

32
2ej

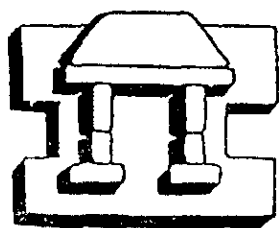


Universidad Nacional Autónoma de México

CAMPUS IZTACALA

“IDENTIFICACION DE LAS AMEBAS DEL
GENERO *Acanthamoeba* POR EL METODO
DE RESTRICCION ENZIMATICA DEL DNA
TOTAL (Huella digital)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
ERNESTINA GONZALEZ LOZANO



IZTACALA
TESIS CON
ALLA DE ORIGEN

ABRIL DE 1999

314 69710



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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi profesor, el M. en C Salvador Rodríguez Zaragoza, por su apoyo y dedicación en la dirección del presente trabajo.

De igual forma deseo agradecer a los profesores Sergio Vaca, Ramón V. Moreno, Diego Arenas y Jorge Campos, por sus atinadas observaciones sobre el contenido de este trabajo.

Asimismo agradezco muy especialmente a mi esposo Ernesto Franco y a mis hijos Iván Tlacaélel y Ana Cecilia por su apoyo y comprensión durante todo el trabajo de tesis.

También deseo agradecer a mis padres Equileo González y San Juana Lozano por el apoyo que siempre me han dado

Finalmente quiero agradecerle infinitamente a la Sra Estela Escalera quien hizo posible la impresión de esta tesis

INDICE

RESUMEN	2
ANTECEDENTES.	3
INTRODUCCION	6
OBJETIVOS.	10
MATERIALES Y METODO	11
RESULTADOS	15
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	36

RESUMEN

El género *Acanthamoeba*, presenta algunas especies que son patógenas oportunistas para el hombre y para otros animales. Se ha visto que las distintas cepas responden de forma diferente frente a los mismos fármacos, por lo que es importante la identificación más precisa de las distintas cepas presentes en el ambiente por ello, el objetivo del presente estudio fue identificar varios aislamientos ambientales de *Acanthamoeba* mediante la restricción enzimática del DNA total. Para lograrlo, se extrajo el DNA total de siete cepas problema y doce de referencia, este DNA se sometió a digestión con las enzimas BglI, XhoI, EcoRI, BamHI, KpnI y HindIII. Se obtuvieron los patrones de bandeo al separar los fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, los perfiles de bandeo que generaron todas las cepas se compararon entre sí y se obtuvo una matriz de datos con los pesos moleculares promedio de cada banda, estos datos se analizaron con el programa PC-ORD versión 3.15 para Windows, mediante el cual se logró identificar a las cepas del ambiente 730m, 630m, 32 pa, Ac 630IV y Ac H7 con cepas de referencia. Las cepas correspondieron a la especie asignada por morfología excepto la cepa 32 pa, que se identificó como *A. polyphaga* por morfología pero, se identificó como *A. palestinensis* por patrón de restricción. Las cepas Ac 530IV y 430m no lograron asociarse a ninguna especie por la falta de un número mayor de cepas de referencia. La identificación a nivel molecular nos proporcionó información adicional a la identificación morfológica, pues permite el reconocimiento de variantes intraespecíficas de *Acanthamoeba* y la diferenciación de ecotipos de este género. El presente trabajo puede servir como apoyo para posteriores investigaciones en cuanto al reconocimiento de las cepas de *Acanthamoeba* presentes en el ambiente y a la búsqueda de antiamebianos para tratar cepas patógenas adecuadamente.

ANTECEDENTES

Las pequeñas amebas de vida libre (AVL), pertenecientes al género *Acanthamoeba* fueron descubiertas en cultivos de suelo preparados para el aislamiento de bacterias y hongos Castellani en 1930, descubrió una ameba en un cultivo de hongos *Criptococcus pararoseus* (Martínez y Visvesvara 1997).

Las amebas se identificaron originalmente como *Hartmannella castellanii* por Douglas en 1930 Pero se transfirieron al género *Acanthamoeba* cuando éste fue establecido por Volkonsky en 1931 Volkonsky creó el género *Acanthamoeba* para amebas caracterizadas por la presencia de un huso afilado en la mitosis con quistes de doble pared, ostiolos y una capa exterior irregular. Singh y sus colaboradores, (1952) concluyeron que la forma afilada del huso durante la mitosis fue inadecuada como un carácter genérico y descartaron el género *Acanthamoeba*.

En 1966 Pussard, al igual que Singh, probó que la forma del huso no fue un factor satisfactorio, pero consideró la morfología distintiva del quiste como un caracter decisivo a nivel genérico y restableció el género *Acanthamoeba*.

Page (1967), después de estudiar varias cepas de *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y otras amebas de vida libre, consideró la presencia de pseudópodos en forma de espina o afilados (acantópodos) y la estructura del quiste como suficientemente distintivos a nivel genérico, y es así que en 1970 Singh aceptó el género *Acanthamoeba*, concordando con Page y otros, pero la pone en la familia Hartmannellidae.

Sawyer & Griffin propusieron la nueva familia Acanthamoebidae en 1975 para establecer una clara separación de amebas con acantopodos, con quistes de paredes arrugadas, a diferencia de *Hartmannella* que tiene quistes lisos y esféricos.

Page designó el suborden Acanthopodina bajo el orden Amoebida, separando a *Acanthamoeba* de *Hartmannella*. Entonces se creó un nuevo orden, Acanthopodida que incluye la familia *Acanthamoebidae*

En 1958 Culbertson *et al.* descubrieron una especie de *Acanthamoeba* capaz de matar animales (Martínez 1985).

Acanthamoeba adquirió interés en la comunidad médica cuando ésta ameba se asoció con infecciones en el sistema nervioso central (SNC) y úlceras en la cornea humana, especialmente entre personas que usaban lentes de contacto, y más recientemente cuando éstas fueron detectadas en pacientes con SIDA

Las primeras identificaciones claras de infecciones en el SNC por *Acanthamoeba* fueron reportadas a principios de los años 70 por Kenney (1971), Uager and Stamm (1972) y Robert and Rocke (1973, tomado de John, 1993).

La enfermedad producida por *Acanthamoeba* en el SNC se llama encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), este término fue propuesto por Martínez en 1980 por la morfología de las zonas del cerebro necrosadas y diseminadas por todo el encéfalo.

Los dos primeros casos de queratitis amebiana fueron reportados en Gran Bretaña en 1974 por Nagington (John, 1993) La primera *Acanthamoeba* aislada de tejido humano fue reportada por Visvesvara en 1983.

Todas las demás especies conocidas fueron consideradas como inofensivas, amebas del suelo y del agua. La cepa patógena fue descrita como una nueva especie y llamada *A. culbertsoni* por Singh y Das en 1970

Las especies de amebas patógenas y no patógenas son microorganismos presentes comunmente en el suelo, agua, polvo, aire filtrado, heces de animales y humanas, tejidos de órganos de hospederos enfermos y en la atmósfera

Griffin condujo experimentos sobre la tolerancia de las amebas a temperaturas superiores a los 25°C. Encontró que algunas especies toleraban los 37°C, mientras que otras morían a esta temperatura. *A. culbertsoni* sobrevive y se desarrolla a 37°C, *A. rhysodes* sobrevive pero no se multiplica, *A. castellanii* y *A. polyphaga* no sobreviven a tales temperaturas. Coincidentemente las cepas que toleraban los 37°C fueron patógenas, mientras que aquellas que no las toleraban se clasificaron como no patógenas. Este descubrimiento condujo a Singh y Das en 1970 a examinar el lodo de aguas residuales en la India, donde encontraron a *A. culbertsoni*, y observaron que esta ameba era capaz de matar ratones infectados experimentalmente

De Jonckheere *et al.*, (1979), examinaron aguas termales contaminadas en Europa y aislaron cepas de *Acanthamoeba* patógenas. con estos antecedentes, las aguas contaminadas por aguas residuales y termales sucias se convirtieron en las principales fuentes conocidas de especies tolerantes al calor, capaces de matar ratones experimentalmente. En 1977 Pussard y Pons reconocieron tres grupos dentro del género y establecieron 18 especies diferentes. De Jonckheere y Page, en 1988 aceptaron la clasificación de Pussard y Pons con pocos cambios

Recientemente se han incluido otras características para la identificación del género *Acanthamoeba* en adición a la morfología del quiste, tales como perfiles de isoenzimas y RFLPs del DNA mitocondrial y amplificaciones por PCR de la subunidad 18s del rRNA, etc. Las comparaciones genéticas a nivel de ácidos nucleicos han sido una poderosa herramienta para resolver problemas filogenéticos.

La secuenciación de la subunidad pequeña del RNA ribosómico (srRNA) ha sido usada para estudiar protistas, demostrando por ejemplo: que el grupo Rhizopodia, representada por *Naegleria*, *Acanthamoeba*, y *Dictyostelium* no son monofiléticos. (Johnson *et al.*, 1990). Lo que explica en parte la dificultad para separar las especies en estos géneros

INTRODUCCION

Acanthamoeba es un género de pequeñas amebas de vida libre que son patógenas oportunistas de humanos y otras especies animales (Gast, 1996).

Dentro de las amebas de vida libre encontramos además otros géneros como *Naegleria*, *Hartmannella* y *Balamuthia* muy importantes desde el punto de vista médico, pues son responsables de algunas enfermedades que afectan el SNC de humanos y otros animales.

Acanthamoeba, normalmente vive como fagótrofo en el ambiente donde se alimenta de bacterias. Como un grupo las amebas de vida libre pueden alimentarse de bacterias, algas, hongos y otros protozoos, incluyendo otras amebas (Martínez 1991, 1993; Rodríguez-Zaragoza y García, 1997). Sin embargo como oportunistas, pueden producir serias infecciones en los ojos, el SNC y otros órganos o tejidos en individuos inmunodeprimidos (John, 1993; Rodríguez-Zaragoza, 1994)

Naegleria fowleri es responsable de una enfermedad mortal de desenlace rápido que involucra el SNC llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) (De Jonckheere, 1987; Martínez, 1993). Las infecciones por ésta ameba ocurre frecuentemente en gente joven sana con una historia reciente de nadar en aguas dulces (John, 1993).

