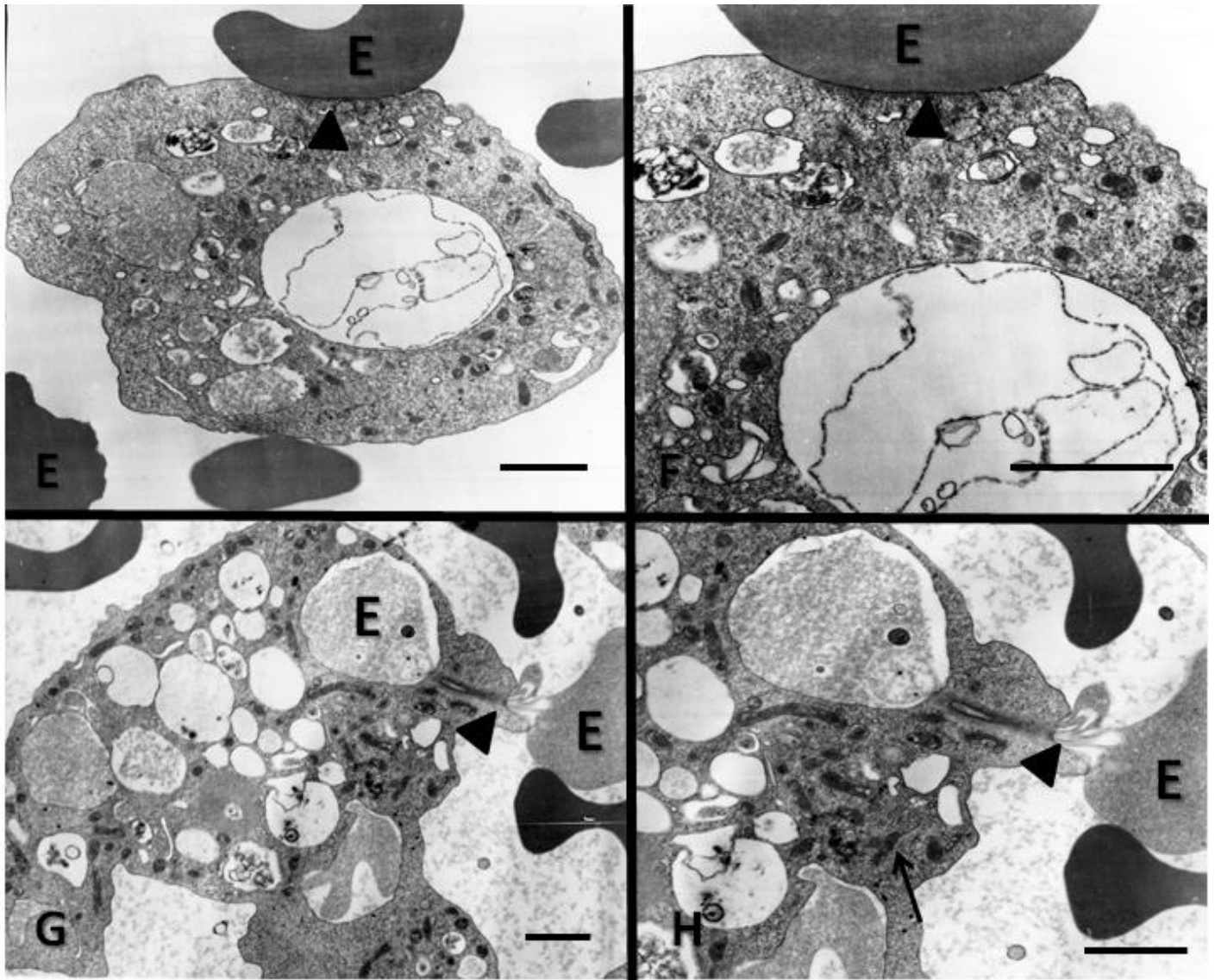


Fig. 17. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 60 minutos. Microscopía electrónica de transmisión. E) y F). Se observa la interacción del trofozoíto (Nf) y del eritrocito (E), a través de sus membranas citoplasmáticas (cabeza de flecha). Se puede visualizar una zona electrodensa en el área de contacto. G) y H). Se puede observar el fenómeno de trogocitosis de un eritrocito, al mismo tiempo que la degradación de vacuolas fagocíticas. Barra = 2 μ m.

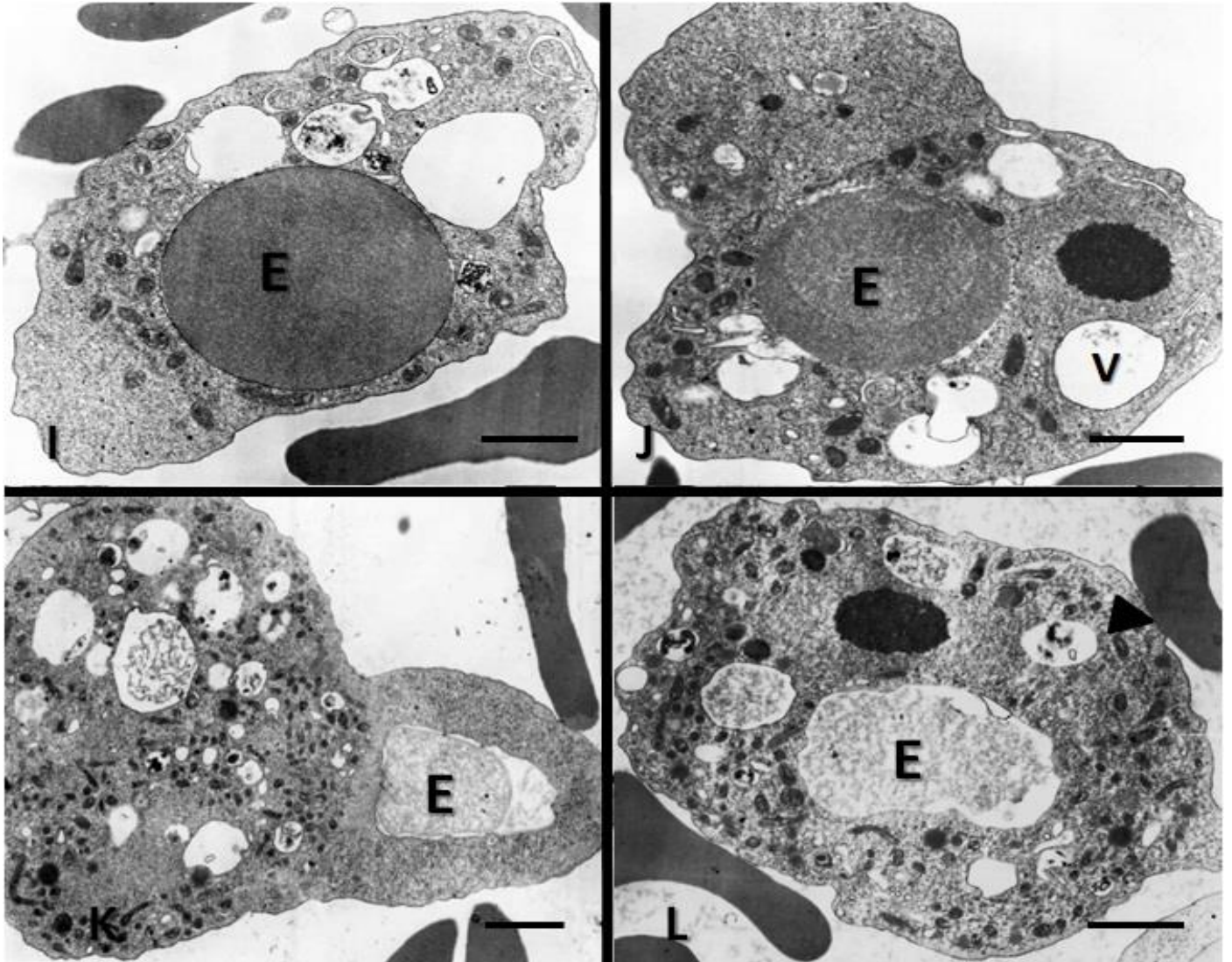


Fig. 18. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 120 minutos. Microscopía electrónica de transmisión. I) Se observa un eritrocito (E) en el interior del trofozoíto (Nf), al igual que varias vacuolas. J) Se puede ver como se comienzan a degradar al eritrocito en el interior del trofozoíto. K) Se puede observar una boca fagocítica con un eritrocito en su interior, y que al mismo tiempo comienza a degradarlo. L) Se observa un eritrocito ya degradado en el interior de la amiba. Barra = 2 μ m.

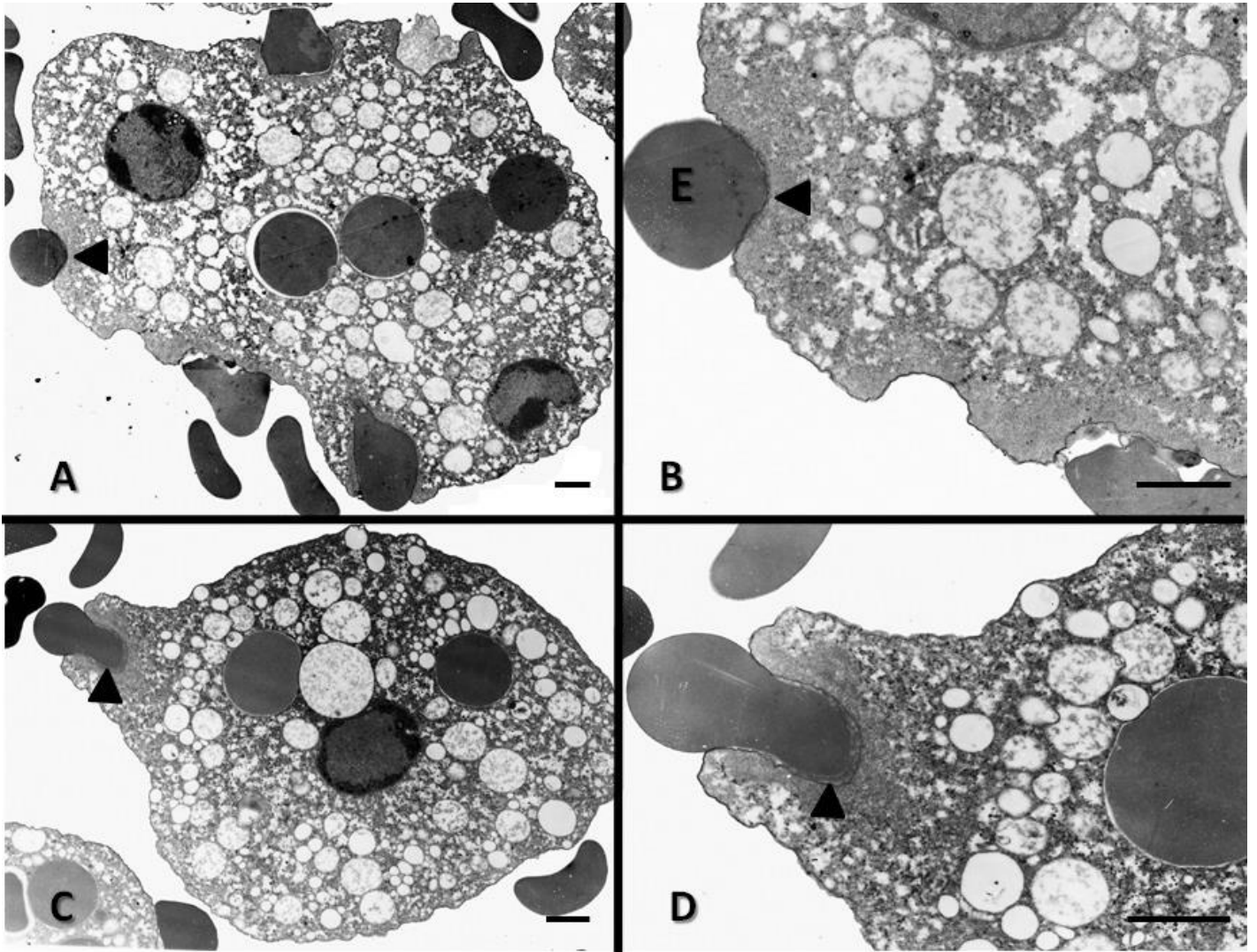


Fig. 19. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 2 minutos por microscopía electrónica de transmisión. A) y B). Se puede apreciar el inicio de la ingestión del eritrocito por el trofozoíto (Eh), al igual que una zona electrodensa en el área de contacto de ambas células. C) y D). Se puede observar como el eritrocito comienza a deformarse al momento de comenzar a ser digerido por la amiba. Barra = 2 μ m.

