

30377

3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS PARA  
LA IDENTIFICACIÓN DE LA AMIBA DE VIDA LIBRE  
*Naegleria fowleri*.

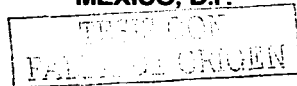
**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A  
MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

MÉXICO, D.F.



JULIO, 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de marzo de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Rodríguez Monroy Marco Aurelio, con número de cuenta 77170792, con la tesis titulada: "*Reconocimiento de antígenos específicos para la identificación de la amiba de vida libre Naegleria fowleri*", bajo la dirección de(a) Dra. Patricia Bonilla Lemus.

Presidente:	Dra. Edda Lydia Sciutto Conde
Vocal:	Dr. Rafael Campos Rodríguez
Secretario:	Dra. Patricia Bonilla Lemus
Suplente:	Dra. Martha Legorreta Herrera
Suplente:	Dra. Leticia Moreno Fierros

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de mayo de 2003.

Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **RECONOCIMIENTO**

**El presente trabajo fue apoyado por DGAPA clave IN – 211300  
y DGAPA clave IN - 217902**

**Durante la realización de esta tesis de Maestría el alumno fue becario de  
CONACYT con número de registro: 158319.**

**Fue asesorado por el siguiente Comité Tutorial:**

**Dra. Patricia Bonilla Lemus**  
(Tutor Principal)

**Dra. Edda Lydia Sciutto Conde**

**Dra. Martha Legorreta Herrera**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Bonilla Lemus, tutora principal, gracias por la confianza y la oportunidad que me brindó para realizar este proyecto.  
Al Comité Tutorial, formado por las Doctoras Edda Sciutto y Martha Legorreta que a lo largo del proyecto lo enriquecieron con sus puntos de vista y sugerencias.  
Al Proyecto CyMA y a todos sus integrantes.

De manera más informal pero con igual cariño, quiero agradecer a los siguientes: El orden no tiene ninguna importancia, todos de alguna forma tuvieron que ver con este proyecto. Me gustaría empezar con Araceli, gracias por tu "complicidad" pero sobre todo por tu amistad. Gracias a Aldo, Miguel y Saúl (los Tres Fantásticos), a Xavier (cubanísimo), a todos los integrantes del laboratorio de Inmunidad de Mucosas (tanto al club de Tobi y de Lulú pa no decir chavos y chavas), a Ricardo (por aventarme a esta aventura), a Esperanza (otra cómplice), a Gaby y Adriana (las nauyacas del Dr. Campos), a César, al Willy y al Trini (por lo vivido y por lo que falta), a Alex (compañero de presentaciones, tareas y frustraciones, creo que a su próximo hijo le pondrá "Vázqueznin"), a Max. También a Maga, Marco y Mario (mis terribles encantos que tiene el hogar), al Migue, el Rulis y la Jechu (mis orígenes y raíces), a Silvio y la Trop@ Cósmica, a Elier, Samy y Sebastián (mis sobrinitos), a Dono (hijo de a mentis) a Natalia y Jack (por el valor de volver a empezar), a la Sra. Margarita (por lo que me manda los domingos). A todas las personas que siempre tuvieron el pequeño detalle como prestar una compu, una impresora, regalarte un diskette, hojas, etc., que al sumarlos lograron hacer que esto tomara forma y llegar a buen fin. A todos, mil gracias!!

## AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Sería injusto no hacer una mención especial a tres personas que fueron fundamentales para el desarrollo del presente trabajo y que jugaron un papel importante no solo académico sino también personal,

A la **Dra. Leticia Moreno Fierros**, por el espacio, por el tiempo, los recursos y sobre todo por la confianza, espero no defraudarla, ponerme las pilas y hacerla enojar un poco menos.

Al **Dr. Rafael Campos Rodríguez** por la paciencia, por su disponibilidad a explicarme siempre las cosas, por las ideas, por su amistad, por aceptarme en su laboratorio, por los trabajos y por la confianza. Gracias Doctor.

A mi amigo, el futuro **Dr. Saúl Rojas Hernández**, simplemente, por todo, por el tiempo, las enseñanzas, los corajes y las burlas, pero lo más importante, gracias por la amistad, por compartir las risas, los proyectos, las penas, los sueños y las desvergüenzas, eso no tiene forma de describirse ni texto que lo aguante, ni grado que lo opaque. Gracias, muchas gracias.

TESIS CON  
FALLA DE CALDEN

## DEDICATORIA

En el mundo de la investigación, para alcanzar logros importantes requieres de un buen equipo de trabajo. Sin embargo, no todo en la vida es ciencia, y para aprender a vivir requieres de un equipo muy especial, un equipo de vida que siempre está a tu lado para ayudarte a crecer, luchar, soñar, vivir. Vaya pues, esta dedicatoria a mi equipo, este logro es de todos ustedes, no solo mío

### A mi Madre:

No solo por darme la vida, sino porque eres la persona que siempre ha estado a mi lado, sin importar mis defectos, ni mi falta de agradecimiento. Por cobijarme con tu amor en todo momento, por ser mi sol, mi noche, mi cielo, mi lluvia, mi todo, gracias JECHU.

### A mis Hermanos Miguel y Raúl:

Por burlarnos de las travesuras y llorar con la muerte. Por compartir la fuerza de la Vida, el sabor amargo de cada caída y siempre estar prestos para ayudarme a levantarme con renovada fortaleza.

### A mis Hijos Marco y Mario:

Este trabajo se realizó con ustedes y para ustedes. Tal vez aún no lo entiendan pero han de saber que son mi motivo para luchar día tras día. Ustedes son la alegría y la sonrisa de mi vida, me han dado la mayor felicidad y también el reto más difícil, que es ser un buen ejemplo para ustedes.

### A Margarita:

Por estar siempre al pendiente de todo, por tu compañía, por tus palabras, por tu aliento. Porque eres parte de este intento, de esta causa, de este sueño. Y no hay maestría, grado o artículo que valga más que saberte a mi lado, siempre conmigo.

### A mis muertos Alicia y Papá:

Porque aún los sigo buscando:

*Más allá de sol  
Más allá del mar  
Más allá de Dios  
Un poco más allá  
Más allá del bien  
Más allá del mal  
Más allá después  
Un poco más allá*

*Ellos se fueron  
De mi vida  
Sin decir adiós, sin saber  
por qué?*

*Y se escondieron  
Aún más allá*

*Se echaron a correr  
Se echaron a volar  
Y se me perdieron  
Aún más allá.*

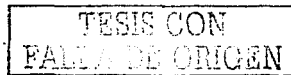
*Más allá de sol  
Más allá del mar  
Más allá de Dios  
Se fueron más allá*

### Y por último se lo dedico a La Vida:

*La vida de un pájaro en  
vuelo  
la vida de un amanecer  
la vida de un crío  
de un bosque y de un río  
la vida me ha hecho saber.  
La vida del sordo y del ciego  
la vida que no sabe hablar  
la del triste loco  
la que sabe a poco  
la vida me ha hecho soñar.  
La vida voraz que se enreda  
la vida que sale a jugar  
la vida consciente que queda  
la vida que late en el mar.  
La vida que brota de un  
muerto  
la vida que no se murió  
la de los desiertos  
la de un libro abierto  
la vida me ha hecho cual yo.  
La vida que alumbró en el  
trueno  
la vida final de un adiós  
la vida goteando de un seno  
la vida secreta de un dios.  
La vida que pende de todo  
la vida de cada emoción  
la vida en exceso  
la vida de un beso  
la vida me ha hecho canción.*