Varias especies de *Acanthamoeba* causan enfermedades, pueden producir una infección crónica en el SNC conocida como encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), o infecciones en los ojos, referidas como queratitis amebiana (Ma et al, 1990; Yagita, 1990; Kilvington, 1991) Las infecciones por *Acanthamoeba* spp. no están asociadas a nadadores como ocurre con *N. fowleri* y la infección en el SNC puede ser secundaria a infecciones en otras partes del cuerpo, llegando al cerebro por vía hemática, la enfermedad tiende a ser crónica con un curso prolongado y ocurre regularmente en personas débiles o inmunocomprometidas (Martínez y Visvesvara 1977; Gast 1996; y John 1993)

Aunque gran parte de las infecciones humanas producidas por estas amebas no son conocidas es posible creer que muchas de las infecciones reportadas en diversas partes del mundo sean debidas a *N. fowleri*, *Acanthamoeba* o *Balamuthia* (Visvesvara, 1990) Por otra parte, varios casos de infecciones por *Acanthamoeba* han sido reportados en pacientes con SIDA, lo cual sugiere que las infecciones por éstas amebas pueden estar más ampliamente distribuidas de lo que se aprecia (Ma

et al., 1990)

No todas las especies de *Acanthamoeba* son sensibles al mismo fármaco en el mismo grado, e incluso diferentes cepas identificadas como pertenecientes a la misma especie reaccionan de diferente manera al mismo fármaco (Schuster *et al.*, 1998; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 1999). Por ésto, la identificación de los diferentes géneros presentes en el ambiente es muy importante debido a que no todas las especies de los géneros ya mencionados se consideran patógenas y por la dificultad de identificar las diferentes especies, para lo que se necesitan tomar en cuenta todas las herramientas posibles para hacer un diagnóstico correcto.

La identificación del género *Acanthamoeba* está basada principalmente en la morfología, la división nuclear, la tolerancia a temperaturas superiores a 37°C, el análisis de isoenzimas y su patogenicidad, como herramientas más precisas están las pruebas bioquímicas y moleculares tales como anticuerpos monoclonales y digestión del DNA por endonucleasas de restricción (Ma *et al.*, 1990).

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* tiene únicamente dos etapas trofozoito y quiste. El tamaño del trofozoito varía en las diferentes especies, se caracteriza por un núcleo simple con un gran cariosoma o endosoma. La movilidad de *Acanthamoeba* es lenta, pues en lugar de formar lobópodos, forma acantópodos (Sawyer y Griffin, 1977).

La membrana nuclear desaparece durante la división. La ameba se alimenta de bacterias tales como *E. coli*, *Enterobacter sp.* y otros bacilos entéricos Gramm negativos, (Martínez 1994, Rodríguez-Zaragoza, 1994 ; Ma *et al.*, 1990).

Los quistes de *Acanthamoeba* generalmente tienen arrugas, debido a que presentan dos capas, el ectoquiste y el endoquiste, las cuales se unen en algunos puntos formando depresiones o brazos. De acuerdo al número de brazos se establecen tres grupos morfológicos (Pussard y Pons, 1977).

El tamaño del quiste varía entre especies de las amebas pequeñas *A. Polyphaga* y *A. Hatechetti* tienen un rango de 13 a 13.1 micras, las de tamaño medio *A. Castellani*, *A. astonyxis*, *A. rhusodes*, *A. culbertson* y *A. griffini* son de 16.7 a 19.8 micras y las grandes de más de 19 micras (Ma. *et al.*, 1990; John, 1993; Johnson *et al.*, 1990)

Con estas características se facilita la identificación del género y del grupo al que pertenecen. Sin embargo, el diagnóstico a nivel de especie sigue siendo difícil, pues las diferencias en la estructura

quística son muy finas así que no hay seguridad en cuanto a la especie por lo que se necesita la utilización de otros métodos para la diferenciación de *Acanthamoeba*, tal como la electroforesis de isoenzimas, y la electroforesis del DNA mitocondrial o DNA total digerido con enzimas de restricción (Kilvington, 1991).

Aunque la electroforesis de isoenzimas, es una herramienta muy útil y confiable, tiene la desventaja de trabajar con características fenotípicas, por lo que es más confiable la electroforesis del DNA total pues se trabaja con el genotipo.

Por medio del patrón de bandeo del DNA total (huella digital), que se obtiene al digerir el genoma con enzimas de restricción, seguido por un corrimiento electroforético ha sido posible obtener un diagnóstico a nivel de especie con mayor seguridad.

Las comparaciones genéticas a nivel de ácidos nucleicos son una poderosa herramienta para resolver problemas filogenéticos (Gast *et al.*, 1994).

La restricción del DNA total con endonucleasas de restricción es una técnica útil para diferenciar cepas de *Acanthamoebas* morfológicamente idénticas mediante la detección de los RFLPs del DNA mt. Sin embargo, la desventaja para la obtención de RFLPs es el requiemiento de grandes cantidades de DNA (Hadrys *et al.*, 1992). En los últimos años se han reportado nuevas técnicas para la obtención de marcadores genéticos moleculares, la mayoría basados en técnicas de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

El PCR es un método utilizado para la detección de ácidos nucleicos presentes en muy bajas concentraciones en muestras biológicas. Esta técnica, basada en la amplificación de DNA, nos permite diferenciar grupos de organismos por la aparición de patrones de bandeo similares a los del análisis de RFLP's (Clementi, *et al.*, 1994).

Se amplifican grandes cantidades de secuencias específicas de DNA de un organismo usando oligonucleótidos complementarios a la secuencia para su primera replicación por la enzima DNA polimerasa *in vitro* (Cactano-Anollés, 1993).

Los RFLP combinados con técnicas de PCR proporcionan una poderosa herramienta para la determinación cuantitativa de la diversidad genética en poblaciones de bacterias y virus (Lu, *et al.*, 1993). El PCR ha sido usado para ayudar en la caracterización de especies de protozoarios, incluyendo a *Acanthamoeba*, *Trypanosoma*, y otros microorganismos eucarióticos (Graham, 1997;

Vanacova *et.al.*, 1997) El método de PCR también se ha utilizado para amplificar la fracción 18s del RNAr de *Acanthamoeba* (Gast *et al*; 1996)

En este trabajo se eligió el método de restricción enzimática del DNA total, pues los datos generados por la restricción del DNA, presentan la ventaja de ser más fácilmente reproducibles, que las técnicas basadas en PCR (Laguerre *et al*, 1994)

El presente trabajo está enfocado a la identificación de las especies de género *Acanthamoeba* por el método de restricción enzimática del DNA total.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Identificar las cepas del género *Acanthamoeba* presentes en el ambiente a partir de los patrones de bandeo que se obtienen al digerir el DNA total con enzimas de restricción

Objetivos particulares

Obtener el DNA total de las cepas de *Acanthamoeba* tanto de referencia como de las obtenidas del ambiente.

Someter el DNA a digestión con enzimas de restricción y obtener los patrones de bandeo del DNA restringido por medio de la electroforesis en gel de agarosa.

Comparar los patrones obtenidos entre las cepas problema (aisladas del ambiente) y las de referencia

MATERIALES Y METODOS

Las cepas de referencia fueron obtenidas de ATCC, listadas en el cuadro 1, y las cepas problema (aisladas del suelo de Villa del carbón, en el estado de México) Cuadro 2.

Las cepas fueron cultivadas en placas de agar no nutritivo con una capa de bacteria *Enterobacter aerogenes*, en medio monoxénico y las cepas axénicas en medio para *Acanthamoeba* (Peptona biotriptasa (Bioxon), extracto de levadura (Bioxon), dextrosa, fosfato de potasio, fosfato de sodio, d-biotina, l-metionina, l-cisteina).

Las cepas axénicas fueron cultivadas en botellas de poliestireno para cultivo con capacidad de 30 ml, en 15 ml de medio e incubadas 48hrs. a 30°C, las cepas monoxénicas se pusieron en cultivos masivos en cajas petri de 10 cm de diametro, dos cajas por cepa en agar no nutritivo con una capa de bacteria *E.aerogenes*, incubadas durante 24hrs. a 30°C.

CLAVE	NOMBRE CIENTIFICO	GRUPO MORFOLOGICO	TIPO DE CULTIVO
30234	<i>A. castellanii</i>	2	Axénico
30898 *	<i>A. castellanii</i>	2	Axénico
30011	<i>A. castellanii</i>	2	Axénico
30010	<i>A. castellanii</i>	2	Axénico
30461	<i>A. polyphaga</i>	2	Axénico
30486	<i>A. polyphaga</i>	2	Monoxénico
30481 *	<i>A. lenticulata</i>	3	Axénico
30884 *	<i>A. royreba</i>	3	Axénico
30870	<i>A. palestiniensis</i>	3	Axénico
30137	<i>A. astronyxis</i>	1	Monoxénico
30730 *	<i>A. hatchetti</i>	2	Axénico
30731	<i>A. griffini</i>	2	Monoxénico

Cuadro 1 - Cepas de referencia obtenidas del ATCC (American type culture collection)

*Cepas patógenas

CLAVE	IDENTIFICACION MORFOLOGICA	GRUPO	CULTIVO
Ac 6301V	<i>A. castellanii</i>	2	Axénico
Ac 5301V	<i>A. tubiashi</i>	1	Axénico
Ac H7	<i>A. polyphaga</i>	2	Axénico
32pa	<i>A. polyphaga</i>	2	Axénico
630m	<i>A. polyphaga</i>	2	Axénico
730m	<i>A. castellanii</i>	2	Axénico
430m	<i>A. hatchetti</i>	2	Axénico

Cuadro 2.- Cepas problema, obtenidas del suelo de Villa del carbón en el Estado de México, y la cepa 32pa, fue aislada del aire de San Luis Potosí Méx