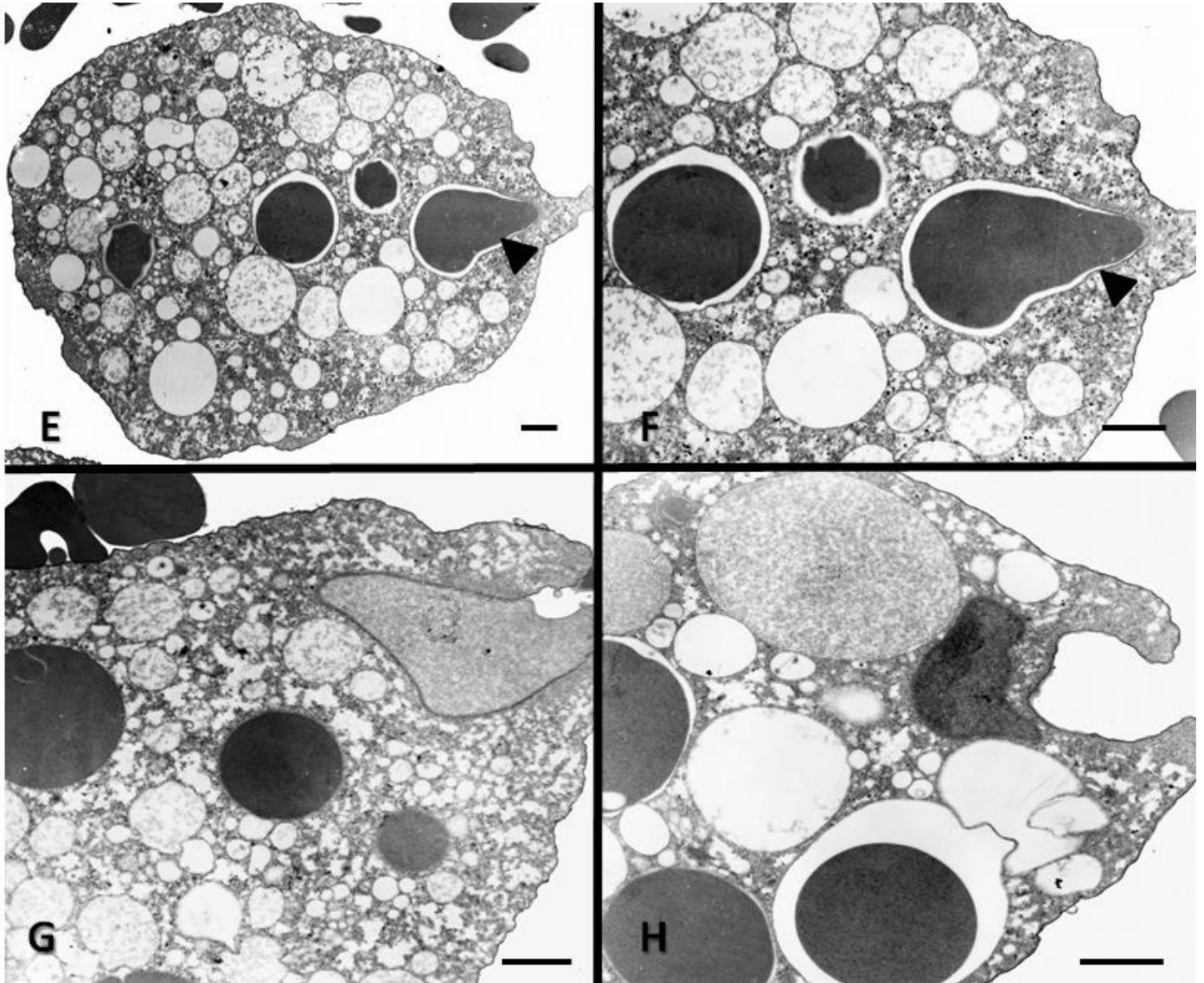


Fig. 20. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 5 minutos. Microscopía electrónica de transmisión. E) y F). Se observa un trofozoíto (Eh) con varios eritrocitos ingeridos, así como múltiples vacuolas. G) y H). Se pueden observar diversos eritrocitos internalizados, así como en diversos grados de degradación. Barra = 2 μ m.

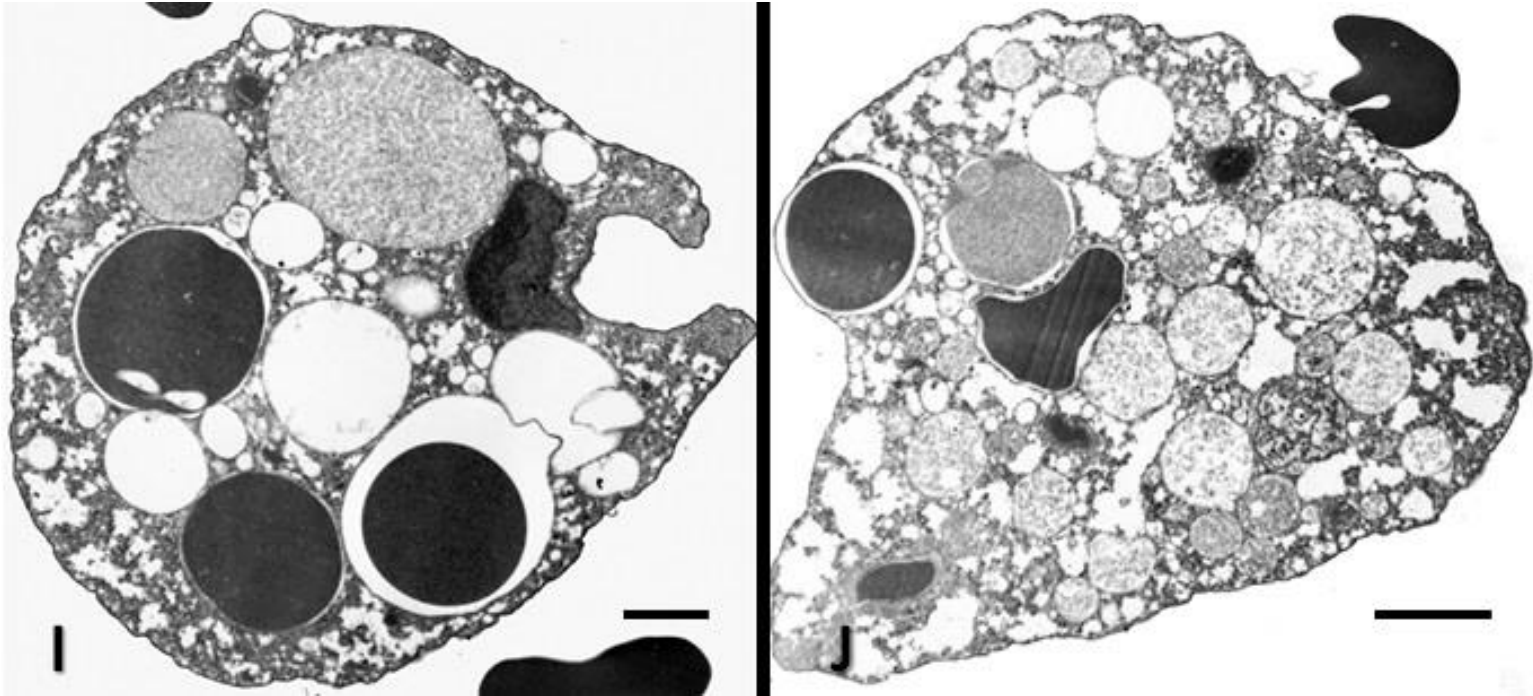


Fig. 21. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía electrónica de transmisión. I) y J). Se pueden observar múltiples eritrocitos en diversos estados; tanto enteros como en degradación; así como un gran número de vacuolas en el interior de los trofozoítos (Eh). Barra = 2 μ m.

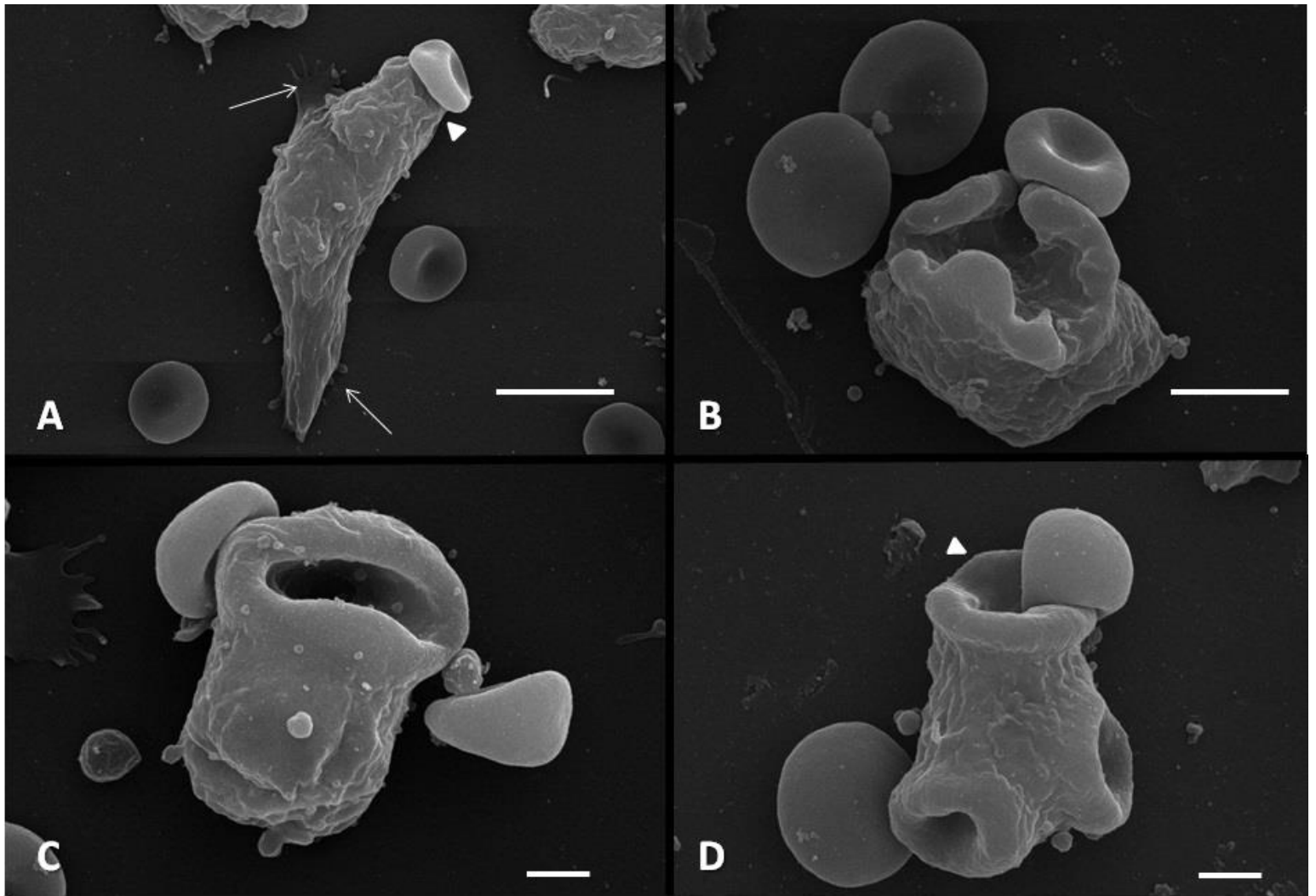


Fig. 22. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía electrónica de barrido. A) Se observa la interacción del eritrocito con el trofozoíto (cabeza de flecha) mediante la proyección de una boca fagocítica; además de la presencia de placas de adhesión o lamelopodios (flechas) (Barra = 5 μ m). B) y C) Proyección de bocas fagocíticas (Barras = 5 y 2 μ m respectivamente). D) Succión de un eritrocito por medio de una boca fagocítica (cabeza de flecha) (Barra = 2 μ m).