SR

CV



## INDICE

Lista de abreviaturas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	viii
Resumen	1
Introducción	2
• Generalidades	2
• Morfología y ciclo de vida	3
• <i>Naegleria</i>	4
• Infecciones en humanos	6
• Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP).	6
• Mecanismos de patogenicidad	7
Antecedentes	10
• Infecciones por amibas de vida libre	10
• Respuesta inmune	12
Justificación	13
Objetivos	14
Material y Métodos	15
• Animales	15
• Cultivos	15
• Reactivación de la virulencia	15
• Obtención del extracto amibiano	16
• Obtención de anticuerpos séricos de conejo	16
• Electroforesis e Inmunoblot	17
• Pruebas de Adsorción	17
Resultados	19
Discusión	35
Conclusiones	38
Bibliografía	39
Apéndices	47

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## Lista de Abreviaturas.

<b>AVL</b>	Amibas de vida libre
<b>Ac</b>	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
<b>APS</b>	Persulfato de Amonio
<b>ATTC</b>	American Type Culture Collection
<b>CyMA</b>	Conservación y Mejoramiento del Ambiente
<b>EAG</b>	Encefalitis amibiana granulomatosa
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>Eh</b>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<b>FLA</b>	Free-living amebae
<b>IPN</b>	Instituto Politécnico Nacional
<b>kDa</b>	Kilo Daltones
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>MCN</b>	Material citopatogénico de <i>Naegleria</i>
<b>MEAP</b>	Meningoencefalitis amibiana primaria
<b>Nf</b>	<i>Naegleria fowleri</i>
<b>PAM</b>	Primary amebic meningoencephalitis
<b>PBS</b>	Amortiguador de Fosfatos salinos
<b>PBS-T</b>	Amortiguador de Fosfatos salinos con Tween
<b>PHMB</b>	Ácido P-Hidroximercuribenzoico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de zinc

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Patrón de proteínas de los diferentes extractos amibianos	21
Fig. 2. Patrón de reconocimiento de antígenos de <i>N. fowleri</i>	23
Fig. 3. Patrón de reconocimiento de antígenos de <i>E. histolytica</i>	24
Fig. 4. Patrón de reconocimiento de antígenos de <i>A. culbertsoni</i>	24
Fig. 5. Reacciones cruzadas de anticuerpos anti- <i>N. fowleri</i>	26
Fig. 6. Reacciones cruzadas de anticuerpos anti- <i>E. histolytica</i>	28
Fig. 7. Reacciones cruzadas de anticuerpos anti- <i>A. culbertsoni</i>	30
Fig. 8. Antígenos específicos de <i>N. fowleri</i>	33

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la reactivación de la virulencia para <i>N. fowleri</i>	20
Tabla 2. Pesos moleculares de los antígenos reconocidos con suero anti- <i>N. fowleri</i>	27
Tabla 3. Pesos moleculares de los antígenos reconocidos con suero anti- <i>E. histolytica</i>	29
Tabla 4. Pesos moleculares de los antígenos reconocidos con suero anti- <i>A. culbertsoni</i>	31
Tabla 5. Pesos moleculares de los antígenos específicos reconocidos con suero anti- <i>N. fowleri</i> adsorbido con los extractos totales de <i>E. histolytica</i> y <i>A. culbertsoni</i>	34

TESIS CON  
FOLIO DE ORIGEN

# RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA AMIBA DE VIDA LIBRE *Naegleria fowleri*.

## 1. RESUMEN.

El interés médico por las amibas de vida libre (**AVL**) se ha venido incrementando al saber que pueden provocar la muerte. Este hecho reviste mayor importancia si se considera que las **AVL** potencialmente patógenas pueden ser encontradas con facilidad en cuerpos de agua de uso recreativo e industrial. *Naegleria fowleri* es capaz de provocar meningoencefalitis amibiana primaria (**MEAP**) que ocasiona la muerte en un lapso de 3 a 7 días, su periodo de incubación varía de 2 días a 3 semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia de las amibas. El presente trabajo se realizó con el propósito de determinar si existe reactividad cruzada de los anticuerpos anti *N. fowleri* con otros antígenos amibianos (*Acanthamoeba culbertsoni* y *Entamoeba histolytica*), e identificar antígenos específicos de *N. fowleri* que puedan ser útiles para el diagnóstico. Se reactivó la virulencia de *N. fowleri* pasándola por ratón y recuperando las amibas en medio axénico. Se obtuvieron extractos de *N. fowleri*, *A. culbertsoni* y *E. histolytica* por sonicación y se analizó el patrón de proteínas por electroforesis. Se inmunizaron conejos con extractos de las tres especies de amibas para obtener anticuerpos específicos para cada una de ellas. Y el reconocimiento de los anticuerpos se analizó por inmunoblots. Se realizaron adsorciones de los anticuerpos anti-*N. fowleri* con extractos fijados de las tres amibas para tratar de identificar antígenos específicos de *N. fowleri*. Mediante los inmunoblots se encontró que existen reacciones cruzadas entre *N. fowleri*, *A. culbertsoni* y *E. histolytica*. Siendo más fuerte este tipo de reacción entre *N. fowleri* y *E. histolytica*. Esta reacción cruzada puede explicar la baja incidencia de **MEAP** a pesar de la amplia distribución de *N. fowleri*. A través de las adsorciones se encontraron 9 antígenos específicos de *N. fowleri* que pueden ser útiles para el diagnóstico de la **MEAP** y cuyos pesos moleculares son: 143, 116, 90, 75, 49, 46, 38, 24 y 15 kDa.

### 1.1. SUMMARY.

The medical interest for free-living amoebae (**FLA**) has been increasing due to the knowledge that they can cause the death. This fact has importance if it is considered that the **FLA** potentially pathogenic can be found with facility in waters bodies of recreative and industrial use. *Naegleria fowleri* is able to cause a rapidly fatal infection involving the central nervous system called primary amoebic meningoencephalitis (**PAM**), that causes the death in a lapse from 3 to 7 days, its period of incubation varies from 2 days to 3 weeks, depending on the size of the inoculum and of the virulence of the amoebas. The present work was realized with the purpose of determining if cross reactivity of the antibodies anti-*N. fowleri* exists with other amoebae antigens (*Acanthamoeba culbertsoni* and *Entamoeba histolytica*), and to identify specific antigens of *N. fowleri* that can be useful for the diagnosis. The virulence of *N. fowleri* was reactivated passing it by mouse and recovering the trophozoites in axenic medium. Extracts of *N. fowleri*, *A. culbertsoni* and *E. histolytica*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

were obtained by sonication and the pattern of proteins was analyzed by electrophoresis. Rabbits were immunized with extracts of the three species of amoebas to obtain specific antibodies for each one of them. And the recognition of the antibodies was analyzed by immunoblots. Adsorptions of the antibodies anti-*N. fowleri* with fixed extracts of the three amoebas were realized to try to identify specific antigens of *N. fowleri*. By immunoblots, it was found that cross reactions exist among *N. fowleri*, *A. culbertsoni* and *E. histolytica*. Being stronger this reaction type between *N. fowleri* and *E. histolytica*. This cross reaction can explain the **PAM**'s low incidence in spite of the wide distribution of *N. fowleri*. Through the adsorptions, 9 specific antigens of *N. fowleri* were found and they can be useful for the diagnosis of **PAM** and whose molecular weights are: 143, 116, 90, 75, 49, 46, 38, 24 and 15 kDa.