EXTRACCION DEL DNA TOTAL

Las cepas que crecieron en medio monoxénico se cosecharon, agregando 5 ml de solución salina a cada caja de cultivo y barriendo con asa de vidrio, se obtuvieron los trofozoitos con pipeta paster y se colectaron en tubos de 15 ml, se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm en centrifuga clínica, se descartó el sobrenadante con pipeta pasteur y se le agregó nuevamente solución salina para retirar las bacterias que pudieron haberse cosechado y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, nuevamente se desechó el sobrenadante y se le agregó solución salina para finalmente empaquetar los trofozoitos a 2500 rpm. Las cepas cultivadas en medio axénico en estado de trofozoito, aproximadamente 10⁶, fueron cosechadas por centrifugación a 2500 rpm por 10 minutos y se desechó el sobrenadante, al paquete celular se le agregó 600 µl de solución UNSET (Urea 8M, dodesil sulfato de sodio al 2%, NaCl 0.15M, EDTA 0.001M, Tris-HCl 0.1M pH 7.5) para lisis celular, e inmediatamente se agregaron 600µl de la mezcla de Fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), el paquete celular se resuspendió en esta mezcla y se agitó ligeramente para homogenizarla, después se centrifugó en tubos eppendorf para microcentrifuga a 10000 rpm

durante 5 min. Se obtuvo el sobrenadante con micropipeta en tubos limpios, a éste se le agregó nuevamente la mezcla de Fenol-cloroformo –alcohol isoamílico, para retirar todos los restos celulares. Una vez que el sobrenadante quedó completamente limpio se pasó a un tubo limpio y se le agregaron 600 µl de isopropanol a -20°C, se agitó ligeramente y se guardó a -20°C de 1 h a toda la noche para que precipitaran los ácidos nucleicos. Posteriormente, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante, y el paquete de ácidos nucleicos se resuspendió en 1 ml de etanol al 70%, se agitó ligeramente y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min, éste paso se repitió una vez más con etanol al 70% y una vez con etanol absoluto, después de centrifugar, se desechó el alcohol y los ácidos nucleicos se pusieron a secar a 37°C el tiempo necesario. Finalmente, el paquete de DNA se disolvió en agua bidestilada estéril y se guardó a 4°C hasta su uso.

RESTRICCIÓN DEL DNA TOTAL.

Se agregaron 16 µl de DNA genómico, 2 µl de buffer de activación recomendado en cada una de las enzimas utilizadas EcoRI, HindIII, BamHI, KpnI, BglI y XhoI de 4 a 5 unidades de la enzima de restricción, para asegurar que todo se mezclara bien, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 10 segundos aproximadamente. (En el cuadro 3 se muestran las secuencias de reconocimiento de las enzimas utilizadas).

Hecha la mezcla, las muestras se colocaron en incubadora a 37°C por 2 hrs, para que se llevara a cabo la restricción del DNA y finalmente a cada muestra se le agregaron 2 µl de una mezcla para parar la reacción (azul de bromofenol 1%, ficol 10% y sucrosa 20% en EDTA (Na) 0.1M pH 8.0).

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO
EcoR I	5'G/AATTC3'
Hind III	5'A/AGCTT3'
BamH I	5'G/GATCC3'
Kpn I	5'GGTAC/C3'
Bgl I	5'GCCNNNN/NGGC3'
Xho I	5'C/TCGAC3'

Cuadro 3.- Enzimas utilizadas para digerir el DNA total de *Acanthamoeba* con los sitios de restricción que reconoce cada una

ELECTROFORESIS DEL DNA TOTAL RESTRINGIDO.

Para el corrimiento electroforetico del DNA restringido se preparó un gel de agarosa al 0.7% en TBE IX (Tris 0.89M, Acido bórico 0.89M y EDTA (Na₂) 0.025M), el gel se colocó dentro del tanque de electroforesis y se cubrió con TBE, después se colocaron las muestras de DNA restringido en cada uno de los pozos del gel

Se colocaron los electrodos en el tanque, la fuente de poder se programó para el corrimiento de las muestras en las siguientes condiciones, algunos geles 100volts durante 1 h, 60 volts 40min y 40 volts por 40 min. más, y posteriormente se modificaron a 90 volts por 2 h pues se observaron mejores resultados. Posteriormente se procedió a teñir el gel sumergiendolo en 1 lt. de solución de bromuro de etidio 0.5 microgramos por mililitro por 30 min, despues el gel se colocó en agua destilada limpia para eliminar el exeso de bromuro de etidio durante 15 minutos. Finalmente se colocó el gel en un trasluminador de luz ultravioleta (UVP) para visualizar las bandas. El gel se analizó y fotografió en el digitalizador de imágenes con el programa alfa imagen 2000 de pesos moleculares, los tiempos de exposición y el análisis de las bandas se presenta en cada imagen de los geles, la concentración minima necesaria para que el DNA teñido con bromuro de etidio 0.5 mcg/ml pueda ser visualizado con luz UV es de 1 nanogramo (Maniatis, *et al*; 1982), Se obtuvo el patrón de bandeo de todas las cepas por triplicado para cada enzima. se sumaron los pesos moleculares de las bandas de cada cepa que aparecieron en las tres repeticiones y se obtuvo el peso promedio por banda.

Con estos datos, se construyó una matriz con el promedio de los pesos moleculares de cada banda. Estos pesos se calcularon con los datos obtenidos en los tres corrimientos que se hicieron para cada enzima y por cada cepa. El programa PC-ORD (de análisis estadístico multivariado) se utilizó para obtener el índice de similitud de Sorensen entre las cepas probadas y de esta manera observar qué tanto las cepas problema se parecían a las especies identificadas por morfología. Los datos también se analizaron por el método de la asociación de promedios de grupos no ponderados (UPGMA por sus siglas en inglés) para la elaboración de los dendrogramas.

RESULTADOS

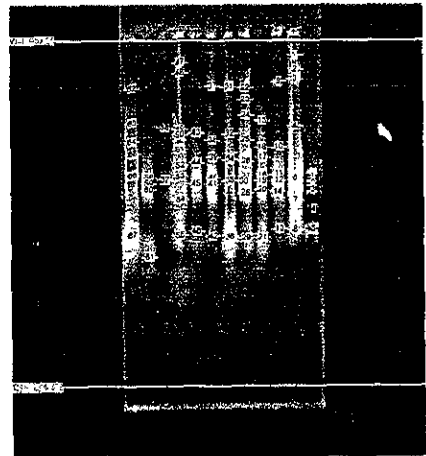
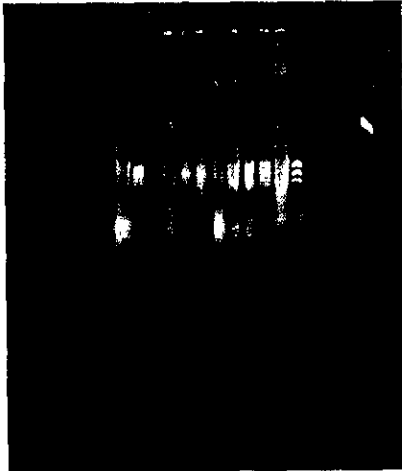
El método UNSET, desarrollado originalmente para la extracción del DNA mitocondrial, se utilizó en el presente trabajo hasta la extracción del DNA total lo cual permitió acortar el tiempo en 4h para la extracción y permitió obtener un DNA de buena calidad para la restricción enzimática.

La digestión del DNA total de *Acanthamoeba* con las enzimas de restricción BglI y XhoI, no mostró más que dos o tres bandas después de la electroforesis en gel teñido con bromuro de etidio, y no se observó ningún cambio cuando se incrementó la cantidad de enzima y el tiempo de incubación (figura 1), los resultados con éstas enzimas no produjeron ningún patrón en particular, por lo que no se tomaron en cuenta para el análisis de grupos



Figura 1 Restricción con BglI, 5U/37°C por 2h. Las muestras se colocaron de izquierda a derecha. Pozo 1 marcador fago X174 digerido con Hae III, Pozos 2-12 cepas 30841, AC630IV, 30898, 30884, Ac117, Ac530IV, 32pa, 30011, 30870 y 30730.

En cambio las muestras tratadas con EcoRI, BamHI, KpnI y HindIII mostraron diferentes patrones de bandeo, que permitieron agrupar a las cepas de diferentes especies morfológicas en grupos de cepas con un alto grado de similitud a nivel molecular entre las cepas probadas. El número promedio de fragmentos o bandas obtenidos por cepa para éstas enzimas fue de 8 para EcoRI, 6 para BamHI, 6 para KpnI y 10 para HindIII.



A)

B)

Figura 2 A.- Restricción con EcoRI, 5 Unidades/2h 37°C, Pozo1 Marcador X174 digerido con HaeIII Pozo 2 a 12 cepas, 30461, 30898, 30234, AcH7, 30011, 30731, 30884, 32pa, 30486, 30841 y 30137

Figura 2 B.- Imagen obtenida del gel de la figura 2 A en el digitalizador de imágenes

Los dendrogramas construidos con el promedio de los pesos moleculares de las bandas obtenidas con la restricción con **Eco RI** son muy similares tanto en el análisis de distancias euclidianas (no se muestra en los datos) como en el de Sorensen (figura 3), con ésta enzima se formaron 4 grupos de múltiples cepas y dos cepas únicas.

En el primer grupo se encuentran las cepas 30898,30884,30841 y 30234 con una similitud del 100%, la cepa 30011 un 92% similar a las anteriores y las cepas 32pa, 30730 y 30461 con 100% de similitud entre ellas y 85% con las anteriores

El segundo grupo lo integran las cepas 30010, 98% similar a 630m y Ac5301V 100% similares y la cepa 30486 es 90% parecida a las anteriores, y este grupo es similar al primero en un 78%.