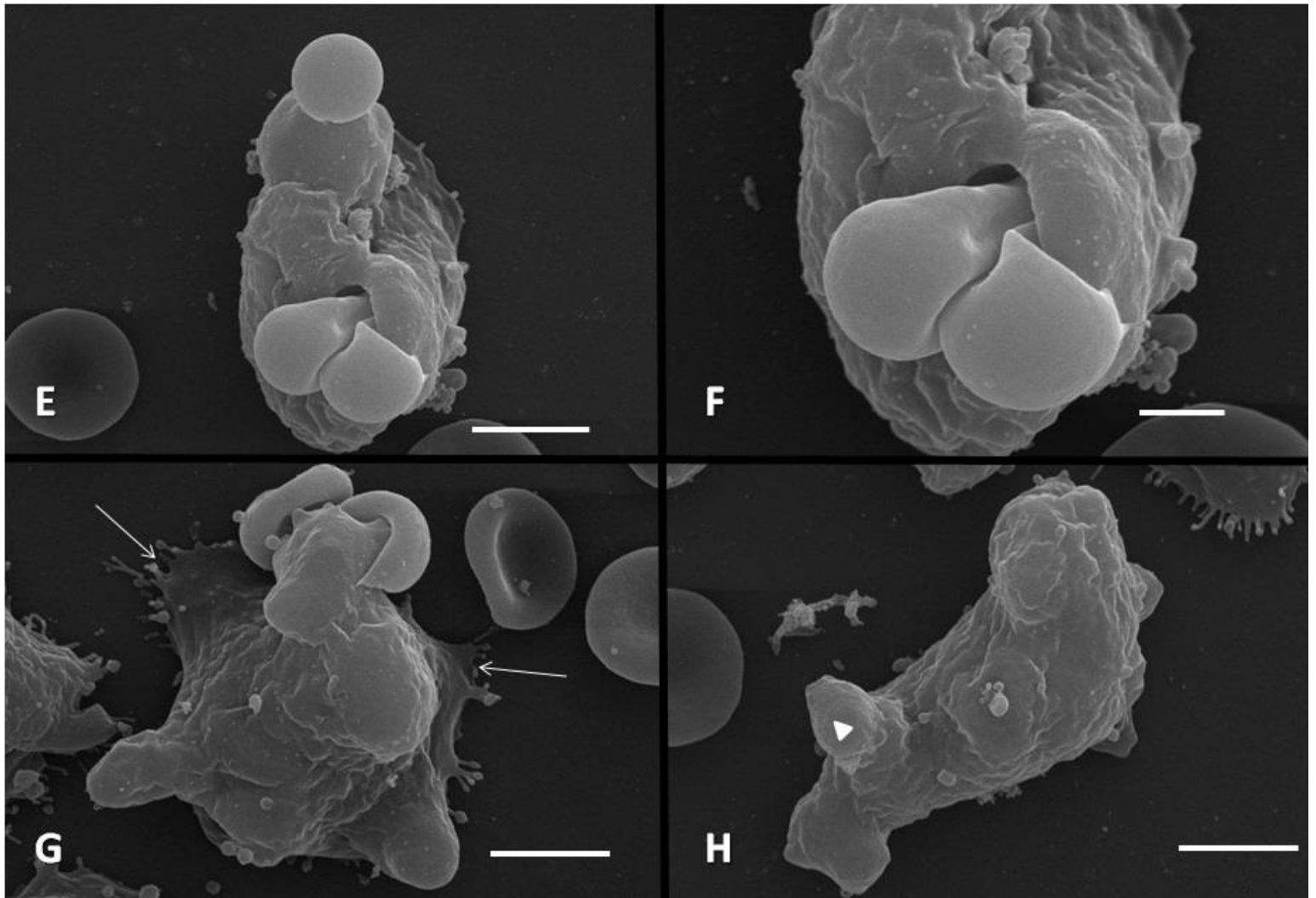


Fig. 23. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 60 (E) y F)) y 120 (G) y H)) minutos. Microscopía electrónica de barrido. E) y F) Se puede observar la ingestión simultánea de dos eritrocitos por medio de una boca fagocítica (Barras = 5 y 2 μm respectivamente). G) Se observa la ingestión de un eritrocito en la superficie del trofozoíto posiblemente por trogocitosis así como el posible cierre de múltiples bocas fagocíticas; al igual que la proyección de placas de adhesión o lamelopodios (flechas) (Barra = 5 μm). H) Se observa un trofozoíto con posibles bocas fagocíticas parcialmente cerradas en su superficie (Barra = 5 μm).

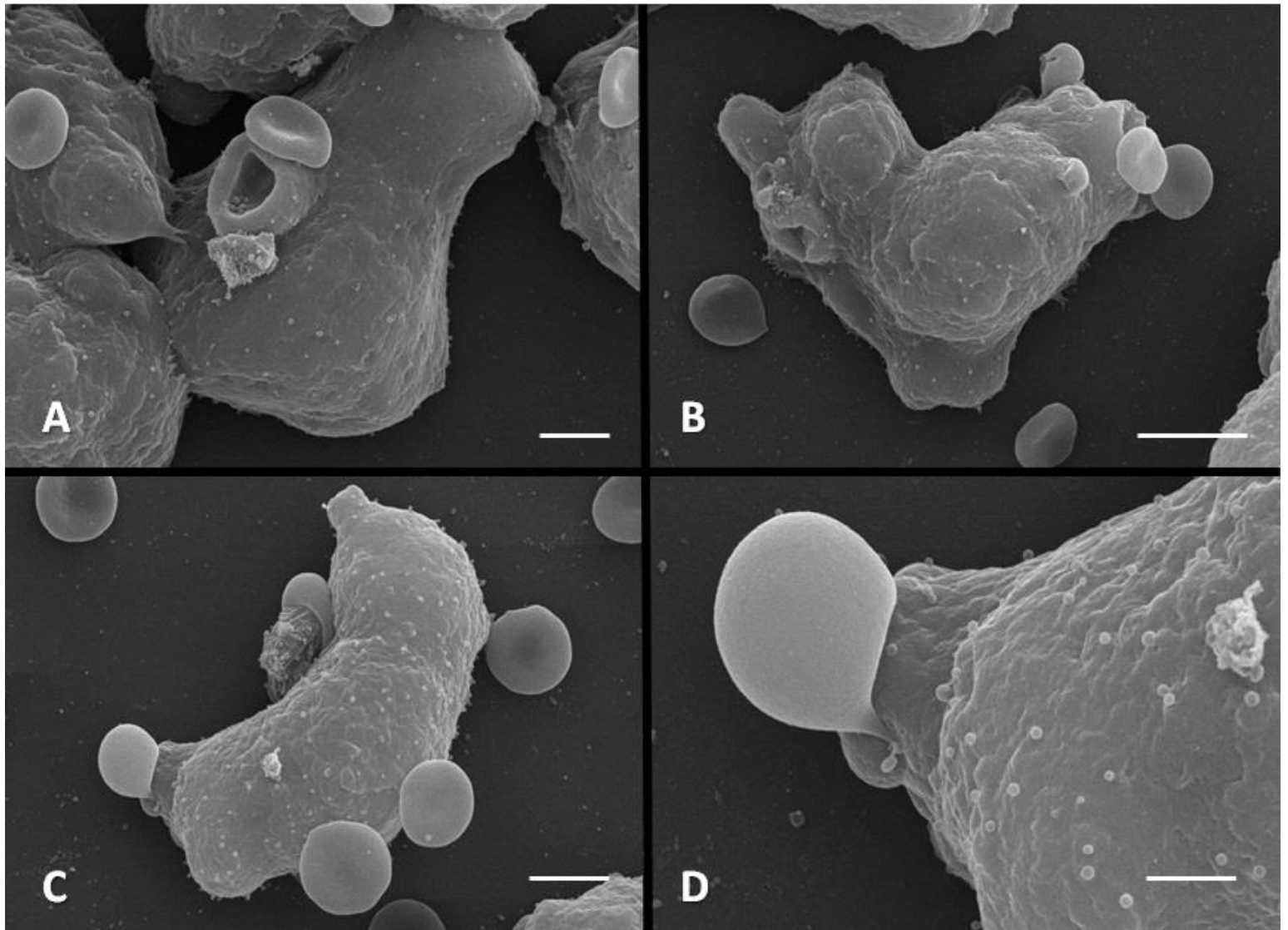


Fig. 24. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 2 minutos. Microscopía electrónica de barrido. A) y B) Proyección de bocas fagocíticas en la superficie del trofozoíto (Barras = 5 y 10 μm respectivamente). C) y D) Se puede observar la “succión” de un eritrocito por medio de una boca fagocítica (Barras = 5 y 2 μm respectivamente).

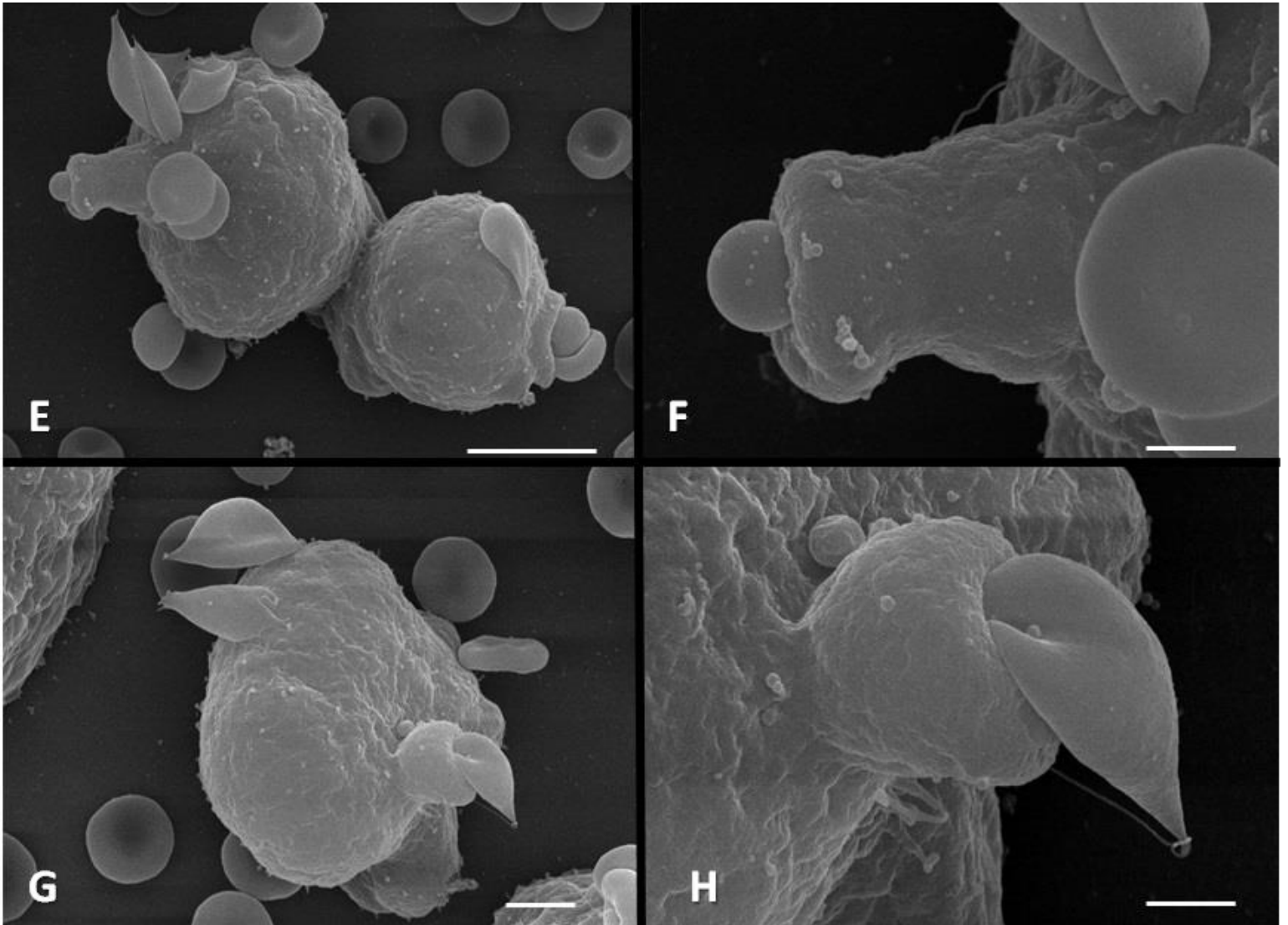


Fig. 25. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 5 minutos. Microscopía electrónica de barrido. E) y F) Se puede ver al trofozoíto alimentándose de varios glóbulos rojos al mismo tiempo; además de que se observan otros eritrocitos que han perdido su morfología característica, alrededor de la amiba (Barras = 10 y 2 μm respectivamente). G) y H) Se puede apreciar la deformación de los eritrocitos al tiempo que se produce su ingestión (Barras = 5 y 2 μm respectivamente).