## 2.INTRODUCCIÓN.

### 2.1.GENERALIDADES.

Las amibas de vida libre se encuentran en todo tipo de ambiente y su distribución es cosmopolita. Ocupan un lugar importante en la cadena alimenticia de las comunidades naturales donde hay agua, alimentándose de bacterias, hongos, algas y otros protozoarios (Wellings *et al.*, 1979; Pelczar *et al.*, 1982).

Las amibas de vida libre (**AVL**) son un pequeño grupo de protozoarios de gran importancia ecológica y médica. Son organismos oportunistas capaces de producir infecciones en el sistema nervioso central (**SNC**) y los ojos del ser humano, entre otras. Para describir a las amibas capaces de sobrevivir en el ambiente y como endoparásitas se ha propuesto el término anfizoico (del griego *amphi*, que significa ambos lados) (Page, 1974, 1976).

Las **AVL** son prácticamente cosmopolitas pues se les encuentra en toda la biosfera incluyendo los casquetes polares, el suelo, el agua y la atmósfera (Rivera *et al.*, 1987a). Viven principalmente donde hay agua, pudiéndoseles encontrar en estanques, ríos, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual, corrientes subterráneas e incluso agua entubada y embotellada (Wellings *et al.*, 1977; Rivera *et al.*, 1979, 1981, 1986a, 1987b, 1988, 1994; Kadlec *et al.*, 1980, Sadaka *et al.*, 1994). Las temperaturas elevadas favorecen su proliferación por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales, naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (De Jonckheere, 1977; De Jonckheere 1981b; Cervá *et al.*, 1982; Kasprzak *et al.*, 1982; Sykora *et al.*, 1983).

El estudio de las **AVL** ha demostrado que sólo un grupo muy restringido provoca infecciones humanas incluyendo a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y probablemente *Hartmannella* (John, 1993; Visvesvara *et al.*, 1993). Los organismos del género *Naegleria* son capaces de provocar meningoencefalitis amibiana primaria (**MEAP**) que ocasiona la muerte en el lapso de tres a siete días. Las acantamebas provocan encefalitis amibiana granulomatosa (**EAG**) crónica que pueden ocasionar la muerte en periodos mayores, y también pueden provocar infecciones muy severas en otros órganos como pulmón, piel, ojos y oídos (Kilvington *et al.*, 1991).

A diferencia de *Entamoeba histolytica* que es un parásito obligado que se aloja en el intestino y que puede producir abscesos secundarios en hígado, cerebro y pulmón, *Naegleria fowleri*, es capaz de invadir el **SNC** pasando directamente de la mucosa nasal (Wang y Feldman, 1967; Cerva *et al.*, 1973; Martínez y Amado-Ledo, 1979; Conde, 1990; John, 1993). Los casos registrados de esta enfermedad en todos los continentes evidencian la amplia distribución y se sospecha que muchos casos pasan inadvertidos al diagnóstico clínico y de laboratorio (Hanadto *et al.*, 1993).

## 2.2. MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA.

Las **AVL** son organismos unicelulares, asexuales, cuyas dimensiones varían de unas cuantas micras hasta algunos milímetros. Pueden estar desnudas o cubiertas por una testa; móviles por medio de pseudópodos, que también usan para fagocitar. Los tiempos de generación son variables y generalmente se incrementan con la temperatura y disminuyen con el tamaño del cuerpo (John, 1993).

Los pseudópodos muestran una considerable diversidad de estructuras y tipos que se reflejan en una gran variedad de formas. Su citoplasma está constituido por dos zonas; una capa transparente o ectoplasma y en un endoplasma granular que fluye a lo largo del cuerpo hacia los pseudópodos. El ectoplasma es más visible en las puntas de los pseudópodos, donde forman zonas hialinas. El endoplasma contiene uno a varios núcleos, una o varias vacuolas, gránulos de almacenamiento de alimento, mitocondrias y otras membranas e inclusiones cristalinas (Page, 1988; Weekers, 1993).

La formación de quistes es el mecanismo de protección que presenta la mayoría de los protozoos, incluidas las **AVL**, para protegerse de los cambios ambientales. De esta manera pueden sobrevivir a la ausencia de humedad, cambios extremos de temperatura, presión, pH, falta de oxígeno, acumulación de desechos metabólicos, escasez de alimento o algún otro factor adverso (Schuster, 1979; Marciano-Cabral, 1988).

### 2.2.1. *Naegleria*.

El género *Naegleria* consta de tres estadios durante su ciclo de vida en el ambiente (Page, 1988):

- Trofozoíto, o forma vegetativa, que es la fase del ciclo en la que se alimenta y reproduce.
- Quiste, que es la forma de resistencia.
- Flagelado, estadio transitorio que no se alimenta, ni se multiplica y después de un tiempo regresa a la fase trófica.

La especie *N. fowleri*, también puede invadir al ser humano y animales. El trofozoito es el estadio invasivo, su periodo de incubación varía de dos días a tres semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia de las amibas. La inhalación de agua, o más raramente, de aire conteniendo amibas, pone en contacto a estos microorganismos con el neuroepitelio olfatorio por donde penetran directamente a la cavidad craneal a través del nervio olfatorio, constituyéndose de esta manera la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo y del espacio subaracnoideo vascular (Martinez, 1985; Martinez y Visvesvara, 1997).

**Trofozoíto.** Los trofozoitos de las diferentes especies son muy similares en apariencia y son conocidas como amibas limax. Son alargadas y se mueven de manera unidireccional por medio de un pseudópodo eruptivo, llamado lobópodo. El núcleo posee un denso y esférico nucleolo central o cariosoma y una membrana nuclear sin cromatina granular. El trofozoíto de *N. fowleri* en movimiento mide en promedio 22  $\mu\text{m}$  de longitud; en forma inactiva, redondeada, mide de 9 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Carter, 1970).

Los trofozoitos de *N. fowleri* y *N. australiensis* (patógena en ratón) poseen unas estructuras fagocíticas distintivas conocidas como amebostomas, que son usadas para

engullir alimento y varían en número de una a doce por amiba. Por microscopía electrónica de transmisión se ven muy granuladas, en contraste con las áreas vacuoladas de la amiba. En las especies no patógenas no son tan evidentes, como en *N. fowleri*. Aparentemente, no existe correlación entre el grado de virulencia y el número de amebostomas; sin embargo, la patogenicidad sí parece estar correlacionada con su presencia, ya que las dos únicas especies patógenas de *Naegleria* las poseen (John, 1993).

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

**Flagelado.** Cuando las condiciones en el ambiente son adversas, los trofozoítos se pueden transformar en formas flageladas temporales; el mismo efecto se puede inducir experimentalmente con agua destilada o solución buffer no nutritiva. El flagelado típico es una célula de forma piriforme, con dos flagelos que emergen por debajo del *rostrum* anterior. El estadio flagelar de *N. fowleri* es muy uniforme, la mayoría presenta dos flagelos (Page, 1988).