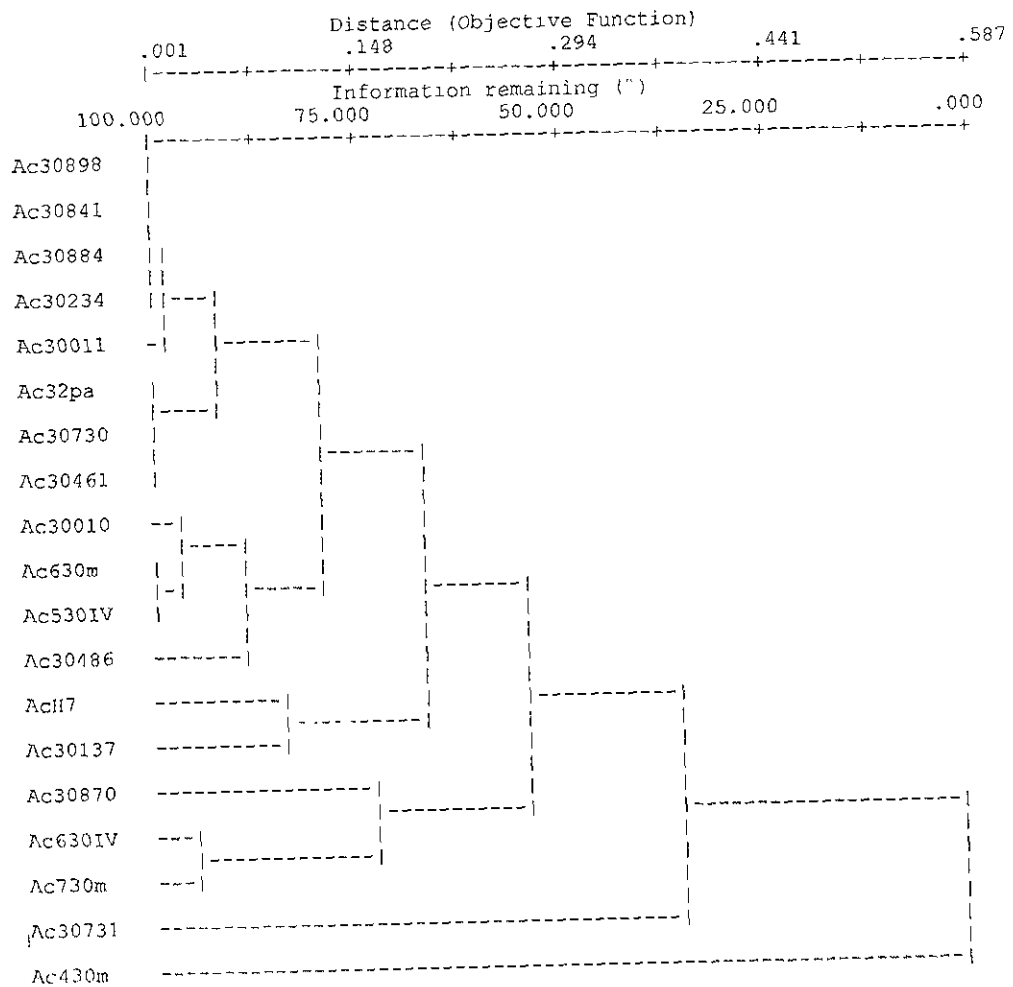
El tercer grupo formado por las cepas Ac H7 y 30137 similares en un 82%, unidas al primero y segundo grupo con un 68% de parecido, en el cuarto grupo encontramos las cepas Ac6301V y 730m

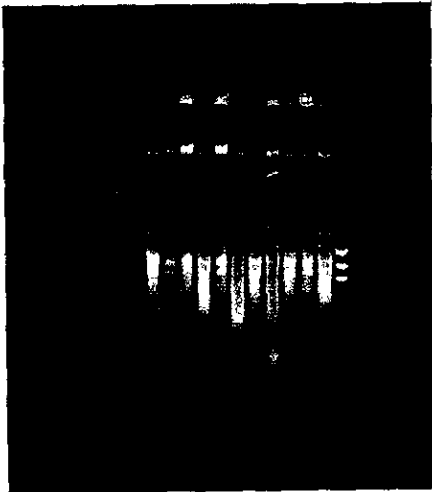
similares en un 96% y la 30870 con un 80% de similitud, este grupo se une a los anteriores en un 56%. Finalmente la cepa 30731 con un 48% de similitud con los grupos anteriores y la cepa 430m que no presenta similitud con las cepas tratadas con esta enzima.

Figura 3 - ANALISIS PROMEDIO DE GRUPOS NO PONDERADOS (DISTANCIA DE SORENSEN)

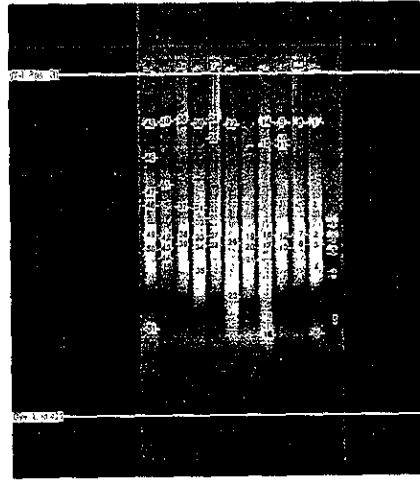
PC-ORD, Version 3.15

Análisis de ECOR-I Percent chaining = 38.32





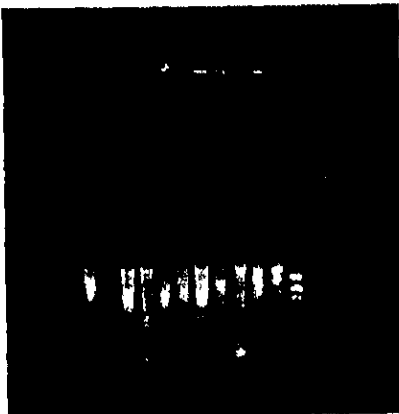
A



B

Figura 4 A.- Restricción con Bam HI 5U/2h a 37°C, Pozo 1 Marcador X174 digerido con HaeIII Pozos 2 a 12 30234, 30884, 30898, 30841,30461, 730m, 30870, 30010,30731,30869 y pozo12 digerido con EcoRI 30884. (La numeración de los pozos va de izquierda a derecha)
Figura 4 B.- Imagen obtenida en el digitalizador de imágenes del gel de la figura 4 A

Figura 5 - BamHI 4U/37°C por 2h Pozo 1 marcador X174 restringido con HaeIII. Pozos 2-12, 30841, Ac630, 30898, 30884, AcH7, 30461, Ac530, 32pa, 30011, 30870 y 30730.



Los dendrogramas obtenidos a partir de los pesos moleculares promedios de las bandas generadas por la restricción de **BamHI** son muy similares en ambos análisis de Sorensen (figura 6) y distancias euclidianas (no se muestra en los datos), en este caso se formaron cuatro grupos de cepas múltiples y dos de cepas únicas

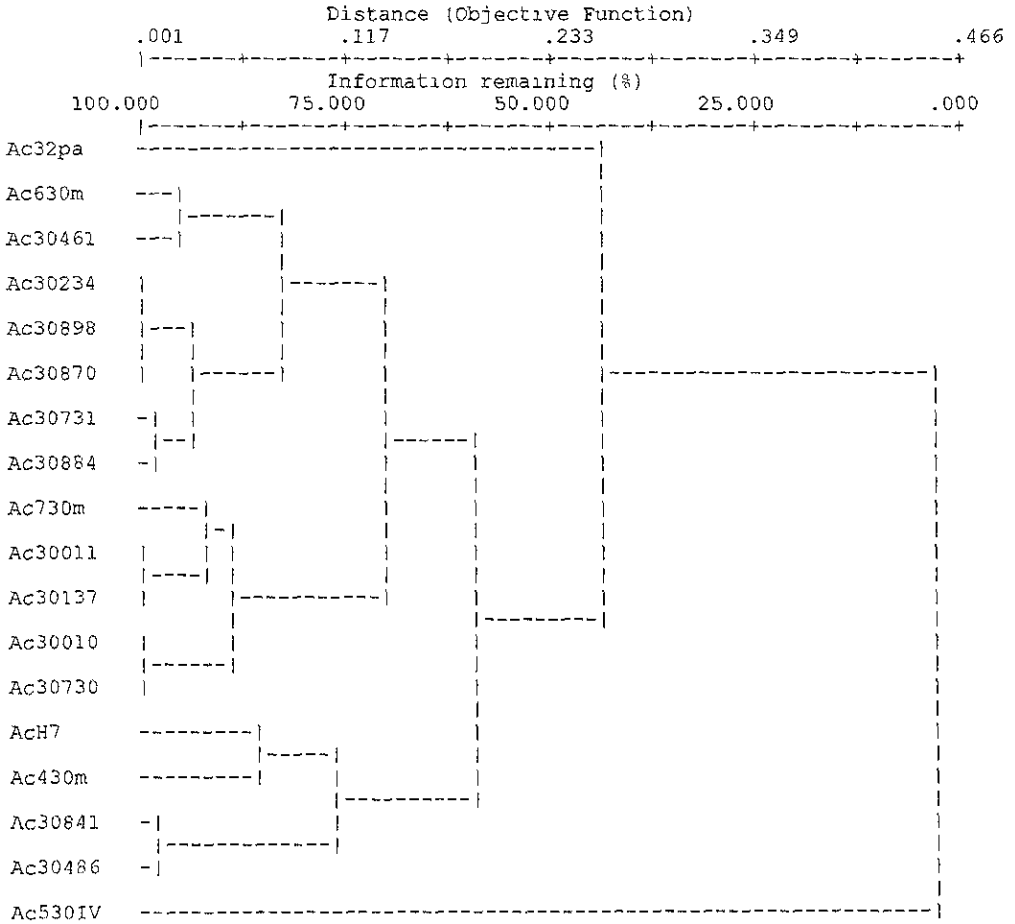
El primer grupo esta formado por las cepas 630m y 30461, similares en un 92%. En el segundo grupo encontramos a la cepa 30234, 30898,30870, con 100% de similitud y 30841 similar a la cepa 30884 en 98% y un 90% a las anteriores, este grupo es similar al primero en un 82%.