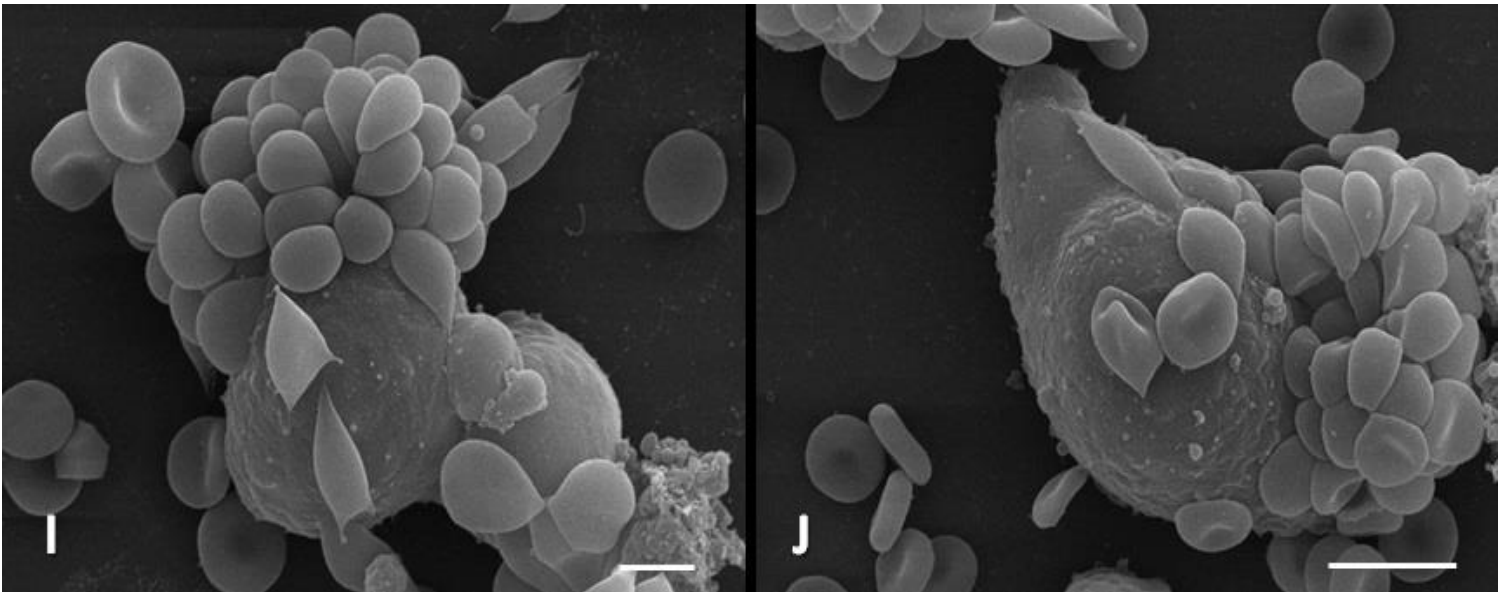


Fig. 26. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía electrónica de barrido. I) y J) Se puede observar al trofozoíto ingiriendo masivamente una cantidad considerable de eritrocitos (deformados y no deformados) por medio de su boca fagocítica, además, podemos visualizar el fenómeno de polarización o de “capping” (Barras = 5 y 10 μm respectivamente).

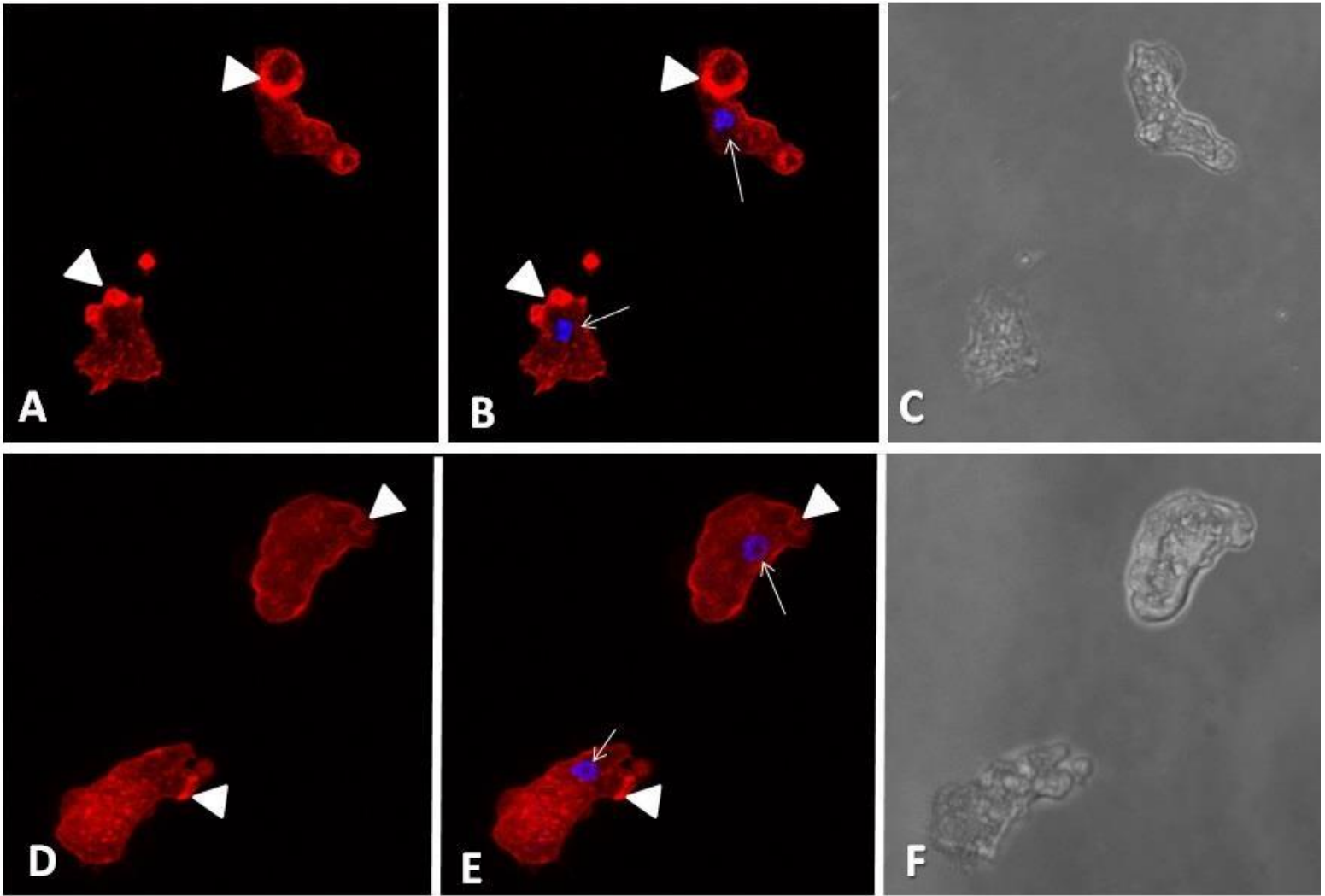


Fig. 27. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía Confocal 40x. A) y D) Se puede visualizar la distribución de la actina por medio de faloidina rodaminada en los trofozoítos (cabeza de flecha). B) y E) Se observa la distribución de la actina en el trofozoíto (cabeza de flecha) y la presencia del núcleo (flecha). C) y F) Observación de los trofozoítos en campo claro.

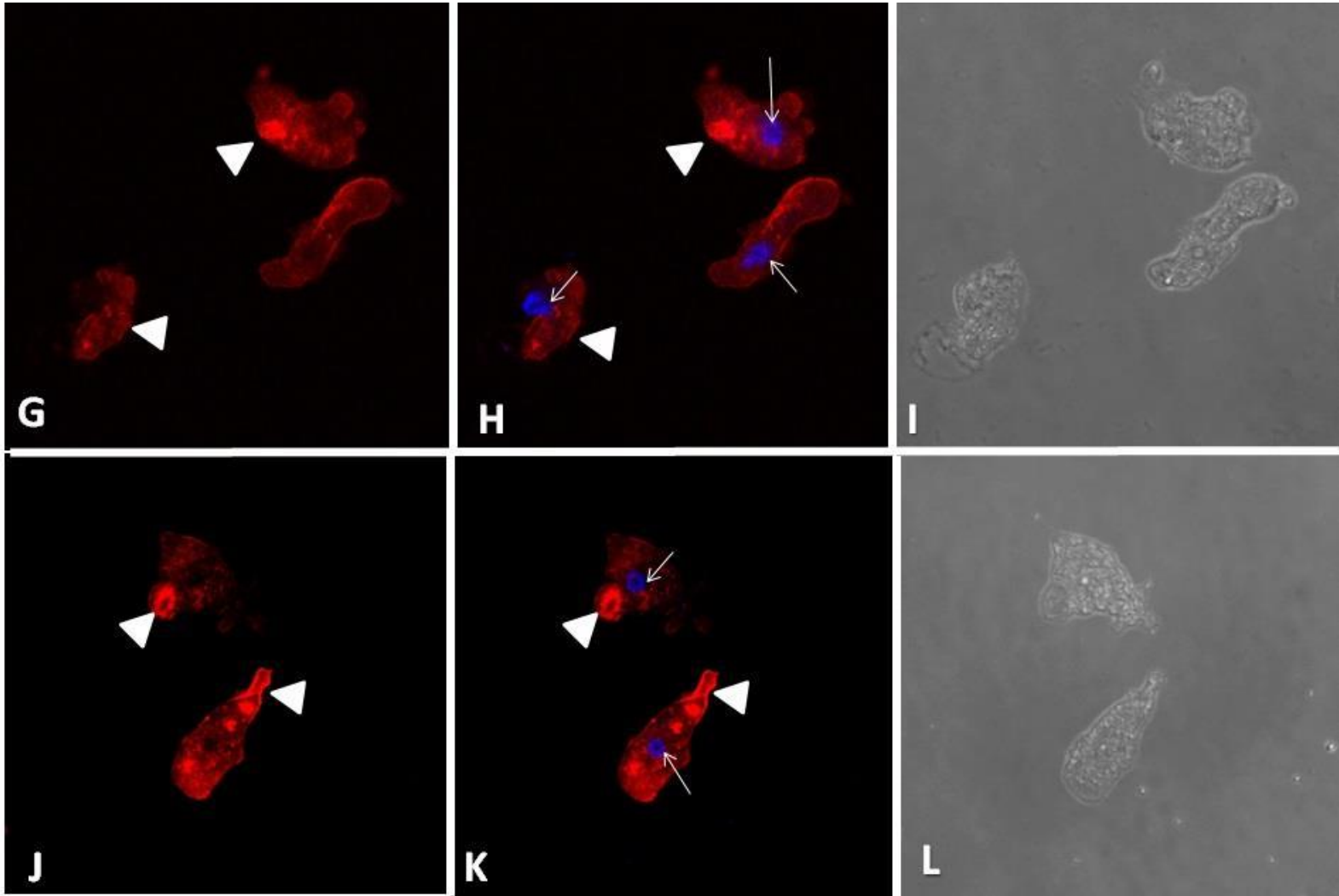


Fig. 28. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía Confocal 40x. G) y J) Se identifica la presencia de actina (cabeza de flecha) con faloidina rodaminada en las amibas. H) y K) Además de la presencia de actina (cabeza de flecha) en el trofozoíto; se puede localizar la presencia del núcleo característico de esta amiba, teñido con DAPI (flechas). I) y L) Observación de los trofozoítos en campo claro.

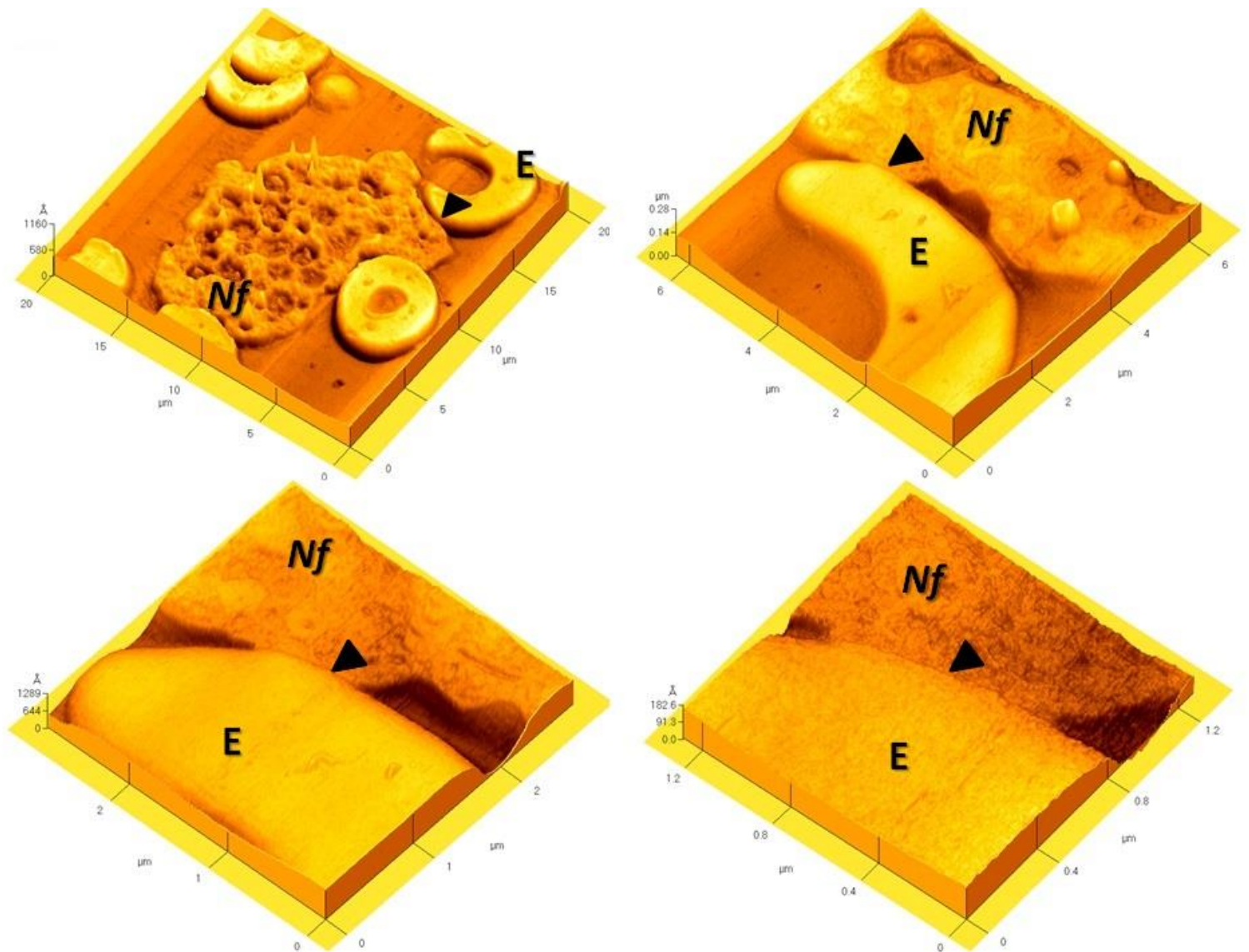


Fig. 29. Co incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía de fuerza atómica. Diversos aumentos. Se puede apreciar la superficie rugosa del trofozoíto (*Nf*), al igual que la del eritrocito (E), conforme se aumenta la imagen. También se observa el contacto entre ambas células (cabeza de flecha).