**Quiste.** El quiste de *N. fowleri* es esférico, con un diámetro de 7 a 15  $\mu\text{m}$  (Page, 1988). En quistes analizados con la técnica de microscopía electrónica, se observan al menos dos poros (u ostiolos) con tapón y una pared relativamente delgada, característica que hace a esta especie muy susceptible a la desecación (Bonilla, 2000).

## 2.3. INFECCIONES EN HUMANOS.

### 2.3.1. Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP).

Es una enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal que tiene como agente causal a *Naegleria fowleri*. Debido a que la invasión es muy rápida, hay necrosis hemorrágica de gran parte del encéfalo (Martínez, 1985, Martínez *et al.*, 1994).

Los signos y síntomas de la MEAP consisten en presión intracraneal elevada (náusea, vómito en proyectil y fotofobia), cefalea intensa, irritación de la mucosa nasal, fiebre, datos de irritación meníngea (rigidez de nuca) y encefalitis. El curso clínico se caracteriza por confusión mental, en algunos casos crisis convulsivas; pérdida del apetito, visión doble y/o borrosa, trastornos del gusto, del olfato y alucinaciones, coma profundo, y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren dentro de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como de la virulencia de las amibas (Martínez y Visvesvara, 1997).

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana; sin embargo, en la infección por *Naegleria* existe el antecedente de que los pacientes, en su mayoría jóvenes y previamente sanos, nadaron en algún cuerpo de agua, así como el hecho de encontrar escaso exudado purulento y ausencia de bacterias en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El diagnóstico se confirma con el aislamiento de amibas en forma de trofozoito (nunca quistes, ni flagelados) del LCR o del tejido de biopsia cerebral. El único fármaco de elección contra *N. fowleri* es el antimicótico Anfotericina B, pero solamente es efectivo cuando se administra al inicio de la infección (Martínez, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997; John, 1993).



## 2.4.MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.

Los mecanismos de patogenicidad de las AVL, patógenas aún no se conocen completamente ni tampoco los factores que determinan la susceptibilidad a las infecciones con el subsecuente desarrollo de las enfermedades que causan. La mayor parte de lo que se conoce hasta la fecha ha surgido de estudios en cultivos celulares y principalmente de estudios de *N. fowleri* en animales.

El trofozoíto es el estadio invasivo de *N. fowleri*; hasta la fecha nunca se han encontrado en tejidos o en LCR, amibas en estadio flagelar o de quiste, solamente en estado de trofozoíto.

Algunos de los mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* propuestos hasta hoy incluyen:

- fagocitosis,
- liberación de sustancias citolíticas
- presencia de un componente biológico activo, conocido como material citopatogénico de *Naegleria* (MCN).

**Fagocitosis.** Es una función básica de las amibas directamente involucrada con la patogenicidad que causa la destrucción de células, tanto en cultivo celular como en tejidos animales. A la acción que *N. fowleri* realiza al engullir alimentos (levaduras, eritrocitos, bacterias, otras células) se le conoce como trogocitosis, la cual es llevada a cabo por unas estructuras parecidas a una ventosa o chupón denominadas amebostomas (Brown, 1979; John *et al.*, 1985).

Amibas de la especie *N. fowleri* no solamente engullen, sino que destruyen a otras células, lo que permitiría explicar la destrucción de mucosas y otros tejidos. Tales estructuras se han observado en *N. fowleri* (John *et al.*, 1985) así como en *Acanthamoeba* spp. (Díaz *et al.*, 1991).

**Sustancias citolíticas.** En 1978, Chang sugirió que el efecto citopático se debía a sustancias citolíticas o citotóxicas (enzimas fosfolipolíticas) liberadas por las amibas durante su crecimiento. El mismo autor reportó que el sobrenadante del cultivo de *N. fowleri* en cultivo de células de mamífero produjo lisis al adicionarse a cultivos nuevos (John, 1993).

Cursons y Brown (1978) identificaron fosfolipasa A y C, lisofosfolipasa y esfingomielinasa en medios de cultivo donde creció la misma especie. Además reportaron que la actividad de la fosfolipasa aislada de cultivo de *Naegleria* patógena fue mucho mayor que la de cultivos de *Naegleria* no patógena.

En extractos de *N. fowleri* se han identificado varias hidrolasas, fosfatasa ácida, varias glicosidasas y elastasa (Ferrante y Bates, 1988). Este último, refiere que los niveles de elastasa son muy similares entre cepas amibianas patógenas y no patógenas. Martínez y Visvesvara (1997), además de las anteriores, mencionan fosfatasa alcalina, aminopeptidasas, esterases y deshidrogenasas.

Hysmith y Franson (1982a) reportaron que los fosfolípidos de mielina humana pueden ser degradados al ponerse en contacto con medios de cultivo (sin amibas) donde creció *N. fowleri*. Las neuraminidasas presentes en el medio de cultivo hidrolizaron mielina humana y mucina, sugiriendo que quizás las enzimas que son capaces de hidrolizar glucolípidos y fosfolípidos de mielina *in vitro* son también responsables de la gran desmielinización que ocurre experimentalmente y en MEAP humana (John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997). Adicionalmente, los niveles de esfingomielasa en cultivos de *N. fowleri* virulenta fueron mayores que las de *N. fowleri* poco virulenta o *N. gruberi* (Hysmith y Franson 1982b).

Marciano-Cabral *et al.*, (1990), sugieren que la destrucción celular se debe a la acción conjunta de toxinas citolíticas y trogocitosis. El o los factores citolíticos presentes en amibas cultivadas axénicamente pueden ser usadas para la digestión interna de células blanco ingeridas, mientras que los factores citolíticos de amibas pasadas por ratón, lisan las células blanco antes de ingerirlas.

Por su parte, Campbell (1993) sugiere que el efecto citopático se debe a la combinación de dos mecanismos: un proceso mediante contacto más la ingestión de pedazos de alimento (trogocitosis), y la producción de hidrolasas lisosomales más una fosfolipasa que puede degradar mielina.

Por otro lado, Lowrey y McLaughlin (1985) describieron una proteína hemolítica estable al calor asociada con la membrana superficial de *N. fowleri* y aunque no se ha demostrado, se ha sugerido que desempeña un papel importante en la patogenicidad de esta especie.

**Material citopatogénico de *Naegleria* (MCN).** Dunnebacke y Schuster (1985) atribuyen la patogenicidad de *Naegleria* a una proteína, a la que denominaron como material citopatogénico de *Naegleria* (MCN). Es una proteína con una masa molecular de 36,000 kDa y un punto isoeléctrico de pH 4.2. De acuerdo con estos autores el MCN se localiza en las puntas de los pseudópodos y en el citoplasma periférico de las amibas, formando una estructura en forma de anillo semejante a los amebostomas que puede observarse por fluorescencia. El MCN destruye células de una variedad de líneas celulares de mamíferos y aves. El efecto citopático ha sido mantenido en cultivos celulares a través de nueve pases seriados. MCN purificado o crudo causa efecto citopático en células cultivadas (John, 1993).