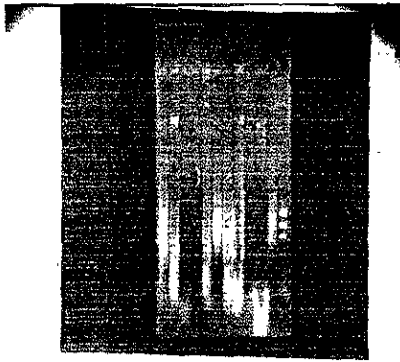
El tercer grupo este formado por las cepas 730m con 88% de parecido a las cepas 30011 y 30137 similares entre ellas en un 100% y las cepas 30010 y 30870 100% de similitud entre ellas y 85% a las anteriores, el cuarto grupo lo forman las cepas AcH7 y 430m con un 82% de similitud a las cepas 30481 y 30486 98% similares, ambas unidas con un 75% y los grupos de cepas únicas integrados por la cepa 32pa parecida a las demás en un 42% y la cepa Ac530IV que no se parece a las cepas probadas con esta enzima.

FIGURA 6. - ANALISIS PROMEDIO DE GRUPOS NO PONDERADOS
(DISTANCIA DE SORENSEN)

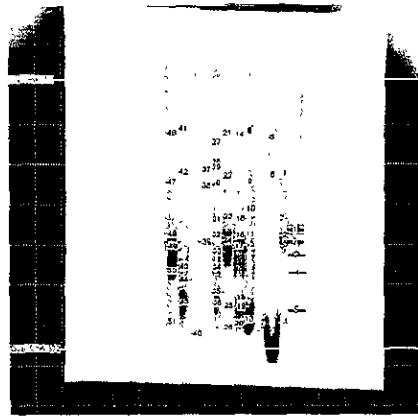
PC-ORD, Version 3.15

Análisis de BAMH-I
Percent chaining = 29.79





A



B

Figura 7 A.- Restricción con KpnI, 5U/37°C por 2h. Pozo 1 Marcador X174 restringido con HaeIII. Pozos 2-12, 30898, 30461, 30010, 30234, 30841, 30870, 30137, Ac530, 30867, 30731 y 630m

Figura 7 B.- imagen del mismo gel obtenida en el digitalizador.

La restricción con la enzima **Kpn I** generó los siguientes datos, el dendrograma construido sobre la base de la distancia euclidiana (no se muestra en los datos) agrupó a casi todas las cepas con un 100% de similitud, dejando la cepa Ac H7 con un 97% de similitud a las anteriores y la cepa 30137 que no se parece al grupo de las cepas tratadas con esta enzima.

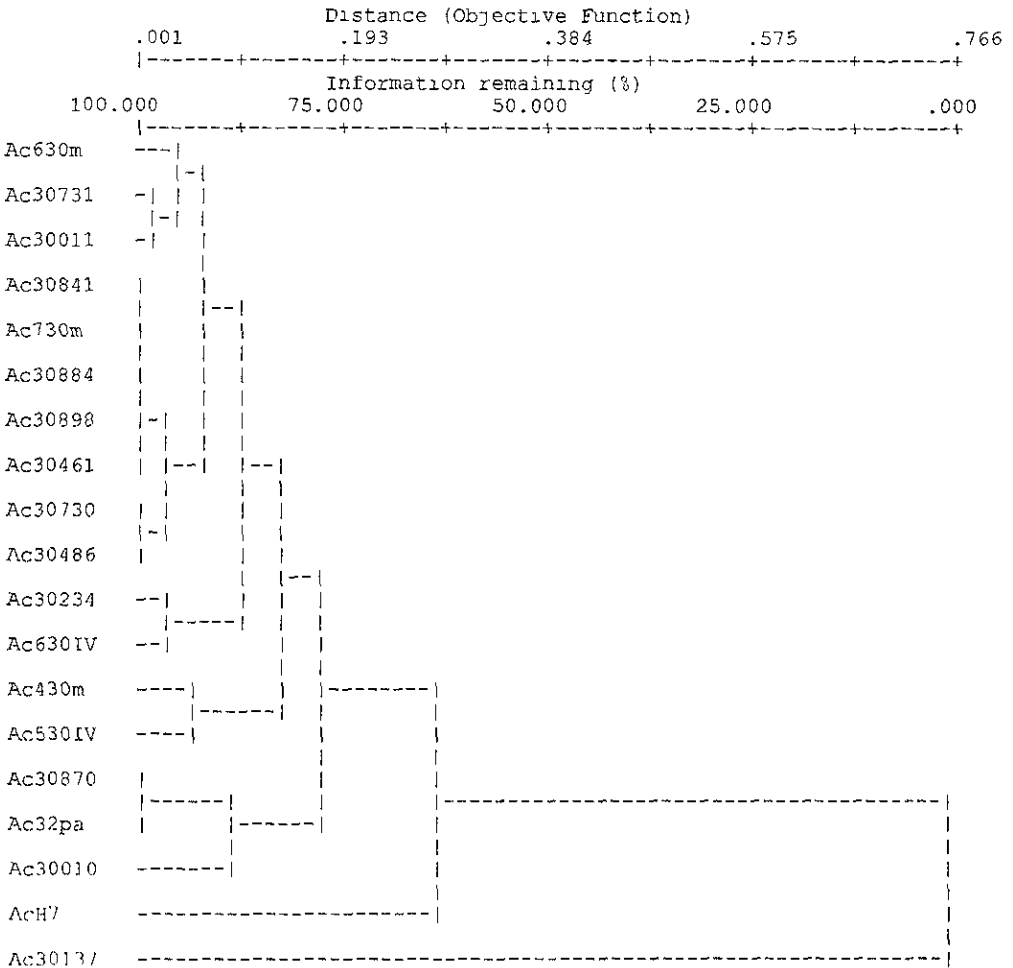
Con el análisis de Sorensen (figura 8) se formaron cuatro grupos de múltiples cepas y dos de cepas simples. El primer grupo está formado por la cepa 630m con un 93% de similitud con la cepa 30731 y a la 30011 98% similares entre ellas y la cepa 30481, 730m, 30884, 30898 y 30461 100% similares entre ellas y 93% similares a la 30730 y 30486 100% similares. Todas las cepas de este grupo se parecen un 86% al segundo grupo formado por las cepas 30234 y Ac630IV con 92% de similitud entre ellas. En el tercer grupo encontramos la cepa 430m y Ac530IV con 86% de similitud entre ellas y 78% a los grupos anteriores.

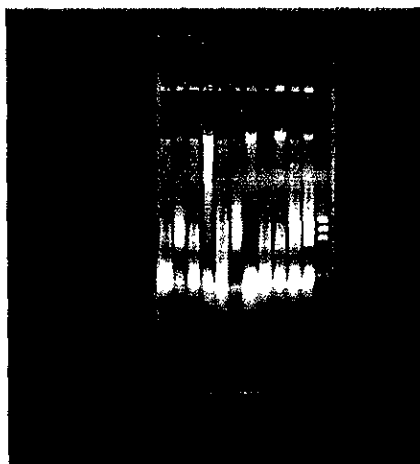
El cuarto grupo está formado por las cepas 30870 y 32 pa similares en 100% y la cepa 30010 82% similar a éstas, este grupo tiene un parecido del 75% similar a los grupos anteriores, la cepa AcI17 sin agrupamiento tiene un parecido de 63% a las cepas probadas y la cepa 30137 que no se parece con esta enzima a ninguna de las cepas probadas.

Figura 8 ANALISIS PROMEDIO DE GRUPOS NO PONDERADOS (DISTANCIA DE SORENSEN)

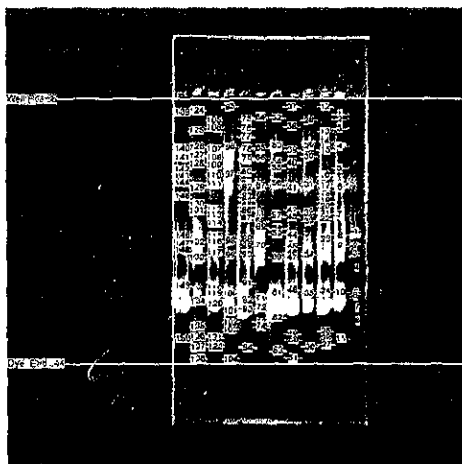
PC-ORD, Version 3.15

Análisis de KPN-I
 Percent chaining = 42.06





A



B

Figura 9A.- Digestión con HindIII 5U/2h a 37°C. Gel 14. Pozo 1 marcador X174 restringido con HaeIII. La numeración de las muestras va de izquierda a derecha. Pozos 2-12 cepas 30898, 630m, 30731, 30011, 30137, 30870, 32pa, 30010, Ac630, 30884, y30461.

Figura 9B.- Imagen del mismo gel obtenida en el digitalizador

En el caso de **Hind III** que fue la enzima que generó un mayor número de bandas por cepa, se elaboraron dos matrices de datos, una en la que se tomó en cuenta únicamente las bandas constantes que se logró visualizar en las fotos de todos los geles de la digestión con HindIII y otra en la que se tomaron en cuenta las bandas que se visualizaron en todas las repeticiones.

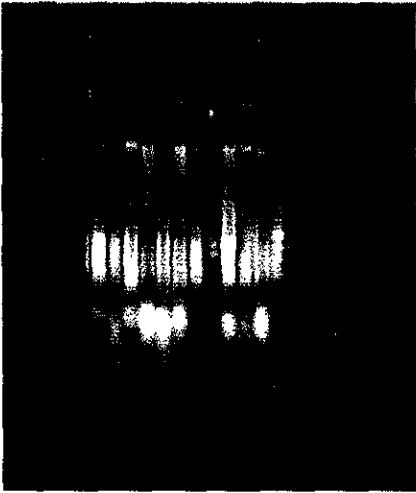


Figura 10. - Gel 10. Restringido con HindIII 5U/2h a 37°C. El pozo 1 es el marcador X174 digerido con HaeIII Pozos 2-12. Cepas 30841, 30730, AcH7, 30461, Ac630, 30898, 30234, 30011, 30884 y 32pa.