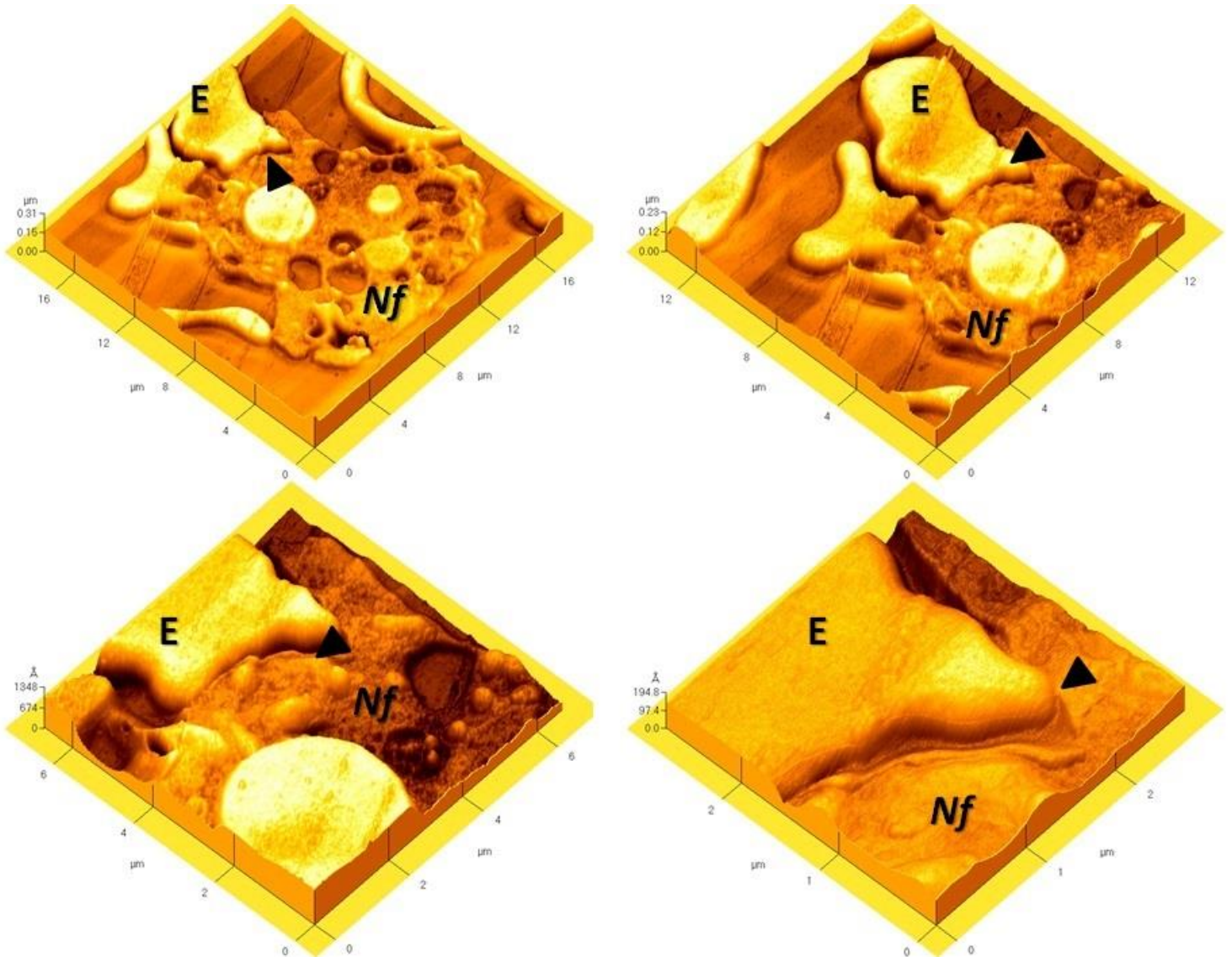


Fig. 30. Co-incubación de *N. fowleri* con eritrocitos O Rh (+) durante 120 minutos. Microscopía de fuerza atómica. Diversos aumentos. Se puede observar la textura del trofozoíto (*Nf*), así como múltiples vacuolas en su interior. Conforme se aumenta la imagen, se puede observar la interacción entre el eritrocito (E) y el trofozoíto, mediante la deformación de la membrana de la amiba, para ingerir Al glóbulo rojo.

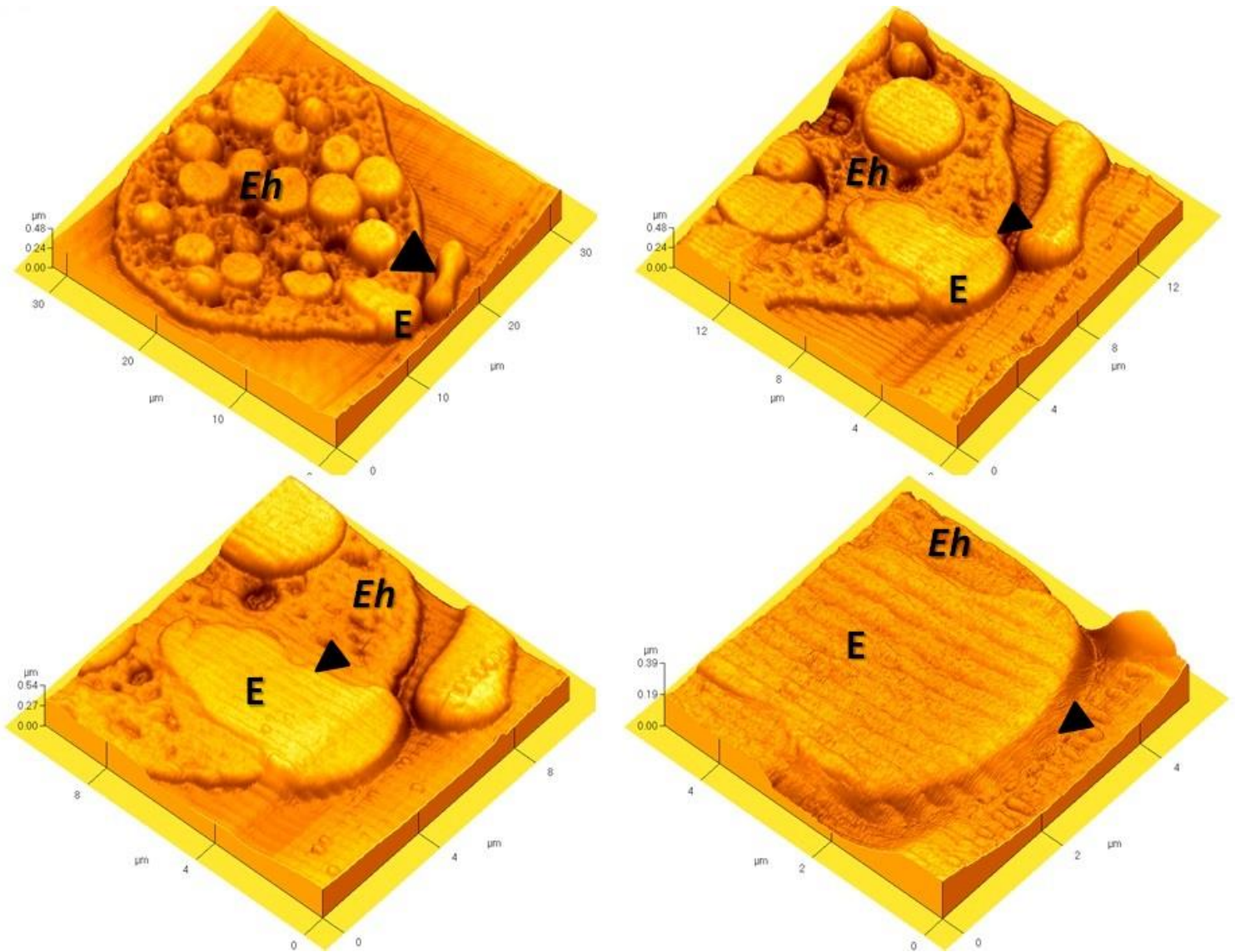


Fig. 31. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 15 minutos. Microscopía de fuerza atómica. Diversos aumentos. Se pueden observar bastantes eritrocitos en el interior de la amiba, así como múltiples vacuolas. Se aprecia con más detalle, como se va deformando el eritrocito (E) al mismo tiempo que es fagocitado por la amiba (*Eh*).

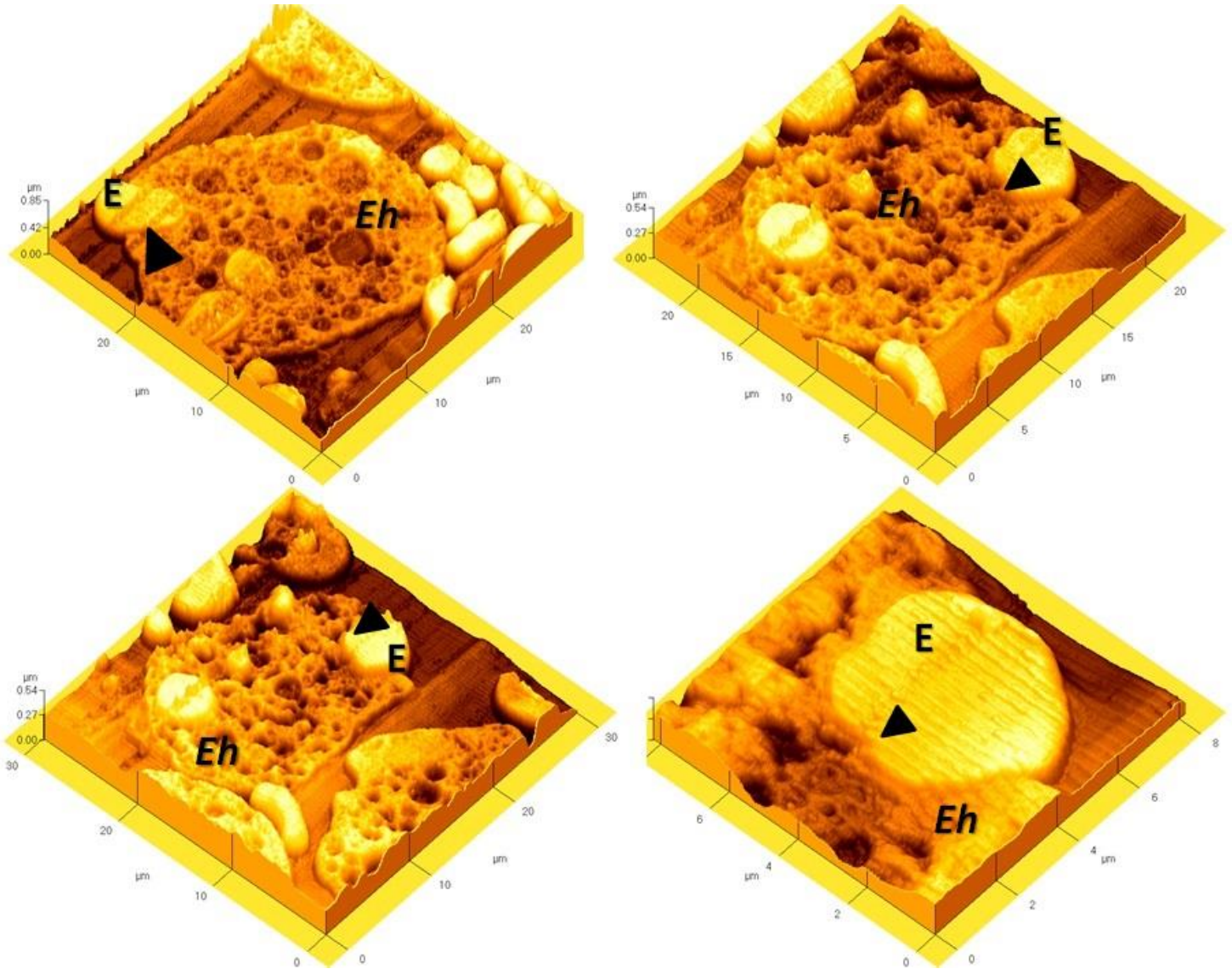


Fig. 32. Co-incubación de *E. histolytica* con eritrocitos O Rh (+) durante 30 minutos. Microscopía de fuerza atómica. Diversos aumentos. Se observan diversas vacuolas con posible material fibrilar, así como un eritrocito (E) que comienza a ser fagocitado, y otro que comienza a ser ingerido por el trofozoíto (Eh).