Los mecanismos de patogenicidad se han asociado con otros factores:

- Para llevarse a cabo la invasión amibiana, el primer factor es su habilidad para adherirse a la superficie del hospedero, ya que es necesario el contacto de las amibas con las células animales para que la lisis de células nerviosas se lleve a cabo (Marciano-Cabral, 1988).
- La fase de crecimiento. Se ha observado que la mortalidad es mayor entre ratones inoculados con amibas cosechadas al final de la fase de crecimiento logarítmico y al inicio de la fase estacionaria, que al inicio de la fase de crecimiento logarítmico y la última parte del estado estacionario (Ferrante, 1991).
- La locomoción amibiana es otro factor importante que promueve la invasión y penetración de tejidos y mucosas. En condiciones similares, *N. fowleri* tiene tasa de migración superior que los neutrófilos y que amibas no patógenas. Paralelamente con la pérdida de virulencia, se ha observado una disminución en la tasa de locomoción (Ferrante, 1991).
- De acuerdo con Cline *et al.*, (1986), especies de *Naegleria* muestran quimiotaxis al colocarse cerca de células de mamífero, bacterias y productos celulares. Amibas muy virulentas de *N. fowleri*, recientemente recuperadas del hospedero mostraron mayor respuesta que las amibas cultivadas axénicamente. Por otro lado, se ha observado que el cultivo continuo de amibas patógenas en medio axénico conduce a la pérdida gradual de su virulencia, la cual puede ser recuperada

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

haciéndola crecer en presencia de bacterias y restaurar a los niveles originales por pases en serie en ratón o en cultivo de tejidos (John y Howard, 1993).

En todos los casos, también es necesario tomar en cuenta el estado inmunológico del hospedero y la dosis infectiva, así como la habilidad de las amibas patógenas para evadir al sistema inmune del hospedero.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. INFECCIONES POR AVL.

Las AVL han sido estudiadas desde 1841, cuando Félix Dujardin en Francia describe por primera vez una amiba pequeña de vida libre y le da el nombre de *Amoeba limax* (Rivera *et al.*, 1991). No obstante, sólo se les consideraba como organismos que forman parte del ambiente y que llevan un papel modesto en la trama del ecosistema. Ciento diecisiete años después, se hace el primer reporte del efecto citopático de *Hartmannella* y *Acanthamoeba* en cultivos celulares de riñón de mono y se propone que las amibas de vida libre tienen un potencial patógeno (Culbertson *et al.*, 1958). Los primeros casos de infecciones humanas fueron registrados en Australia (Fowler y Carter, 1965). Un año después del primer reporte, tres infecciones fatales fueron descritas en Florida (Butt, 1968). La sintomatología de estos casos fue muy similar a la de los casos de Australia, aunque esto no era aparente en ese entonces, los siete casos sentaron las bases de las características clínicas y patológicas de la enfermedad.

Los primeros casos de meningoencefalitis en humanos debidamente comprobados provienen de hace apenas unas décadas (Carter, 1970). En ese entonces, se creía que todos los casos comprobados de MEAP se debían a *Naegleria fowleri*. Posteriormente, se reconocen casos de encefalitis causados por amibas del género *Acanthamoeba* (Jager y Stamm, 1972; Robert y Rorke 1973) con lo que las diferencias clínico-patológicas empezaron a emerger. A medida que la enfermedad se fue conociendo más, se encontró que algunas infecciones oculares y de la piel eran causadas por *Acanthamoeba*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(Martínez, 1985) y se propuso el término encefalitis amibiana granulomatosa (**EAG**) (Martínez y Amado-Ledo, 1979) para diferenciarla de la **MEAP** debida a *Naegleria fowleri*. El interés médico se ha venido incrementando al saberse que provocan la muerte (De Jonckheere *et al.*, 1984). Este hecho reviste mayor importancia si se considera que las **AVL** potencialmente patógenas se pueden encontrar con facilidad en cuerpos de agua de uso recreativo e industrial (De Jonckheere, 1978, 1979; Coronado-Gutiérrez y López-Ochotorena, 1980; Kasprzak *et al.*, 1982; Scaglia *et al.*, 1983; Rivera *et al.*, 1989a).

Los estudios de **AVL** en México fueron iniciados por Rivera y colaboradores (Rivera y Paz, 1978; Rivera *et al.*, 1984 a, b), quienes reportaron amibas del género *Naegleria* en reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México. Posteriormente, Rivera y colaboradores en 1979 aislaron *N. gruberi*, *A. culbertsoni* y *A. astronyxis* en aguas de grifo de la Cd. de México. *N. gruberi* y *A. astronyxis* fueron aisladas también a partir de agua mineral embotellada (Rivera *et al.*, 1981). En un estudio amebológico hecho a pacientes odontológicos de ambos sexos, se aislaron amibas patógenas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba* provenientes de la región nasobucofaríngea (Rivera *et al.*, 1984b; 1986b). Rivera y colaboradores (1987a, 1988, 1994) y Bonilla (2000), recolectaron **AVL**, especialmente del género *Acanthamoeba*, de la atmósfera de la Cd. de México y su área metropolitana.

Las infecciones por **AVL** son relativamente extrañas, sin embargo, se tienen reportes prácticamente en todo el mundo. En México, el estudio de estos organismos se intensificó después de los reportes de **MEAP** por Valenzuela *et al.* (1984), Rodríguez-Pérez (1984) y López-Corell *et al.* (1989); además de los casos en el Valle de Mexicali (Ferreira *et al.*, 1997).

El primer caso de **MEAP** en México fue detectado en 1978 en un sujeto de 16 años de edad con antecedentes de natación en los canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California y fue publicado hasta 1984 (Valenzuela *et al.*, 1984). Desde entonces a la fecha, se han diagnosticado 29 casos en México (Lares, 2001), incluyendo un sobreviviente tratado con anfotericina B, cloranfenicol y sulfadiazina (Rodríguez-Pérez, 1984).

### 3.2. RESPUESTA INMUNE.

La presencia de las AVL en los tejidos del hospedero induce la formación de una respuesta inmune. Se han detectado anticuerpos contra *Acanthamoeba* y *Naegleria*, que opsonifican los trofozoítos y aumentan el efecto tóxico de los macrófagos y neutrófilos en contra de las amibas (Ferrante y Mocatta, 1984; Ferrante, 1984). Cuando las amibas se asientan en sitios primarios como la piel, el neuroepitelio u otras superficies respiratorias, sólo una pequeña porción de ellas sobrevive. Una infección exitosa de *N. fowleri* puede ser por lo tanto, la consecuencia de una elevada dosis de amibas, asociadas con bajos niveles de respuesta anti-amibiana, como podría ocurrir en los niños (John, 1993). Por otra parte, estudios seroepidemiológicos han confirmado que los seres humanos están periódicamente expuestos a *Naegleria* (Cursons *et al.*, 1980; Reilly *et al.*, 1982; Marciano-Cabral *et al.*, 1987a).