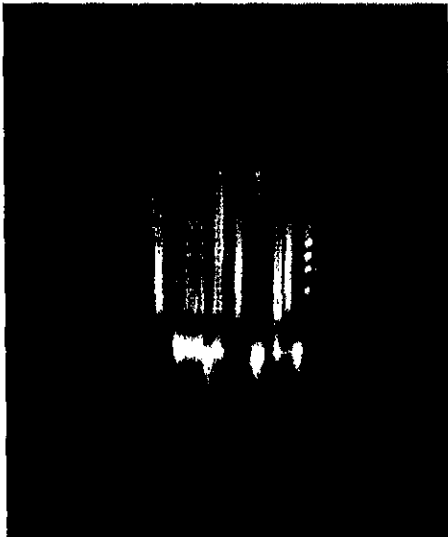


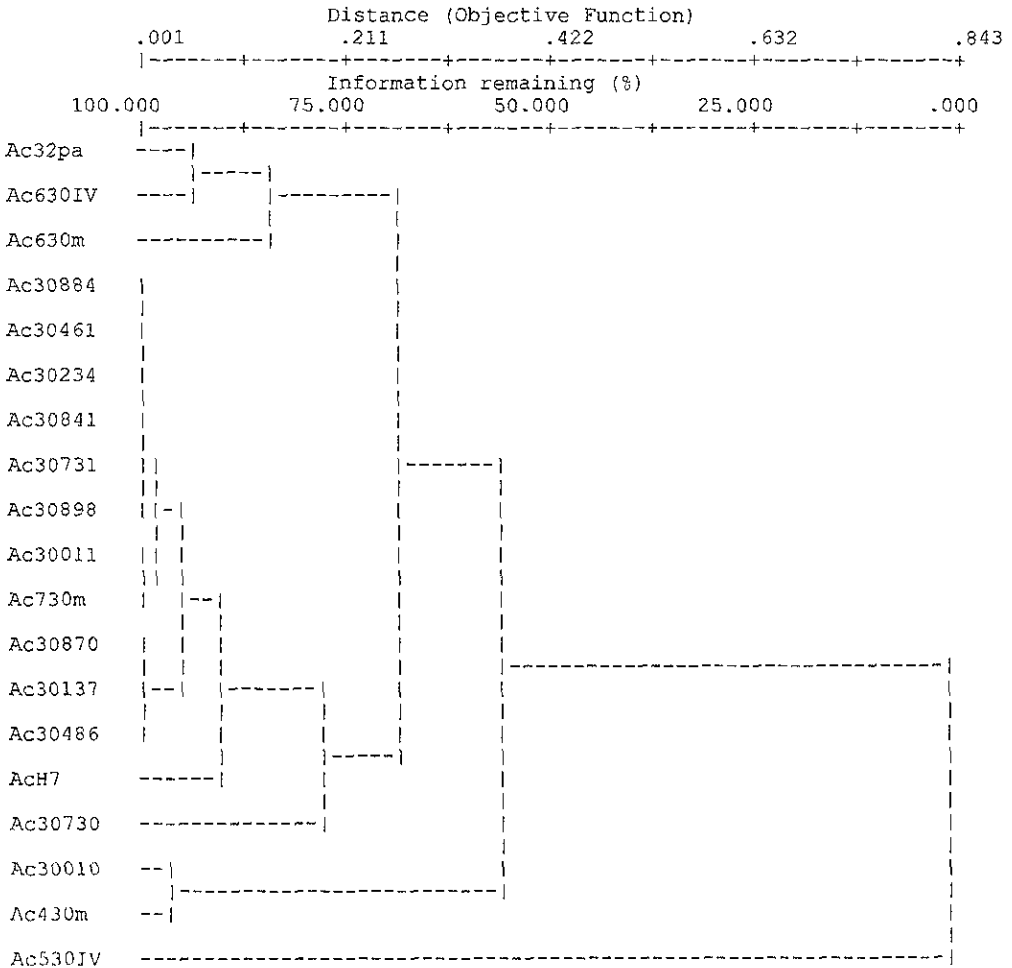
Figura 11.- Gel 19. Restricción con HindIII 5U/ 2h a 37°C Pozo 1 marcador X174 digerido con HaeIII. Pozos 2-16 Cepas: 30137, 630m, 30841, Ac530, 30011, 30870, 730m, 30234, 30486, 30867, 0898, 30461, 30010, 30430 y 30884.

Figura12.- ANALISIS PROMEDIO DE GRUPOS NO PONDERADOS (DISTANCIA DE SØRENSEN).

PC-ORD, Version 3.15

Análisis de Bandas constantes en HIND-III

Percent chaining = 45 79



Con los datos promedio de las bandas constantes para HindIII, se formaron tres grupos de cepas que son 99% similares en cuanto al análisis de distancias euclidianas (no se muestran los datos), estos mismos grupos aparecen con el análisis de Sorensen (figura 12) en el que se agrupan por la similitud que hay entre las cepas por el patrón de bandeo que se presenta en cada una. Los grupos formados por la similitud entre las cepas fueron, primero 32pa, Ac630IV y 630m, las dos primeras similares en un 92% y la tercera en un 85%. El segundo grupo está formado por las cepas 30884, 30461, 30234, 30841, 30731 y 30898 similares en un 100%, 30011 y 730m 100% de similitud entre ellas y 98% a las primeras 30870, 30137 y 30486 100% similares, AcH7 85% parecida y 30730 parecida en un 75%, el primero y segundo grupos comparten una similitud del 62%, el tercer grupo lo forman las cepas 30010 y 430m con una similitud de 92% entre ellas y un 58% similares a los dos grupos anteriores, la cepa Ac530IV no fue agrupada en este análisis con ninguna de las cepas probadas y no muestra ninguna similitud con éstas.

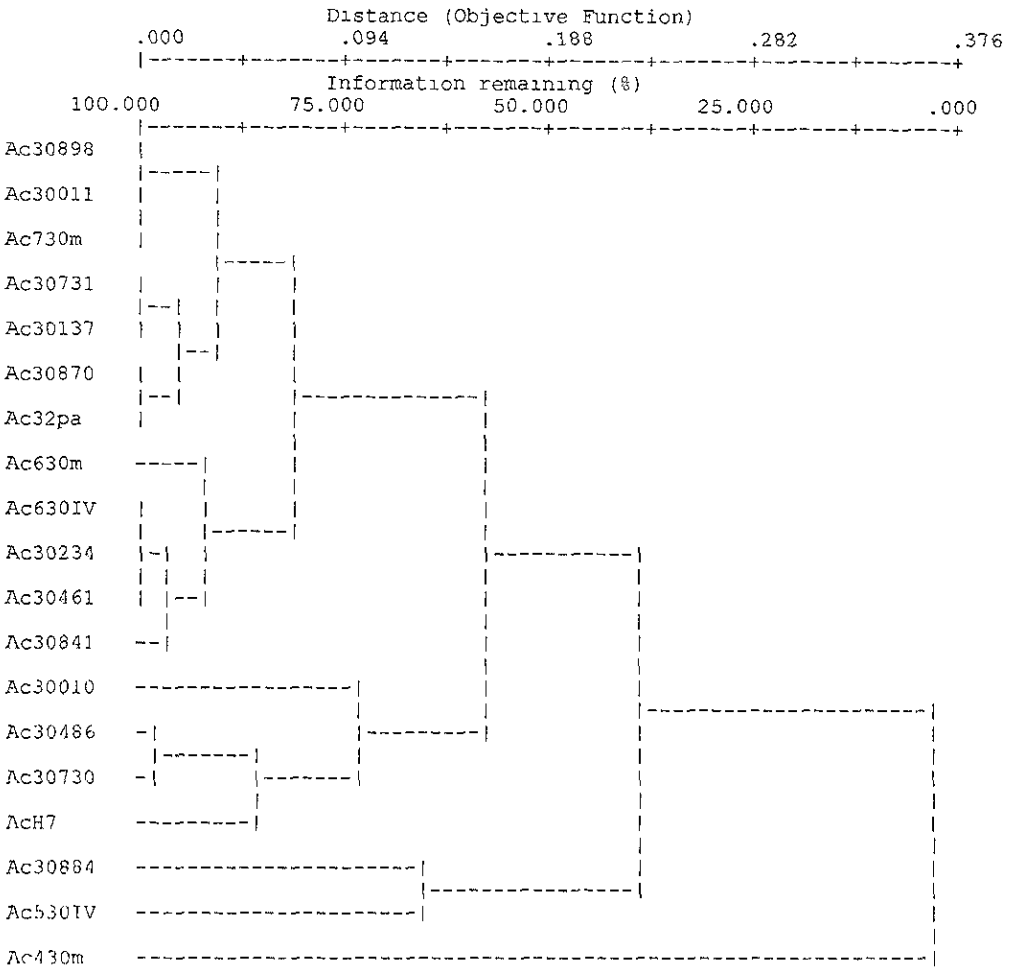
Figura 13. - ANALISIS PROMEDIO DE GRUPOS NO PONDERADOS

(DISTANCIAS DE SORENSEN)

PC-ORD, Version 3.15

Análisis de Todas las bandas con HindIII

Percent chaining = 26.17



Los dendrogramas que se formaron a partir de la matriz de datos que se forma al tomar en cuenta todas las bandas que aparecieron en las cepas restringidas, son muy similares para ambos análisis el de distancias euclidianas (no se muestra en los datos) y el de Sorensen (Figura 13), en este caso

se formaron cuatro grupos y una cepa quedó sin agrupar, el primer grupo esta formado por las cepas 30898, 30011 y 730m con 100% de similitud entre ellas, la cepa 30731 y 30137 también similares en un 100% y las cepas 30870 similar en 100% a la 32pa, éstas últimas parecida a las segundas en un 92% y todo el grupo apareció con una similitud del 90%. El segundo grupo, lo forman las cepas 630m con una similitud de 92% a las siguientes cepas Ac630IV, 30234, 30461 y 30841, las tres primeras similares en un 100% y la última en 96% a éstas, todo el grupo se parece al primer grupo en un 82%. El tercer grupo esta integrado por las cepas 30010 similar a las cepas 30486, 30730 similares en un 98% y ACh7 parecida a las últimas en un 85%, éste grupo se une a los dos anteriores en un 58%. El cuarto grupo lo forman las cepas 30884 y Ac530IV con poca similitud del 65% y finalmente la cepa 430m que en este caso no se parece a ninguna de las cepas probadas.