7. DISCUSIÓN

N. fowleri, es la única especie del género *Naegleria* que ha demostrado ser la causa de la meningitis amibiana primaria (MAP), una enfermedad del sistema nervioso, con consecuencias fatales en su mayoría (Marciano-Cabral *et al.*, 2007). Durante el transcurso de la MAP, hay zonas líticas y hemorrágicas en el cerebro, y estas incluyen la presencia de eritrocitos. Se ha reportado, que *N. fowleri* es capaz de ingerir a los eritrocitos (Cervantes-Sandoval, *et al.*, 2008).

Pero actualmente, el mecanismo por el cual se produce el fenómeno de eritrofagocitosis esta amiba de vida libre permanece desconocido. Por lo cual, en este estudio, se ha decidido comparar dicho fenómeno con el de otro protozooario, con el cual se cuenta con muchos datos y se conoce a grandes rasgos el mecanismo de este fenómeno; *Entamoeba histolytica* (Boettner *et al.*, 2005).

La eritrofagocitosis, es una característica definida en la amibiasis invasiva por parte de *E. histolytica*. En un principio se creía que era un factor de virulencia que caracterizaba sólo a este género, pero diversos estudios, se han encargado de demostrar que no único de esta especie; sino que también está presente en su contraparte no patógena, *E. dispar*; lo que podría sugerir que un futuro, este fenómeno podría dejar de ser un óptimo marcador de virulencia como tal (Tsutsumi, *et al.*, 1992; Talamás-Lara, *et al.*, 2014).

Se conoce muy bien que *E. histolytica* posee una gran capacidad fagocítica de una gran variedad de objetivos alimenticios, como; fragmentos celulares, células vivas; como los eritrocitos; y partículas inertes (Herrera-Verdugo, *et al.*, 1997).

Como se sabe, el hierro es un elemento vital para la supervivencia de la mayoría de los organismos. Bajo condiciones fisiológicas, el Fe^{3+} no es soluble, y el Fe^{2+} si lo es, pero es tóxico y fácilmente se oxida a Fe^{3+} . Para incrementar su solubilidad, evitar su toxicidad, y para mantener el hierro fuera del alcance de microorganismos intrusos, este elemento, normalmente está unido con diversas proteínas. Sin embargo, algunos microorganismos patógenos han sido capaces de alimentarse con el hierro de las proteínas del hospedero. *E. histolytica*, así como

otros parásitos, requieren grandes cantidades de hierro extracelular (~ 100 μM). Este alto requerimiento de hierro es atribuido a la pesada dependencia de su metabolismo en proteínas ferredoxinas. Los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de usar cuatro de las proteínas humanas que se unen a este elemento, como fuentes de hierro. Estas proteínas son la hemoglobina, la transferrina, la lactoferrina y la ferritina. Las amibas endocitan y rompen estas proteínas para obtener el hierro que necesitan (Winter *et al.*, 2014).

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular que está presente en altas concentraciones en los eritrocitos. La función de la hemoglobina es la de atrapar el oxígeno en los pulmones y transportarlo a través de la sangre hacia los tejidos y las células. En los mamíferos la Hb está compuesta de dos cadenas alfa y dos cadenas beta, y cada una contiene un grupo hemo prostético, y por lo tanto hay cuatro átomos de Fe^{2+} en la molécula de Hb. El consumo de hemoglobina por parte de *E. histolytica* ocurre mediante la ruptura de la membrana citoplasmática de los eritrocitos con fosfolipasas y hemolisinas en la superficie del trofozoíto. Una vez fagocitados los eritrocitos, son degradados en el interior de la amiba por varias proteínas denominadas hemoglobinasas en diversas vacuolas (Serrano-Luna *et al.*, 2013).

Por lo tanto, se realizaron varias interacciones entre eritrocitos y trofozoítos de ambas especies de amibas, a diversos tiempos, para poder compararlos entre sí. Para *N. fowleri* se usaron los tiempos de 30, 20 y 120 min de interacción; y con *E. histolytica* los tiempos a evaluar fueron 2, 5, y 15 minutos. La elección de estos tiempos se debió, a que experimentalmente se ha observado que *N. fowleri*, fagocita a los glóbulos rojos de una manera mucho más lenta (Scaglia *et al.*, 1991), en comparación con los trofozoítos de *E. histolytica* (Tsutsumi *et al.*, 1992); como se pudo corroborar en este trabajo.

En las micrografías obtenidas por MET, se pudo visualizar en ambas amibas, que independientemente del tiempo; se observaron áreas electrondensas en las zonas de contacto entre el eritrocito y la amiba. Esto pudo ser causado, por las diversas moléculas que participan en la adhesión de los trofozoítos hacia los eritrocitos;

como por ejemplo: lectinas que reconocen carbohidratos, proteasas, y proteínas secretadas como los ameboporos (Carrasco-Yepey *et al.*, 2012; Serrano-Luna *et al.*, 2013; Herbst *et al.*, 2002; Leippe *et al.*, 2005). Entre las formas de ingerir a los glóbulos rojos, pudimos observar que *N. fowleri* lo realizó por dos maneras, por “succión”, mediante el reconocimiento de los eritrocitos por la membrana de la amiba, así como por trogocitosis; a diferencia de *E. histolytica*, que solo demostró ingerir a los eritrocitos por succión. Sin embargo; se ha reportado por varios autores el mecanismo de trogocitosis en otro tipo de substratos, así como en glóbulos rojos (Herrera-Verdugo *et al.*, 1997; Ralston *et al.*, 2014). La diferencia entre estos mecanismos presentados de eritrofagocitosis por ambas amibas, podría deberse a la capacidad eritrofagocítica de cada amiba.

Entre las diferencias encontradas en ambas amibas en las imágenes obtenidas por MET; se encuentra la cantidad de eritrocitos ingeridos por cada una, así como la velocidad de degradación de los eritrocitos ya fagocitados. En *N. fowleri*, podemos constatar que este proceso se da de manera más lenta que en *E. histolytica*. Lo que sugiere, una menor afinidad hacia los eritrocitos por parte de *N. fowleri* como su fuente de hierro; en comparación con *E. histolytica*.

En las imágenes obtenidas por microscopía de barrido (MEB), se pudo observar la proyección de bocas fagocíticas características de *N. fowleri*. Se visualizó, que esta amiba procede a ingerir a los eritrocitos mediante dos mecanismos; succión y trogocitosis; lo que corresponde con los resultados obtenidos por MET. En las micrografías obtenidas por MEB, también se pudo observar que en los tiempos de 15, 60 y 120 minutos de interacción de los trofozoítos de *N. fowleri* con los eritrocitos, formaron unas estructuras denominadas placas de adhesión o lamelopodios. Por esta razón, se procedió a realizar la técnica de visualización de actina; una proteína mayoritaria del citoesqueleto de los trofozoítos, por microscopía confocal, con el propósito de observar la presencia y distribución de esta molécula, al momento de las interacciones. Esto con el antecedente, de que el rearrreglo del citoesqueleto; es un mecanismo de patogenicidad importante en este protozooario (Sohn *et al.* 2010).

En las micrografías obtenidas por microscopía confocal, se pudo observar como la actina; que es un constituyente estructural para el citoesqueleto de las células, presentó un reacomodo tal, que dicha proteína se distribuyó mayormente en la zona donde se proyectaban las bocas fagocíticas y los lamelopodios o placas de adhesión.

En un estudio realizado en 2012 por Jamerson y col. compararon a *N. fowleri* con su contraparte no patógena, *N. lovaniensis*, en su capacidad de adhesión e invasión a las proteínas de matriz extracelular. En dicho estudio, ellos observaron que *N. fowleri* era capaz de formar estas estructuras de adhesión en dichas proteínas, lo que favorecía un mayor efecto patogénico.

Por lo anteriormente mencionado, la observación de estas estructuras nos puede sugerir que ayudan a los trofozoítos a adherirse en la superficie de las células o tejidos blanco, para poder fijarse de algún modo y realizar daño a dichos objetivos.

A diferencia de *N. fowleri*, los resultados obtenidos por MEB para *E. histolytica*, nos mostraron que, a tiempos cortos, fue capaz de fagocitar una cantidad mayor de eritrocitos, deformándolos para poder obtener la hemoglobina, al tiempo que los ingiere. También se pudo observar, que aumentando el tiempo de interacción, la amiba va polarizando los eritrocitos que va a fagocitar al mismo tiempo que los deforma. Este fenómeno; llamado en la literatura como “capping” o encapsulamiento ha sido descrito por varios autores. El origen de este mecanismo se ha relacionado con los receptores o lectinas que reconocen a los eritrocitos, se encuentran en la superficie del trofozoíto y al momento de ir reorganizándose, la amiba va desplazando a los receptores, provocando la polarización (Tsutsumi et al., 1992; Herrera-Verdugo et al., 1997). Esta es una gran diferencia entre *N. fowleri* y *E. histolytica*, y dichos resultados corresponden a los observados en las imágenes obtenidas por MET.

La microscopía de fuerza atómica (MFA), es capaz de ofrecernos resultados superficiales de los materiales o muestras a niveles nanométricos a nivel topográfico; así como proporcionarnos un perfil tridimensional a partir de uno

bidimensional. Todo esto se debe a la capacidad de resolución vertical que confiere, la cual es diferente a la resolución horizontal proporcionada por el MET y el MEB (Jiménez-García y Fragoso-Soriano, 2000).

Respecto a los resultados proporcionados por la MFA, se pudieron visualizar dos cosas; la superficie de los trofozoítos a nivel nanométrico así como la de los eritrocitos; y la apreciación de la ultraestructura de las amibas de un modo tridimensional.

En la interacción de *N. fowleri* con los eritrocitos a los 30 minutos, se visualizó la textura rugosa del trofozoíto y una cantidad considerable de vacuolas. También se observó que al momento de reconocimiento y contacto, la amiba comienza a deformar su superficie para empezar el proceso de fagocitosis del eritrocito. Conforme vamos aumentando la imagen, podemos observar que la superficie rugosa de la amiba comienza a formar una especie de proyección “viscosa” del citoplasma hacia el eritrocito (Fig. 29 cabeza de flecha). Esta textura del contacto entre el trofozoíto y el glóbulo rojo, no puede ser visible con el MET ni con el MEB,

A un tiempo de interacción de 120 minutos de *N. fowleri* con los eritrocitos, se pudo observar como la amiba está deformando al eritrocito al momento de fagocitarlo, al igual que su propia membrana. También se visualizaron varias vacuolas con material fibrilar, que posiblemente sean eritrocitos ya degradados. No se observó explícitamente la característica boca fagocítica como tal, pero si una forma “retraída” de esta. Al igual que en el tiempo de 30 minutos, podemos ver una textura viscosa del trofozoíto y una especie de plegamiento o arruga de la membrana de la amiba (Fig. 30 cabeza de flecha). En cuanto al eritrocito, en la parte que contacta con el trofozoíto, puede observarse un arreglo parecido a una malla o de material fibrilar. Esto podría deberse a las posibles Lectinas, receptores o proteasas que la amiba pudiera estar secretando. Para poder corroborar estos datos, es necesario hacer otros procedimientos (electroforesis, PCR, etc.) y así, poder comprobar esta hipótesis.

En lo que se refiere a *E. histolytica*, a los 15 minutos de interacción, se pudo observar una cantidad considerable de eritrocitos internalizados, al igual que la ingestión de otro eritrocito. Se observó, que al tiempo que este glóbulo rojo es fagocitado, es deformado por el trofozoíto. A tiempos tardíos de interacción; 30 minutos; se pudieron observar múltiples vacuolas con material fibrilar, que podría corresponder a eritrocitos ya degradados o en diversos estados de degradación. Conforme se va aumentando la imagen, se puede apreciar, que la superficie del trofozoíto se repliega al mismo tiempo que ingiere al eritrocito (Fig. 32 cabeza de flecha). Esta deformación de la membrana del parásito, podría corresponder al reconocimiento por parte de las Lectinas y demás moléculas de adhesión, pero, como se mencionó en el caso de *N. fowleri*, se necesitan estudios moleculares para corroborar esta hipótesis.

Cabe decir que en la literatura, hasta el momento, no existe ninguna referencia de ensayos de eritrofagocitosis realizados por medio de la MFA; tanto de *N. fowleri* como para *E. histolytica*; así como un análisis a nivel ultraestructural de *N. fowleri* con esta técnica, por lo que las características encontradas a nivel morfológico podrían ser tomadas como punto de partida de una línea de trabajos complementarios en un futuro respecto a este fenómeno.

La MFA no pudo proporcionarnos más datos de este fenómeno, pero si ayudó a confirmar los datos obtenidos por MET y MEB. Demostrando que, si bien, la MFA no es un sustituto de las otras microscopías; si puede complementar los resultados obtenidos en una perspectiva topográfica diferente que con las otras técnicas de microscopía, no se pueden observar.