Los anticuerpos contra las amebas patógenas y no patógenas de vida libre han sido detectados en suero humano normal a través de varias técnicas. Con la técnica de radioinmunoensayo (Tew *et al.*, 1977) se encontró que los títulos de anticuerpos fueron casi nueve veces más grandes contra antígenos intracelulares que contra antígenos de la superficie celular. A través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Cursons *et al.*, 1980), en el que se utilizaron 93 muestras de suero, se encontró que todas fueron positivas, con rangos de títulos de 1:5 a 1:20 para *N. fowleri* y para *N. gruberi*; de 1:20 a 1:80, para *A. castellanii* y *A. culbertsoni*. Con la técnica de aglutinación se detectaron anticuerpos contra *N. fowleri*, *N. gruberi*, y *N. lovaniensis* (Marciano-Cabral y Cline, 1987; Reilly *et al.*, 1982, 1983.), la actividad aglutinante fue específica, indicando que las personas habían estado expuestas a cada una de las especies de *Naegleria*. Con el ensayo Avidina-biotina peroxidasa se detectaron anticuerpos contra *N. fowleri* y *N. lovaniensis* en muestras de suero humano (Dubray *et al.*, 1987), los anticuerpos estuvieron presentes en 88% de los sueros de 115 pacientes hospitalizados, los anticuerpos fueron identificados como IgG e IgM, con títulos de IgG de 1:20 a 1:640.

La presencia de anticuerpos contra amebas de vida libre en suero humano, puede reflejar la amplia distribución de estos organismos, o puede representar reacciones cruzadas inespecíficas de los anticuerpos contra los antígenos que fueron identificados o

simplemente la exposición de las personas a este antígeno (Cursons *et al.*, 1979,1980, Reilly *et al.*, 1982; 1983; Marciano-Cabral *et al.*, 1987a; y Dubray *et al.*, 1987).

Los métodos serológicos usados para estudiar la respuesta inmune que ocasionan las **AVL** en humanos, incluyen los ensayos de fluorescencia indirecta con anticuerpos, fijación del complemento, aglutinación, hemoaglutinación indirecta y análisis por Western blot (Cerva, 1989; Dubray *et al.*, 1987; Kenney, 1971; Marciano-Cabral, 1988; Reilly *et al.*, 1983 y Powell *et al.*, 1994). Las conclusiones de todos estos estudios sugieren que los humanos presentan reacciones entre anticuerpos y **AVL**, sin embargo, a la fecha no se sabe si estos anticuerpos son un reflejo de la exposición en el medio ambiente a antígenos amibianos o a la reacción cruzada con otros antígenos.

#### 4.JUSTIFICACIÓN.

La identificación precisa de las **AVL** del ambiente o en muestras clínicas se realiza por personal especializado. Determinar la especie a la que pertenece es aún más difícil, sobre todo si se dispone solamente de unos cuantos trofozoítos o quistes. El diagnóstico de *Naegleria*, requiere que los trofozoítos sean aislados, y cultivados en cantidades masivas para su identificación. Este proceso puede hacerse en un periodo de dos a cuatro días para llegar a la identificación hasta género. Se requiere conocer al menos que género de **AVL** está infectando al paciente para poder llegar a un tratamiento terapéutico diferencial debido a que para cada género se emplean diferentes drogas. La determinación del organismo hasta especie puede tardar más tiempo y requiere de gran experiencia del personal que desarrolla la identificación (Skocil *et al.*, 1970, 1972).

Su detección inicial no es sencilla, para una persona no entrenada, las amibas pueden ser confundidas con leucocitos o pasar desapercibidas como simples artefactos o partículas de sedimento del mismo fluido o medio de cultivo. Y aún después ya en cultivo, su identificación no es fácil, ya que sólo se pueden diferenciar morfológicamente entre si hasta nivel de género, y en muchos casos con cierta reserva.

Además, en México, a nivel médico es común el no asociar a estos microorganismos como agentes de meningoencefalitis, por lo que se sospecha que muchos han pasado

desapercibidos, ya sea por la falta de conocimiento sobre los efectos patógenos de las **AVL**, o porque no se cuente con una técnica de identificación rápida y segura.

Por todo lo anterior es muy importante desarrollar métodos de identificación precisos y rápidos que sirvan como una alternativa para la identificación de estos organismos así como para el diagnóstico de los padecimientos que ocasionan, como lo pueden ser las técnicas inmunológicas. Por lo tanto, en este trabajo se buscaron antígenos específicos de *N. fowleri* mediante la eliminación de reacciones cruzadas con otras amibas (como *Entamoeba histolytica* y *Acanthamoeba culbertsoni*) los cuales pueden ser utilizados en el diagnóstico de la enfermedad **MEAP** e identificación de *N. fowleri* a través de técnicas como el inmunoblot.

## 5.OBJETIVOS.

### 5.1.General.

Reconocer antígenos específicos de *Naegleria fowleri* que puedan ser útiles para su identificación.

### 5.2.Particulares.

1. Obtener un patrón de proteínas de los extractos de *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba culbertsoni* y *Entamoeba histolytica*, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.
2. Obtener por medio de inmunoblots, un patrón de reconocimiento con sueros de conejos inmunizados con *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba culbertsoni* y *Entamoeba histolytica* respectivamente.
3. Determinar la presencia de antígenos específicos de *Naegleria fowleri* a través de la eliminación de reacciones cruzadas en inmunoblots utilizando extracto total de *N. fowleri*, *A. culbertsoni* y *E. histolytica*, respectivamente.



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS.

**Amibas.** Las amibas utilizadas en el presente trabajo, fueron cepas de referencia obtenidas de la American Type Culture Collection (**ATCC**) y del Catálogo de Colección del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (**CyMA**), de la FES Iztacala.

Las cepas fueron las siguientes:

Cepa	Clave de Catálogo
<i>Naegleria fowleri</i>	30808
<i>Entamoeba histolytica</i> *	HM1:IMSS
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	A-1

\* Cepa proporcionada por el Dr. Rafael Campos Rodríguez, de la Escuela Superior de Medicina del I.P.N.

**Animales.** Se usaron ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad. Para la obtención de anticuerpos séricos anti-*N. fowleri*, anti-*E. histolytica* y anti-*A. culbertsoni*, se utilizaron conejos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Nueva Zelanda de 1.5 a 2 Kg de peso.

**Cultivos.** Las amibas fueron cultivadas axénicamente en frascos de cultivo Corning de 75 cm<sup>2</sup>, en 30 ml de medio de cultivo para promover un óptimo crecimiento para cada especie.

*N. fowleri* fue cultivada en medio de Bactocasitona (DIFCO), enriquecido al 10% con suero fetal de bovino, e incubadas a 37°C. *E. histolytica* se cultivó en medio TY1 y fueron incubadas a 37°C. Para *A. culbertsoni* se utilizó el medio Chang modificado enriquecido al 10% con suero fetal de bovino (apéndice 1), e incubadas a temperatura ambiente.

**Reactivación de la virulencia.** Se realizó en ratones anestesiados con éter, a los cuales se les inocularon 100 000 trofozoitos de *N. fowleri* a cada uno, por vía intranasal, utilizando una micropipeta. Los ratones se mantuvieron bajo observación y al momento de la muerte se obtuvo el cerebro para recuperar las amibas, volver a cultivarlas y realizar un nuevo pase por ratón. Este procedimiento se repitió tres veces, las amibas recuperadas se

TESIS CON  
FALLA DE OMCEN

cultivaron axénicamente para las siguientes pruebas. El mismo procedimiento se repitió para *A. culbertsoni*.