A partir de los datos generados por todos los geles se pudo observar que hay congruencia en la ordenación de algunas cepas con las cuatro enzimas probadas. Las cepas de referencia 30898 *A. castellanii*, 30841 *A. lenticulata* y 30884 *A. royreba* que están catalogadas como cepas patógenas en el catálogo de la ATCC, aparecen ordenadas en grupos estrechamente relacionados con las cuatro enzimas probadas, lo que permite apreciar que existe alguna relación entre las cepas patógenas aún cuando estén identificadas como cepas diferentes, del mismo modo, se pudo apreciar que la cepa 30730 también catalogada como patógena no pertenece al mismo grupo.

Por otra parte, se observó que las cepas 30898, 30011 y 30234 todas de referencia catalogadas como *A. castellanii* son muy similares en cuanto a los patrones de bandeo generados y la cepa 30010 también *A. castellanii* no esta muy relacionada a éstas, más bien aparece en otro grupo.

En cuanto a las cepas de *A. polyphaga* 30461 y 30486 que no fueron muy parecidas entre ellas, y aparecieron siempre en diferentes grupos, excepto con la enzima BamHI que fue la que presentó menor número de bandas y por lo tanto una relación más estrecha entre todas las cepas probadas en este estudio.

Observamos que las cepas 30870 *A. palestinensis* y la 30137 *A. astronixis* aparecen en el mismo grupo en los patrones generados por HindIII y Fco RI, estas dos cepas están reportados como muy similares para estudios hechos con patrones de isoenzimas por Daggett, (1985).

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la restricción enzimática del DNA total, se logró agrupar a las cepas de *Acanthamoeba* aisladas de ambiente identificadas morfológicamente con

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

algunas de las cepas de referencia probadas en este trabajo, con un alto porcentaje de similitud lográndose reconocer el 57% de las cepas problema, 14% se asoció a una especie diferente, mientras que el 29% de las cepas del ambiente no se relacionó con las cepas probadas en este estudio. Ver cuadro 4 (Identificación molecular de cepas del ambiente)

CEPA	IDENTIFICACION MORFOLOGICO	RESTRICCIÓN DEL DNA TOTAL
730m	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i> grupo 30011
32pa	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. palestinensis</i> grupo 30870
Ac 630IV	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i> grupo 30234
630m	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. polyphaga</i> grupo 30461
AcH7	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. polyphaga</i> grupo 30486
Ac 530IV	<i>A. tubiashi</i>	Sin agrupar
430m	<i>A. Hatchetti</i>	Sin agrupar

Cuadro 4.- Identificación molecular de cepas del ambiente.

DISCUSIÓN

El patrón de bandas o huella digital de las *Acanthamoebas* es el producto de la fragmentación del DNA total por las endonucleasas de restricción y la separación de los fragmentos por tamaño en el gel de agarosa (Call, *et al.* 1998). Una endonucleasa de restricción, reconoce y corta en una secuencia específica de pares de nucleótidos, generalmente de 4 a 6 de longitud con lo que el DNA se fragmenta en n segmentos después de la digestión con estas enzimas. Sin embargo, los patrones pueden variar porque la longitud de los fragmentos y los sitios de restricción varían con la secuencia de nucleótidos presente en el genoma tratado.

Todas las enzimas utilizadas en el tratamiento de las cepas son hexonucleasas, lo que significa que reconocen una secuencia de seis nucleótidos (ver cuadro 3), por lo que las 6 enzimas probadas tienen la misma probabilidad de encontrar al azar su secuencia de reconocimiento en el DNA de *Acanthamoeba*. El genoma de una célula eucariótica mayor a 20Kb puede ser cortado al azar cada 4096pb que es la probabilidad de encontrar la secuencia de los hexámeros que reconocen las enzimas. (Maniatis *et al.*, 1982). Por eso si las enzimas que se utilizaron en este trabajo cortaron únicamente secuencias que están presentes por azar, se esperaría el mismo número de bandas para todas las enzimas, lo cual no ocurrió, pues hubo mucha variación en el número de bandas obtenidas durante la restricción. A partir de los datos obtenidos, se pudo ver que las enzimas EcoRI y HindIII (Figuras 2, 9, 10 y 11), proporcionaron más información sobre las similitudes entre las cepas de *Acanthamoeba*, pues son las que generaron mayor número de bandas, lo cual sugiere que las secuencias de reconocimiento de estas enzimas no están en el genoma de *Acanthamoeba* por azar. No obstante, los patrones generados por BamHI y KpnI (Figuras 4, 5 y 7), fueron muy similares entre sí en cuanto al número de bandas que originaron, por lo que no sabemos si las enzimas cortaron únicamente al azar. Sin embargo, en el caso de BglI y XhoI, donde no se observó ningún patrón de banda, más bien aparecieron manchas o en algunas cepas de 2 a 3 bandas, lo que hizo pensar que tal vez la secuencia de reconocimiento de estas enzimas no se encontró en el genoma o quizá cuando se presentó alguna banda fue porque el DNA se fragmentó por azar, por lo que se muestra en estos resultados se puede apreciar que las enzimas EcoRI y HindIII, fueron las que permitieron discriminar con mayor seguridad entre las cepas del ambiente y de referencia asignadas en cada grupo, porque fueron las que generaron mayor número de bandas

En los corrimientos de algunos geles se presentaron bandas de restricción para algunas cepas que en otros geles no se alcanzaron a visualizar. Esto se debió principalmente a que la concentración del DNA no fue siempre la misma para la restricción, debido a que algunas cepas se cosecharon de cultivos monoxénicos. El número de trofozoitos que se obtuvieron en este tipo de cultivo no fue tan abundante como en los cultivos axénicos, por lo que la cantidad de DNA obtenida fue menor en los cultivos monoxénicos que en los cultivos axénicos.

Con el método UNSET no se requiere de grandes cantidades de organismos como las recomendadas para otros métodos, por lo que se logró obtener DNA suficiente para la restricción con los cultivos monoxénicos. La enzima HindIII generó la mayor cantidad de bandas en todas las cepas, aunque algunas de ellas (32 pa, 30011, 30884, 30461 y 30486) presentaron bandas muy notorias en algunos geles, mientras que en otros corrimientos eran menos visibles. Por eso se elaboraron dos matrices de datos, una en la que únicamente se tomaron en cuenta las bandas constantes que aparecieron en todos los geles, y otra en la que se tomaron en cuenta todas las bandas, aunque en algunos geles esas bandas no aparecieron. Esto permitió identificar con mayor seguridad a algunas cepas problema, las cuales aparecieron agrupadas con más cepas como muestran los resultados en los dendrogramas (figura 12) donde se tomaron en cuenta únicamente las bandas constantes.

La cepa 730m apareció muy cercana a la 30011 *A. castellana* y cuando se tomaron todas las bandas se agruparon con una o dos cepas de referencia, en este caso la cepa 730m no sólo se agrupó con la cepa 30011 en un 100% de similitud, sino que también se agrupó con la 30898 que también es *A. castellanii*. Del mismo modo, las cepas 32pa *A. polyphaga*, 630m *A. polyphaga*, y Ac630IV *A. castellanii* que aparecieron muy similares entre ellas, se separaron y se agruparon con las cepas de referencia 30870 *A. palestensis*, 30461 *A. polyphaga* y 30234 *A. castellanii* respectivamente que estuvieron apareciendo muy cercanas a éstas, lo que permitió ver cuáles fueron las cepas más parecidas. El que aparecieran bandas en algunos geles y en otros no con la enzima Hind III, se debió, posiblemente, a las condiciones de corrimiento que se manejaron. La variación en los corrimientos influyó mucho, sobre todo en la distancia que se presentó entre las bandas que aparecieron en cada una de las cepas en los diferentes geles, pues las variaciones en la localización de las bandas surgieron de los cambios en la longitud de los fragmentos, de los cambios de orientación de éstos en relación con la posición de los sitios de restricción en el cromosoma, con el tamaño de poro

presente en los geles (que depende de la concentración de la agarosa) y el voltaje que se aplica durante el corrimiento. Se observó que, cuando el voltaje es alto, las bandas de menor tamaño (menor número de bases por banda) corren más rápido que las de mayor tamaño, y cuando se disminuyó el voltaje las bandas pequeñas siguen corriendo mientras que las grandes casi no se mueven, esto se pudo observar claramente en las figuras(9, 10 y 11) de los geles 10, 14 y 19. Correspondientes solo a Hind III únicamente se presentó variación con las bandas mayores a 2000 pb pues las bandas de tamaño menor a 1300pb aparecieron siempre en todos los geles. Esto se debe a que los errores en la electroforesis se incrementan en función logarítmica del tamaño de la banda o fragmento de DNA, por ésta razón, las cepas 30011, 30486, 730m y 30884 del gel 19 presentaron bandas que en otros geles no aparecieron.

Las cepas 630m, 32pa, Ac630IV y 30461 también mostraron bandas que sólo aparecieron en el gel 14. Pero la cepa 32pa mostró mayor variación en la presencia ausencia de estas bandas. Algunas de las bandas no aparecieron en varios geles de las cepas restringidas con HindIII debido a que al reducir el voltaje algunas de las bandas no se alcanzaron a separar y por eso es que no se apreciaron. En los últimos geles se manejaron las mismas condiciones de corrimiento para todos ellos, de forma que fuera más sencilla la comparación entre las bandas de las cepas.

Para disminuir posibles errores se tuvieron que comparar los perfiles de bandeo en todos los geles, y se calculó el tamaño promedio de cada una de las bandas que aparecieron en todas las muestras. De esta forma, al comparar las fotos de los diferentes geles, se pudo obtener el peso molecular promedio de las bandas presentes en las cepas probadas, aún cuando la misma banda apareció a diferentes distancias en dos o más geles.