En resumen, al realizar los ensayos de interacción entre los eritrocitos y las amibas; se pudo observar, que ambos protozoarios tienen ritmos diferentes de eritrofagocitosis, lo que significa que la afinidad por los eritrocitos humanos, como fuente de hierro para su metabolismo, es diferente en cada amiba.

E. histolytica, comienza desde tiempos cercanos al minuto a ingerir una gran cantidad de eritrocitos; y en cambio; *N. fowleri*, comienza a ingerir glóbulos rojos

en tiempos más tardíos. Lo que nos lleva a concluir que esta amiba de vida libre, tiene un nivel de afinidad inferior hacia los eritrocitos, en relación con la otra amiba. Esto se podría deber a que, en su entorno natural, el trofozoíto se alimenta de bacterias que residen de manera libre en el ambiente; como *Legionella pneumophila*, o diversas especies de *Mycobacterium* (Goñi, et al., 2013).

Otra de las posibles causas de esta diferencia de tiempos de fagocitosis y de capacidad fagocítica, puede deberse al tamaño que tienen los eritrocitos en comparación con los trofozoítos. Como se mencionó en la introducción; el tamaño promedio de un eritrocito es de 7-10 μm , y los diámetros de *E. histolytica* y *N. fowleri* son; 20-40 μm y 10-25 μm ; respectivamente. Por lo tanto, puede ser un poco más complicado para *N. fowleri*, llevar a cabo la eritrofagocitosis que para *E. histolytica*. En cuanto a las etapas encontradas, durante el proceso de eritrofagocitosis de *N. fowleri*, encontramos que este proceso se presenta a los 120 minutos de interacción; a diferencia de lo observado con *E. histolytica*, cuyo tiempo máximo es de 15 minutos. Es importante señalar, que todos estos estadios o etapas pueden ser encontrados de manera simultánea en cualquier momento en este intervalo de tiempo (Scaglia et al., 1991).

Como anteriormente se señaló, es posible que *N. fowleri* no tenga una afinidad tan marcada como *E. histolytica* hacia los eritrocitos, sin embargo; al no encontrar un sustrato mejor, *N. fowleri* es capaz de utilizarlos como su fuente de hierro. En un estudio reciente, realizado por Martínez-Castillo y col. se procedió a investigar el uso y la degradación de proteínas asociadas a hierro; como la holo-lactoferrina bovina, holo-lactoferrina humana, hemoglobina humana, holo-transferrina humana y ferritina equina; por diversas proteasas de *N. fowleri*. En dicho estudio, los autores concluyen que *N. fowleri* puede obtener hierro durante la fase inicial y final de la MAP; así como la dependencia por parte de la amiba del hierro para su supervivencia y proliferación durante la MAP. Esto nos lleva a pensar, que a pesar de no tener una gran afinidad hacia los eritrocitos; comparándola con *E. histolytica*, su capacidad de fagocitar eritrocitos, es un factor de vital importancia para este protozoario para poder causar la enfermedad.

8.- CONCLUSIONES

- 1.- Se pudo observar por medio de las técnicas de MET, MEB y MFA; que los mecanismos empleados en *N. fowleri* al momento de la eritrofagocitosis fueron; por succión de los eritrocitos por medio de las bocas fagocíticas; y por trogocitosis de los eritrocitos.
- 2.- Al realizar los ensayos de interacción entre los eritrocitos y las amibas; se pudo observar que *N. fowleri* lo hace de manera más lenta en comparación con *E. histolytica*.
- 3.- Se comprobó que *N. fowleri*, es capaz de reorganizar su citoesqueleto, mayormente conformado de actina, para formar las bocas fagocíticas con las que se alimenta, así como estructuras denominadas lamelopodios, que le sirven a los trofozoítos para adherirse a la superficie a infectar.
- 4.- Se implementó una técnica diferente de microscopía a las convencionales para el estudio de este fenómeno, lo cual permitió la obtención de datos morfológicos que no se conocían previamente en la literatura.

9. REFERENCIAS:

Alsteens, D. y Dûfrene, Y., (2014), Atomic Force Microscopy of Living Cells. En Fornasiero, E.F., y Rizzoli, S.O., *Super-resolution Microscopy Techniques in the Neurosciences*, (Pp. 225-250). New York, U.S.A., Ed. Humana Press.

Amebiasis–*Entamoeba histolytica*, (2014), Consultado el 2 de Noviembre de 2014. Center for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>

Arbo, A., Hoefsloot, M., Ramírez, A., Ignacio Santos, J., (1990), *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes, *Archivos de Investigación Médica México*, volumen 21, pp. 57-61

Ardenne, M.v., (1937), Das Elektronen-Rastermikroskop: Theoretische Grundlagen, *Zeitschrift für Physik*, volumen 108, pp. 553-572.

Bansal, D., Ave, P., Kerneis, S., Frileux, P., Boché, O., (2009), An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, volumen 3, pp. 1-11

Barbour, S.E., Marciano-Cabral, F., (2001), *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂, *Biochimica et Biophysica Acta 1530*, pp. 123-133.

Bartelt, L.A., Lima, A.A.M., Kosek, M., Peñataro Yori, Lee, G., Guerrant, R.L., (2013), Barriers" to Child Development and Human Potential: The Case for including the "Neglected Enteric Protozoa (NEP) and Other Enteropathy-Associated Pathogens in the NTDs, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, volumen 7, pp. 1-5.

Basic Principle of Transmission Electron Microscope, (n.d.), Consultado el 26 de Diciembre de 2014, Department of Physics, The Chinese University of Hong-Kong. http://www.hk-phy.org/atomic_world/tem/tem02_e.html

Bendesky, A., Menéndez, D., (2001), Metronidazol: una visión integral, *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, volumen 44, pp. 255-259

Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C., (1986), Atomic Force Microscopy, *Physical Review Letters*, volumen 56, pp. 930- 934.

Boettner, D.R., Huston, C.D., Sullivan, J.A., Petri, W.A. Jr., (2005), *Entamoeba histolytica* & *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes, *Infection and Immunity*, volumen 73, pp. 3422-3430.

Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., (1992) Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*, *The Journal of Clinical Investigation*, volumen 90, pp. 1131–1137.

Bruchhaus, I., Richter, S., Tannich, E., (1997), Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*, *Biochemical Journal*, volumen 326, pp. 785–789.

Cain, A.R., Mann, P.G., B., Warhurst, D.C., (1979), IgA and Primary amoebic Meningoencephalitis, *The Lancet*, volume 313, pp. 441-445.

Campos Peralta, J.M., Sánchez Monroy, V., Villalba Magdaleno, J.D., (2011), *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, volumen 31, pp. 63-70.

Carrasco-Yepey, M., Campos-Rodríguez, R., Godínez-Victoria, M., Rodríguez-Monroy, M.A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., Contis-Montes de Oca, A., Rojas-Hernández, S., (2013), *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of α -D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa, *Parasitology Research*, volumen 112, pp. 3615-3625.

Cerva, L., (1989), *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man, *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, volumen 33, pp. 99-303.

Cervantes-Sandoval, I., Serrano Luna, J.J., García Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M., (2008), Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis, *Parasitology International*, volumen 57, pp. 307-313.

Chadee, K., Petri, W.A. Jr., Innes, D.J., Ravdin, J.I., (1987), Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*, *The Journal of Clinical Investigation*, volumen 80, pp. 1245-1254.

Cleary, S.F., Marciano-Cabral, F., (1986), Activated Macrophages demonstrate direct cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and enhanced binding of *Naegleria fowleri* amoebae, *Cellular Immunology*, volumen 98, pp. 125-136.

Cleary, S.F., Marciano-Cabral, F., (1986), Soluble amoebicidal factors mediate cytolysis of *Naegleria fowleri* by activated macrophages, *Cellular Immunology*, volumen 101, pp. 62-71.

Colton, R.J., Baselt, D.R., Dufrière, Y.F., D Green, J.B., Lee, G.U., (1997), Scanning Probe Microscopy, *Current Opinion in Chemical Biology*, volumen 3, pp. 370-377.

Cursons, R.T., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M., Till, D., (1980), Immunity to Pathogenic free-living amoebae: role of cell mediated immunity, *Infection and Immunity*, volumen 29, pp.408-410.

Da Rocha-Acevedo, B., Tanowitz, H.B., Marciano-Cabral, F., (2009), Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, Volumen 2009, pp.14.

De Jonckheere, J.F., (2004), Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*, *Protist*, volumen 155, pp. 89-103.

De Jonckheere, J.F., (2011), Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*, *Infection, Genetics and Evolution*, volumen 11, pp. 1520-1528.

Debnath, A., Tunac, J.B., Galindo-Gómez, S., Silva-Olivares, A., Shibayama, M., McKerrow, J.H., (2012), Corifungin, a new Drug Lead against *Naegleria*, identified from a High-throughput Screen, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, volumen 56, pp. 5450-5457.

Dey, I., Keller, K., Belley, A., Chadee, K., (2003), Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volumen 100, pp. 13561-13566.

Diamond, L. S., Harlow, D.R., Cunnick, C.R., (1961), A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, volumen 72, pp. 431-432.

Diffley, P., Skeels, M.R., Sogandares-Bernal, F., (1976), Delayed type hypersensitivity in guinea pigs infected subcutaneously with *Naegleria fowleri*, *Zeitschrift für Parasitenkunde*, volumen 49, pp. 133-137.

Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Abe, K., Fujiwara, T., Takeuchi, T., Nagao, E., (2000), The Application of the Atomic Force Microscope to studies of medically important protozoan parasites, *Journal of Electron Microscopy*, volumen 49, pp. 429-435.

El Abed, S., Ibensouda, S.K., Latrache, H., Hamadi, F., (2012), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Enviromental SEM: Suitable Tools for Study of Adhesion Stage and Biofilm Formation, *Scanning Electron Microscopy*, volumen 9, pp. 717-730.

Ferrante, A., Mocatta, T.J., (1984), Human Neutrophils require activation by mononuclear leucocyte conditioned medium to kill the pathogenic free-living amoeba, *Clinical and Experimental Immunology*, volumen 56, pp. 559-566.

Fischer-Stenger, K., Marciano-Cabral, F., (1992), The Arginine-dependent cytolytic mechanism plays a role in destruction of *Naegleria fowleri* amoebae by activated macrophages, *Infection and Immunity*, volumen 60, pp. 5126-5131.

Fletcher, S., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., (2012), Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective, *Clinical Microbiology Reviews*, volumen 25, pp. 420-449.

Fournier Villada, R., (1956), "*Bibliografía mexicana del absceso hepático*", Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F.

Fowler, M., Carter, R.F., (1965), Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to *Acanthamoeba* sp.: a Preliminary Report, *British Medical Journal*, volumen 2, pp. 740-742.

Ghadirian, E., Denis, M, (1992), *Entamoeba histolytica* extract and interferon-gamma activation of macrophage-mediated amoebicidal function, *Immunobiology*, volumen 185, pp. 1-10.

Goldston, A.M., Powell, R.R., Temesvari, L.A., (2012), Sink or swim: lipid rafts in parasite pathogenesis, *Trends in Parasitology*, volumen 28, pp. 417-426.

González-Robles, A., Castañón, G., Hernández-Ramírez, V.I., Salazar-Villatoro, L., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M., Talamás-Rohana, P., Martínez-Palomo, A., (2008), *Acanthamoeba castellanii*: identification and distribution of actin cytoskeleton, *Experimental Parasitology*, volumen 119, pp. 411-417.

González Vázquez, M.C., Carabarin Lima, A., Baylon Pacheco, L., Rosales Encina, J.L., (2012), De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*, *Elementos*, volumen 19, pp. 13-18.

Goñi, P., Fernández, M.T., Rubio, E., (2014), Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae, *Environmental microbiology*, volumen 16, pp. 339-349.

Gordon, R.E., (2014), Electron Microscopy: A Brief History and Review of Current Clinical Applicaton. En Day, C.E., *Histopathology, Methods and Protocols*, Ed. Humana Press, Nueva York, U.S.A. pp. 119-124.

Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sullivan, J.A., Mandell, G.L., (1981), Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils, *The Journal of Infectious Diseases*, volumen 143, pp. 83-93.

Guo, X., Barroso, L., Becker, S.M., Lysterly, D.M., Vedvick, T. S., (2009), Protection against intestinal amebiasis by a recombinant vaccine is transferable by T cells and mediated by gamma interferon, *Infection and Immunity*, volumen 77, pp.3909-3918.

Haggerty, R.M., John, D.T., (1978), Innate resistance of mice to experimental infection with *Naegleria fowleri*, *Infection and Immunity*, volumen 20, pp. 73-71.

Haque, R, Ali, I.M., Sack, R.B., Farr, B.M., Ramakrishnan, G., (2001), Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children, *The Journal of Infectious Diseases*, volumen 183, pp. 1787-1793.

Haque, R., Mondal, D, Shu, J., Roy, S., Kabir, M., (2007), Correlation of interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, volumen 76, pp. 340-344.