**Obtención del extracto amibiano.** Después de formada la monocapa en los cultivos axénicos, los frascos se pusieron en hielo (15 min) para promover que los trofozoítos se despegaran, las células se recolectaron y se concentraron por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min. Se realizaron tres lavados con solución salina isotónica estéril (realizando todo el proceso en frío, 4°C). Posteriormente se adicionó un volumen de 4-5 veces el tamaño de la pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas (ácido p-hidroximercuriobenzoico 20mM, EDTA 20 mM en Trisma base 100 mM, cloruro de zinc 20 mM) (apéndice 3). El paquete celular se puso a ebullición por 10 min, se sometió a sonicación durante 15 segundos, programando el sonicador a 50 V para promover su ruptura. El extracto amibiano se volvió a poner en ebullición por 10 min y se distribuyó en alícuotas de 200 µl y después de cuantificar la concentración de proteínas por el método de microBradford, se mantuvo en congelación a -70°C. La concentración promedio obtenida de los extractos fue de 2 - 5 µg/µl.

**Obtención de anticuerpos séricos de conejo.** Una vez obtenido el extracto total de cada una de las especies amibianas, se inmunizó un conejo por cada extracto, con el objeto de obtener anticuerpos séricos anti-*N. fowleri*, anti-*E. histolytica* y anti-*A. culbertsoni*. El esquema de inmunización fue el siguiente:

Antes de iniciar la inmunización se sangró al conejo por la oreja para extraer 5 ml de sangre y obtener el suero pre-inmune.

No. de Inoculación	Vía de Inoculación	Concentración del inóculo (mg)	Adyuvante	Día
1	Subcutánea	2 a 3	Completo	0
2	Subcutánea	2 a 3	Incompleto	7
3	Intramuscular	2 a 3	S.S.I.	14

A los siete días después de la última inmunización se sangró al conejo por punción cardíaca. La sangre se colectó en tubos de ensaye, retirando el coágulo y centrifugando a

2000 rpm durante 10 min. Se recuperó el suero, se tituló y almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

**Electroforesis e Inmunoblot.** La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en una cámara de electroforesis Mini Protein II Dual Slab Cell (Bio-Rad). Se utilizaron  $10\ \mu\text{g}$  de proteína del extracto amibiano para cargar cada carril del gel de poliacrilamida al 10% (apéndice 2). El tiempo aproximado de corrimiento fue de 95 min a 110 V. Para observar a las proteínas los geles se tiñeron con azul de Coomasie (apéndice 2).

Las proteínas en geles sin teñir, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de  $0.45\ \mu\text{m}$  del tamaño del poro (Millipore) usando una cámara de electrotransferencia Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer Cell con una unidad Bio-Ice (Bio-Rad). El tiempo de transferencia fue de 90 min a 400 mA. Después de la transferencia, la membrana fue teñida con rojo de Ponceau y se cortó en tiras para realizar la inmunodetección. Las tiras se lavaron con PBS (apéndice 3) por 10 min en un rotador clínico a baja velocidad, posteriormente se bloquearon durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con leche descremada al 6% diluida en PBS-T (0.05%). Al día siguiente se lavaron con PBS-T, durante cinco minutos por tres veces. El primer anticuerpo que se puso a incubar con las tiras fue el obtenido de los sueros de conejos inmunizados, a una dilución de 1:4000 en PBS-T por dos horas a temperatura ambiente. Se lavó con PBS-T, durante cinco minutos por tres veces. Se agregó el segundo anticuerpo, de cabra anti-IgG de conejo peroxidado (Sigma Chemical Co.) a una dilución de 1:4000 en PBS-T por dos horas a temperatura ambiente. Se lavó con PBS-T, durante cinco minutos por tres veces. Se agregó la solución reveladora (metanol 17.5%, 4-cloronaftol 0.15%, PBS 82.5%, peróxido de hidrógeno 0.1%) (apéndice 2) y se dejó reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron con PBS-T y se calcularon los pesos moleculares de las proteínas que fueron detectadas en las tiras de nitrocelulosa.

**Pruebas de Adsorción.** Para eliminar las reacciones cruzadas se realizaron las pruebas de adsorción. Se tomó 1 ml del extracto total amibiano con una concentración de  $3\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se fijó con glutaraldehído al 2.5% por una hora a temperatura ambiente, en agitación lenta y en completa oscuridad. El extracto se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. Las pastillas se

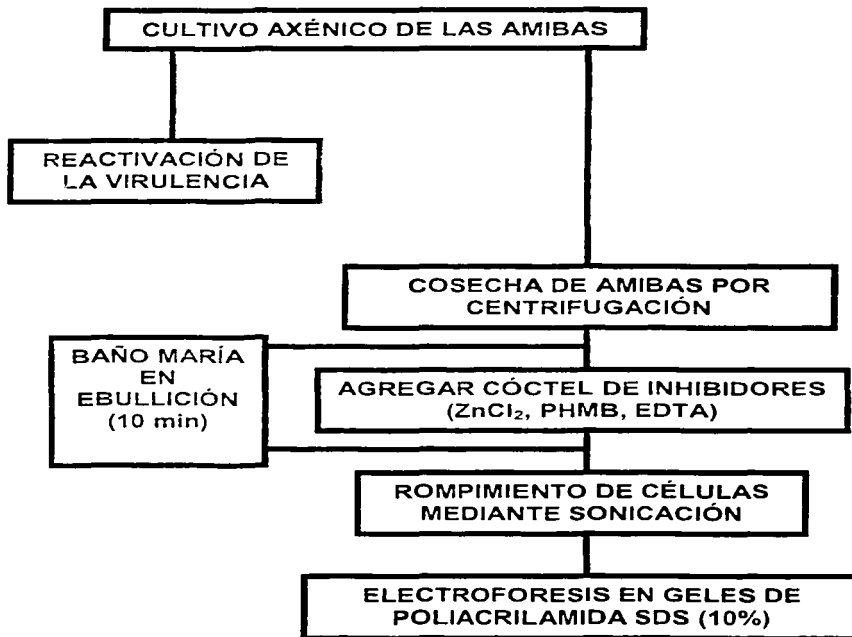
lavaron 5 veces con PBS y se centrifugaron nuevamente. Este procedimiento se realizó para cada una de las especies de amibas. La pastilla del extracto de *E. histolytica* se incubó con 1 ml del suero de conejo anti-*N. fowleri* diluido 1:4000 en PBS, a 4°C en agitación lenta durante 2 horas. Se centrifugó a 3000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante incubándolo en las mismas condiciones con la pastilla del extracto fijado de *A. culbertsoni*. Después de dos horas se volvió a centrifugar para obtener el sobrenadante y se realizó un inmublot como se describió anteriormente, utilizando el sobrenadante como primer anticuerpo en una tira de nitrocelulosa con proteínas de *N. fowleri*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 7. RESULTADOS.

La estrategia metodológica para lograr el objetivo particular 1, fue la siguiente:

### OBTENCIÓN DEL PATRÓN DE PROTEÍNAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES AMIBANAS



**Reactivación de la virulencia.** Para reactivar la virulencia de *N. fowleri* se inocularon por vía intranasal, tres grupos de 5 ratones cada uno. Cada ratón se inoculó con 100 000 trofozoítos. Las amibas se recuperaron de los cerebros de los ratones muertos y se repitió el procedimiento por tres veces. La tabla 1 muestra los datos de la reactivación de la virulencia para *N. fowleri*. Como la amiba era de catálogo, era de esperarse que en el

primer pase se tardara en matar a los ratones, sin embargo, al tercer pase las amibas fueron capaces de matar a los ratones en 4 y 5 días.