Los resultados presentados en este trabajo, permitieron asociar a las cepas del ambiente con grupos de cepas de referencia, como se aprecia en el cuadro 4 (identificación molecular de cepas del ambiente). Cuatro de las cepas probadas correspondieron a la identificación morfológica asignada, una de las cepas, la 32pa, identificada como *A. polyphaga*, no pudo ser comparada con otras *A. polyphaga*, debido a la falta de cepas de referencia, por lo que no se pudo descartar que pertenezca a alguno de los grupos moleculares de *A. polyphaga*, aunque se pudo observar que esta estrechamente relacionada con la cepa 30870 *A. palestimensis* por lo que se identificó como perteneciente a este grupo, y las cepas Ac530IV y 430m no pudieron ser relacionadas con ninguna

de las cepas de referencia probadas en este estudio, por lo que se tendrían que hacer patrones de bandeo con las cepas de referencia de las demás especies de *Acanthamoeba*, puesto que aún cuando se asignaron por morfología a alguna de las especies reconocidas, se observó que una misma especie presentó variantes moleculares entre sus cepas, pues aparecieron diferentes patrones de bandeo en distintas cepas que por morfología pertenecían a la misma especie, por lo que no se reunieron todas en el mismo grupo. Lo anterior se explica por los resultados de Stothard, *et al.*, (1998), donde al secuenciar la subunidad 18s del RNAr de varias cepas de *Acanthamoeba* se encontró que diferentes cepas de referencia catalogadas como una misma especie, presentaron secuencias diferentes. Anteriormente, Kilvington (1991), analizó 33 cepas de *Acanthamoeba* causantes de queratitis, todas las cepas fueron morfológicamente idénticas, y sin embargo encontró que estas cepas se podían asignar a varios grupos moleculares de acuerdo con los RFLPs que se generaron por la restricción del DNA total.

En este trabajo se pudo observar que las identificaciones de las especies del género *Acanthamoeba* por el método de restricción enzimática del DNA total no sólo es muy confiable, si no que también nos proporciona información acerca de la relación a nivel molecular de las cepas que por medio de otros métodos de identificación no se logra establecer, como son el inferir si existe alguna probabilidad de que las cepas puedan ser patógenas, pues se pudo observar que de las cuatro cepas catalogadas como patógenas 30884, *A. royreba*, 30841 *A. lenticulata*, 30898 *A. castellanii* y 30730 *A. hatchetti*, las tres primeras aparecieron siempre agrupadas juntas en los resultados de todas las enzimas probadas, lo que nos hizo creer que posiblemente exista algún o algunos segmentos de DNA que les confiera información para el desarrollo de la patogenicidad. Sin embargo, con los antecedentes que se tienen sobre el género *Acanthamoeba*, todas las cepas son potencialmente patógenas, por lo que son necesarios estudios adicionales para la identificación apropiada en éste sentido.

Con los datos obtenidos en el presente trabajo, se pudo observar que el 57% de las cepas correspondieron a la identificación morfológica, el 14% se asignó a un grupo de diferentes especies, aunque no se descartó la identificación hecha por morfología y el 28% de las cepas no pudieron ser identificadas molecularmente por falta de más patrones de comparación en cuanto al número de cepas de referencia utilizadas en este estudio.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se logró apreciar que las identificaciones a nivel morfológico fueron más o menos precisas. Sin embargo, se observó que existen variantes moleculares para una misma especie, es interesante apreciar que, en la identificación por el patrón de bandeo que se forma al digerir el DNA total con endonucleasas de restricción, las cepas que fueron identificadas morfológicamente como una misma especie (morfológicamente idénticas), pudieron agruparse en diferentes grupos moleculares. Esto permitió hacer un reconocimiento más preciso de las variantes intraespecíficas de *Acanthamoeba*, e incluso, permitió diferenciar entre ecotipos de este género, esto es importante por que el género *Acanthamoeba* presenta especies que son patógenas oportunistas del hombre y de otros animales, y además las diferentes cepas pertenecientes a la misma especie responden de diferentes formas frente a los mismos antiamebianos.

A partir de este trabajo se podrá relacionar la forma en que actúan los tratamientos con antiamebianos sobre las cepas patógenas y no patógenas de los diferentes grupos moleculares, lo que permitirá buscar compuestos efectivos para el tratamiento de cada cepa en particular. De esta forma, con el diagnóstico que se tenga de algunas cepas se podrá recomendar un tratamiento que sea el más adecuado contra dichas amebas. Del mismo modo el reconocimiento de las cepas a nivel molecular puede ayudar en estudios epidemiológicos, en la búsqueda de sustancias amebicidas y en la elaboración de un catálogo de las cepas de *Acanthamoeba* en el Estado de México a partir de las cepas del suelo.

Para continuar con los estudios propuestos en este trabajo, es recomendable utilizar mayor número de enzimas diferentes a BglI, XhoI, BamHI y KpnI, pues aunque las dos últimas enzimas mostraron una buena cantidad de bandas en los patrones de cada cepa tratada, estos patrones no tuvieron el mismo nivel de resolución que los generados por EcoRI y HindIII.

BIBLIOGRAFIA

- Caetano-Anollés, G. (1993). Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers *PCR Methods and Applications*, 3: 85-93.
- Call, D. R., Hallett, J. G., Mech, S. G., y Evans, M., (1998). Considerations for measuring genetic variation and population structure with multilocus fingerprinting. *Molecular Ecology*, 7: 137-1346.
- Daggett, P. M., Lipscomb, D., Sawyer, T. K. Y Nerard A. T., 1985. A molecular approach to the phylogeny of *Acanthamoeba*. *Biosistem*, 18:399-405.
- De Jonckheere, J. F., 1987 Characterization of *Naegleria* species by restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24: 55-66.
- Dean, R. y Arnold, J.(1996). Cytonuclear disequilibria in hybrid zones using RAPD markers *Evolution* 50. 1702-1705.
- Dirie, M. F, Murphy, N. B. y Gardiner, P. R , (1993). DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. *Journal of Eukariotic Microbiology*, 4 132-134
- Gast, R J, Leede, D. R., Fuerst, P. A., y Byerst, T. J., (1996). Subgenus systematic of *Acanthamoeba*: Four nuclear 18s rDNA Sequence Types, *Journal of Eukariotic Microbiology*, 43:498-304.
- Graham, C. C., (1997). Riboprinting A tool for the study of genetic diversity in microorganisms. *Journal of Eukariotic Microbiology*, 44:277-283.
- Goldenberger, D., (1995) A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible whit direct PCR amplification., *PCR Methods and Applications*, 4: 368-370.
- Hadrys, II., Balick, M. y Schierwater, B., (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1:55-63
- John David T., (1993). Oportunistically pathogenic free-living amebae, *Parasitic Protozoa 2nd*. Edition, Vol 3 Academic Press,Inc., San Diego. p.p.139-246.
- Johnson, A M., Fielke, R., Cristy, P. E., Robinson, B. y Baverstock, P R , (1990). Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *Journal of General Microbiology*, 136 1689-1698
- Kilvington, S., Beeching, J R y White, D G , (1991) Differentiation of *Acanthamoeba* strains from

infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell-DNA *Journal of Clinical Microbiology*, 29:310-314.

Kinoshita, M., Shin, S. y Aono, T., (1993). A sensitive and quantitative method for determination of number of HPV16 DNA copies by using the competitive polymerase chain reaction, *GATA* 10:116-121

Laguette, G., Mavingui, P., Allard, M. R., Charnay, M. P., Louvrier, P., Mazurier, S. I., Rigottier-Guis, L. y Amarger, N., (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic genes regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and ITS Different Biovars, *Applied and Environmental Microbiology*, 62:2029-2036.

Liang, P. y Pardee, A. B., (1992). Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science*, 254:967-970.

Lu, Z., Douthitt, M. P., Taffs, R. E., Ran, Y., Norwood, L. P., y Chumakov, K. M. (1993), Quantitative aspects of the mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage (MAPREC). *PCR Methods and Applications*, 3: 176-180.

Ma, P., Visvesvara, G. S., Martinez, A. J., Theodore, F. H., Daggett, P. M. y Sawyer, T. K. (1990) *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Review of Infectious Diseases*, 12:489-512.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982), *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 545 p

Martinez, A. J., (1980). Is *Acanthamoeba* encephalitis and opportunistic infections? *Neurology* 30: 567-574

Martinez, A. J. y Visvesvara, G. S., (1997). Free-living amebic and opportunistic amebas, *Brain Pathology*, 7: 583-598

Moyer, C. L., Tiedje, J. M., Dobbs, F. D. y Karl, D. M., (1996). A computer simulated restriction fragments length polymorphism analysis of bacterial Small-Subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 62. 2501-2509.

Page, F., (1967). Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with description of three species, *Journal of protozoology*, 14: 709-724

- Pussard, M., Ponds, R., (1977) Morfologie de la paroi kistique et taxonomie due genere *Acanthamoeba*, protozoa amoebida. *Protistologica*, 13: 557-598.
- Rodriguez-Zaragoza, S , (1994), Ecology of free-living amoebae, *Critical Reviews in Microbiology*, 20:225-241
- Rodríguez-Zaragoza,S. y García,S. (1997). Species richness and abundance of naked amebae in the rhizoplane of the desert plant *Escontria chiotilla* (Cactaceae), *Journal of Eukariotic Microbiology*, 44:122-126.
- Schuster, F.L., y Visvesvara, G.S. (1998). Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas, *Journal of Eukariotic Microbiology*, 45: 612-618
- Vanacova, S., Tachezy, J., Kulda, J , y Flegl, J., (1997). Characterization of tricomonad species and strains by PCR fingerprinting. *Journal of Eukariotic Microbiology*,. 44. 545-552.
- Vodkin, M. H., Howe, D K , Visvesvara, G. S y Mc. Laughlin, G. L., (1992). Identification of *Acanthamoeba* at the generic and especific levels using the polymerase chain reaction. *Journal of Protozoology*, 39:378-385.
- Weekers, P. H. H , Gast, R. J., Fuerst, P A y Byers, T. J., (1994) Sequence variations in small-subunit ribosomal RNAs of *Hatmannella vermiformis* and their phylogenetic implications *Moleculer Biology and l'volution*,. 11: 684-690
- Yagita, K , y Endo, T. (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *Journal of Protozoology*, 37: 570-575.