Heggie, T.W., (2010), Swimming with death: *Naegleria fowleri* Infections in Recreational Waters, *Travel Medicine and Infectious Disease*, volumen 8, pp. 201-206.

Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., Leippe, M., (2002), Pore-forming Polypeptides of the Pathogenic Protozoon *Naegleria fowleri*, *The Journal of Biological Chemistry*, volumen 277,

Herrera Verdugo, D., Espinosa Cantellano, M., Martínez Palomo, A., (1997), Erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*, *Archives of Medical Research*, Volume 28, pp. 197-199.

Jamerson, M., da Rocha-Azevedo, B., Cabral, G.A., Marciano-Cabral, F., (2012), Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesión to, and invasión of, extracelular matrix proteins, *Microbiology*, volumen 158, pp. 791-803.

Jarolim KL, McCosh JK, Howard MJ, John DT., (2000) A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice, *The Journal of Parasitology*, volumen 86, pp.50-55.

JEOL USA Inc., (2009), Scanning Electron Microscopy A to Z. Basic knowledge for using the SEM, JEOL Ltd, pp. 3-7.

Jiménez-García, L.F., Fragoso-Soriano, R., (2000), Atomic Force Microscopy of the Cell Nucleous, *Journal of Structural Biology*, volumen 129, pp. 218-222.

John, D.T., Cole, T.B., Marciano-Cabral, F., (1984), Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*, *Applied and Environmental Microbiology*, volumen 47, pp. 12-14.

John, D.T., Cole, T.B., Bruner, R.A., (1985), Amebostomes of *Naegleria fowleri*, *Journal of Protozoology*, volumen 32, pp. 12-19.

Joly, E., Hudriesier, D., (2003), What is trogocytosis and what is its purpose?, *Nature Immunology*, volumen 4, pp. 815.

Kammanadiminti, S.J., Mann, B.J., Dutil, L., Chadee, K., (2004), Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, volumen 18, pp. 155-157.

Kirat, K. El, Burton, I., Dupres, V. & Dûfrene, Y.F., (2005), Sample Preparation Procedures for Biological Atomic Force Microscopy, *Journal of Microscopy*, volumen 218, pp. 199-207.

Laughlin, R.C., McGugan, G.C., Powell, R.R., Welter, B.H., Temesvari, L.A., (2004), Involvement of raft-like plasma membrane domains of *Entamoeba*

histolytica in pinocytosis and adhesion, *Infection and Immunity*, volumen 72, pp. 5349-5357.

Laughlin, R.C., Temesvari, L.A., (2005), Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, volumen 7, pp. 1-18.

Leippe, M., Herbst, R., (2004), Ancient weapons for attack and Defense: The Pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid Protozoal, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, volumen 51, pp. 516-521.

Leippe, M., Bruhn, H., Hecht, O., Grötzinger, J., (2005), Ancient weapon: the three-dimensional structure of amoebapore A, *Trends in Parasitology*, volumen 21, pp. 5-7.

Lisazoain, M., Aguado, J.M., (2008), Fármacos Antifúngicos. En Lorenzo, P., Moreno, A., Lisazoain, M., Leza, J.C., Moro, M.A., Portolés, A., *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*, Pp. 957-969, Madrid, España, 18ª ed., Ed. Médica Panamericana.

Lösch, F.A., (1975), Massive Development of Amebas in the Large Intestine, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, volumen 24, pp. 383-392.

Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C.J., Rosenstein, Y., (2005), The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4, *Parasite Immunology*, volumen 27, pp. 127–137.

Marciano-Cabral, F., (1988), Biology of *Naegleria* spp, *Microbiological Reviews*, volumen 52, pp. 114-133.

Marciano-Cabral, F., Cabral, G.A., (2007), The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, volumen 51, pp. 243-259.

Marciano-Cabral, F., Cline, M., Bradley, G., (1987), Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species, *Journal of Clinical Microbiology*, volumen 25, pp. 692-697.

Marciano-Cabral, F., Fulford, D.E., (1986), Cytopathology of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells, *Applied and Environmental Microbiology*, volumen 51, pp. 1133-1137.

Marciano-Cabral, John, D.T., (1983), Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study, *Infection and Immunity*, volumen 40, pp. 1214-1217.

Marie, C., Petri, W.A.Jr., (2014), Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*, *Annual Review of Microbiology* volumen 68, pp. 493-520.

Martinez, A.J., (1985), Free-Living Amoebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease, *CRC Press*, Boca Raton, Florida.

Martínez-Castillo, M., Ramírez-Rico, G., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., Iron-binding protein degradation by cysteine proteases of *Naegleria fowleri*, *BioMed Research International*, Article ID 416712, pp. 1-8. In Press.

Michler, G.H., (2008), Scanning Electron Microscopy, En *Fundamental of Electron Optics and Signal Generation*, pp. 87-90, Berlin, Alemania, Ed. Springer.

Mondal, D., Minak, J., Alam, M., Liu, Y., Dai, J., (2012), Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh, *Clinical Infectious Diseases*, volumen 54, pp. 185-192.

Naegleria fowleri – Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM), (2014), Consultado el 26 de Diciembre de 2014, Center for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/>

Oh, Y.H., Jeong, S.R., Song, K.J., Kim, K., Park, S., Sohn, S., Shin, H.J, (2005), Cytopathic changes and proinflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglia cells and protective effects of anti-Nfa1 antibody, *Parasite Immunology*, volumen 27, pp. 453-459.

Olivos-García, A., Saavedra, E., Nequiz Avendaño, M., Pérez-Tamayo, R., (2011), Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*, *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, volumen 54, pp. 10-20.

Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., Sanchez, T., (1983), *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a Virulence Factor, *The Journal of Experimental Medicine*, volumen 158, pp. 1511-1521.

Pérez Tamayo, R., (2006), Amibiasis. En Flisser Steinbruch, A. y Pérez Tamayo, R., *Aprendizaje de la Parasitología basada en Problemas* (Pp 322-335), México D.F., Ed. Editores de Textos Mexicanos.

Rabinovitch, M., (1995), Professional and Non-professional Phagocytes: An Introduction, *Trends in Cell Biology*, volumen 5, pp. 85-87.

Ramos, F., Morán, P., González, E., García, G., Ramiro, M., Gómez, A., García de León, M.C., Melendro, E.I., Valadéz, A., Ximénez, C., (2005), High Prevalence Rate of *Entamoeba histolytica* Asymptomatic Infection in a Rural Mexican Community, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, volumen 73, pp. 87-91.

Reed, S.L., Curd, J.G., Gigli, I., Guillin, F.D., Braude, A.I., (1986), Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*, *The Journal of Immunology*, volumen 136, pp. 2265-2270.

Reilly, M.F, White, K.L, Bradley, S.G., (1983), Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infection, *Infection and Immunity*, volumen 42, pp. 645-652.

Ricci, D., Braga, P.C., (2004), Imaging Methods in Atomic Force Microscopy. En Braga, P.C. y Ricci, D., Atomic Force Microscopy. *Biomedical Methods and Applications* (Pp. 13-21), New Jersey, U.S.A., Ed. Humana Press.

Rivera, V., Hernández, D., Rojas, S., Oliver, G., Serrano, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., & Campos, R., (2001), IgA and IgM anti-*Naegleria fowleri* antibodies in human serum and saliva, *Canadian Journal of Microbiology*, volumen 47, pp. 464-466.

Rowan-Kelly, B., Ferrante, A., Thong, Y.H., (1980), Activation of Complement by *Naegleria*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, volumen 74 pp. 333-336.

Rugar, D., Hansma, P., (1990), Atomic Force Microscopy, *Physics Today*, volumen 43, pp. 23-30.

Ruska, E., (1987), The Development of the Electron and of Electron Microscopy, *Bioscience Reports*, volumen 7, pp. 607-629.

Saito-Nakano, Y., Loftus, B.J., Hall, N., Nozaki, T., (2005), The diversity of Rab GTPases, in *Entamoeba histolytica*, *Experimental Parasitology*, volumen 110, pp. 244-252.

Samie, A., ElBakri, A., AbuOdeh, R., (2012), Amoebiasis in the Tropics: Epidemiology and Pathogenesis, *Current Topics in Tropical Medicine*, volumen 8, pp. 201-226.

Scaglia, M., Gatti, S., Brustia, R., Chichino, G., Rondanelli, E.G., (1991), Phagocytosis of human erythrocytes by *Naegleria* is not related to species pathogenicity. A phase-contrast cinemicrographic study. *Microbiologica*, vol 1. pp. 45-53.

Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., de la Garza, M., (2013), Proteases from *Entamoeba spp.* and Pathogenic Free-living Amoebae as Virulence Factors, *Journal of Tropical Medicine*, volumen 7, pp. 1-32.

Seydel, K.B., Smith, S.J., Stanley, S.L. Jr., (2000), Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease, *Infection and Immunity*, volumen 68, pp. 400-402.

Shibayama Salas, M., Serrano Luna J. J., Tsutsumi V., (2006), Amibas de Vida Libre. En Flisser Steinbruch, A. y Pérez Tamayo, R., *Aprendizaje de la Parasitología basada en Problemas* (Pp 482-502), México D.F., Ed. Editores de Textos Mexicanos.

Shibayama, M., Serrano-Luna J. J., Aguirre-García, J., Tsutsumi V., (2015), Pathology, Pathogenesis, and Experimental Amebiasis. En Nozaki, T. y Bhattacharya, A., *Amebiasis. Biology and Pathogenesis of Entamoeba* (Pp 420-421), Tokyo, Japan, Ed. Springer.

Siman-Tov, R., Ankri, S., (2003), Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*, *Parasitology Research*, volumen 89, pp. 146–149.

Sohn, H-J, Kim, J-H, Shin, M-H, Song, K-J, Shin, H-J., (2010), The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*, *Parasitology Research*, volumen 106, pp. 917-924.

Stanley, S. L. Jr., (2003), Amoebiasis, *The Lancet*, volumen 361, pp. 1025-1034.

Talamás-Lara, D., Chávez-Munguía, B., González-Robles, A., Talamás-Rohana, P., Salazar-Villatoro, L., Durán-Díaz, Á., Martínez-Palomo, A., (2014), Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: A Comparative Study, *Biomed Research International*, volumen 2014, Article ID 626259, pp. 10.

Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, F., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A., (2012), Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and Clinical Review, *Pathologie Biologie*, volumen 60, pp. 399-405.

Toney, D.T., Marciano-Cabral, F., (1994), Membrane vesiculation of *Naegleria fowleri* amoebae as mechanism for resisting complement damage, *The Journal of Immunology*, volumen 152, pp. 2952-2959.

Tsutsumi, V., Martínez Palomo, A., Tanikawa, K., (1992), Scanning Electron Microscopy of Erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica* Trophozoites, *Archives of Medical Research*, volume 23, pp. 173-175.

Tsutsumi, V., Ramírez-Rosales, A., Lanz-Mendoza, H., Shibayama, M., Chávez, B., Rangel-López, E., Martínez-Palomo, A., (1992), *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, volumen 86, pp. 170-172.

Tsutsumi, V. & Shibayama, M., (2005), Experimental Amebiasis: A Selected Review of Some *In Vivo* Models, *Archives of Medical Research*, volumen 37, pp. 210-220.

Van den Driessche, E., Vandepitte, J., Van Dijck, P.J., De Jonckheere, J., Van de Voorde, H., (1973), Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in stream water, *The Lancet*, volumen 2, pp. 971.

Visvesvara, G.S., (2013), Infections with free-living amebae. En García, H.H., Tanowitz, H.B. y Del Brutto, O.H., *Handbook of Clinical Neurology*, (Pp. 153-168), Amsterdam, Países Bajos. Ed. Elsevier.

Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F.L., (2007), Pathogenic and Opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, volumen 50, pp. 553-578.

Voigt, H., Olivo, J.C., Sansonetti, P., Guillén, N., (1999), Miosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes, *Journal of Cell Science*, volumen 112, pp. 1191-1201.

Whiteman, L.Y., Marciano-Cabral, F., (1987), Susceptibility of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. to complement mediated lysis, *Infection and Immunity*, volumen 55, pp. 2442-2447.

Wilson, M.S., Basic, A., (2012), Preparation of Plant cells for Transmission Electron Microscopy to Optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes, *Nature Protocols*, volumen 7, pp. 1716-1727.

Winter, W.E., Bazydlo, L.A.L., Harris, N.S., (2014), The Molecular Biology of Human Iron Metabolism, *Laboratory Medicine*, volumen 42, pp. 92-102.

Wiser, M.F., (2011), *Entamoeba* and Amebiasis. En *Protozoan and Human Disease*, (Pp. 31-46), New York, U.S.A., Ed. Garland Science, Taylor & Francis Group.

Yu, Y., Chadee, K., (1997), *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact, *Gastroenterology*, volume 112, pp. 1536-1547.

Zysset-Burri, D., Müller, N., Beuret, C., Heller, M., Schürch, N., Gottstein, B., Wittwer, M., (2014), Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*, *BioMed Genomics*, pp.1-15.