**Tabla 1. Resultados de la reactivación de la virulencia para *N. fowleri***

GRUPO	RATÓN	SOBREVIVENCIA (días)
	I	1
2		7
3		8
4		10
5		12
GRUPO	RATÓN	SOBREVIVENCIA (días)
	II	1
2		7
3		7
4		7
5		8
GRUPO	RATÓN	SOBREVIVENCIA (días)
	III	1
2		4
3		4
4		4
5		5

La prueba de reactivación de la virulencia se realizó inoculando 100 000 trofozoítos de *N. fowleri* por vía intranasal. Las amibas se recuperaron de los cerebros de los ratones muertos del primer grupo, se crecieron axénicamente y se volvió a inocular al segundo grupo y el procedimiento se repitió para el tercer grupo.

En lo que respecta a *A. culbertsoni*, se siguió el mismo procedimiento, sin embargo las amibas se recuperaron sacrificando a los ratones el día 21 después de la inoculación. La reactivación de la virulencia de la cepa de *E. histolytica* fue realizada por pase en hígado de hamster en el laboratorio del Dr. Campos, de la Escuela Superior de Medicina del I.P.N., antes de que nos fuese proporcionada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Patrón de proteínas.** Después de realizar la prueba de virulencia, las amibas se crecieron en un cultivo masivo para obtener el extracto total tanto de *N. fowleri*, *E. histolytica* y *A. culbertsoni*, se realizó una electroforesis con geles de poliacrilamida-SDS (10%). El patrón de los tres extractos, incluye proteínas de alto y bajo peso molecular (de entre 250 y 15 kDa) (Fig. 1). Se puede apreciar que son claramente diferentes entre sí, tanto en número de bandas, distribución como en intensidad. Entre los 35 y 50 kDa, se observa una zona de alta intensidad, para *N. fowleri* se observó un doblete muy nítido, mientras que *E. histolytica* presenta una banda muy densa en esa zona y *A. culbertsoni* un triplete con mucho menos intensidad. Otros arreglos característicos se pueden apreciar en la zona de alto y bajo peso molecular para cada una de las especies. Con estos perfiles proteicos se pueden establecer las diferencias entre un extracto y otro.

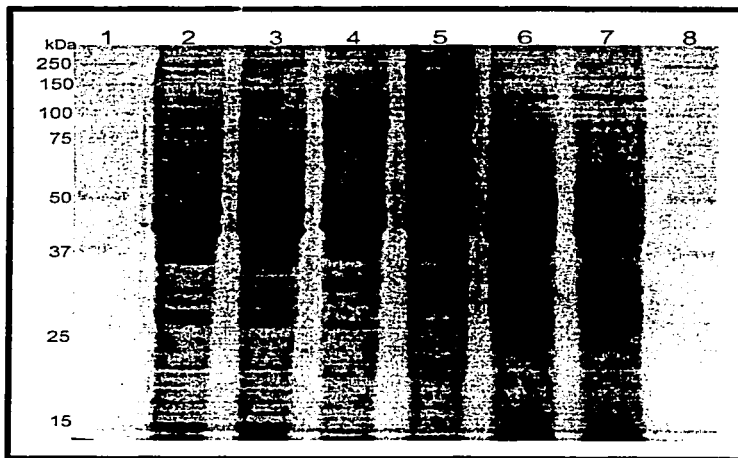


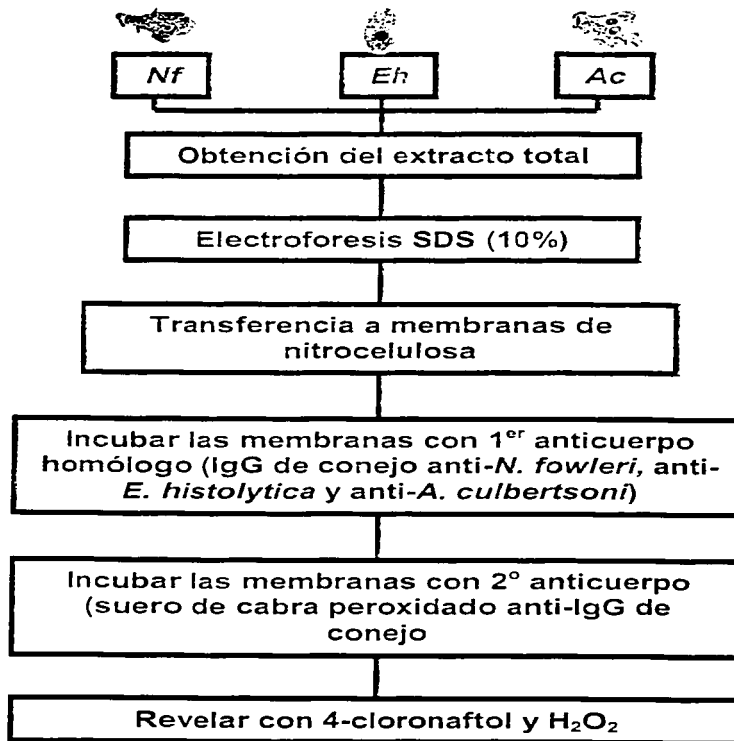
Fig. 1. Patrón de proteínas de los diferentes extractos amibianos, obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (10%). Carriles: (1 y 8) marcador de peso molecular, (2, 3) extracto de *N. fowleri*; (4, 5) extracto de *E. histolytica*; (6, 7) extracto de *A. culbertsoni*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Una vez obtenidos estos patrones, se procedió a inmunizar 3 conejos con extracto ambiano de *N. fowleri*, *E. histolytica* y *A. culbertsoni* respectivamente para obtener anticuerpos IgG de conejo anti-*N. fowleri*, anti-*E. histolytica* y anti-*A. culbertsoni*.

En lo que respecta al objetivo particular 2, la estrategia fue la siguiente:

### OBTENCIÓN DEL PATRÓN DE RECONOCIMIENTO DE LOS DIFERENTES ANTÍGENOS AMIBIANOS





**Patrón de reconocimiento.** El patrón de reconocimiento se obtuvo al transferir las proteínas del extracto total amibiano de cada especie a una membrana de nitrocelulosa, se incubaron las membranas con IgG de conejo anti-*N. fowleri*, anti-*E. histolytica* y anti-*A. culbertsoni* respectivamente a una dilución de 1:4000 por dos horas y posteriormente con un segundo anticuerpo anti-conejo IgG de cabra peroxidado a una dilución de 1:4000, por dos horas. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

Las figuras 2, 3 y 4, muestran el patrón de reconocimiento de los antígenos de las diferentes especies amibianas. Se observó que en los tres casos, se detectaban proteínas a todo lo largo de la membrana de nitrocelulosa. Comparados estos patrones con los obtenidos en los geles teñidos con Coomassie, se puede apreciar que hubo menos bandas de proteínas reconocidas por los anticuerpos, que hay regiones que en el gel no eran tan intensas como en el blot, lo que indica que estas proteínas fueron altamente inmunogénicas. Las tres especies presentaron una distribución diferente de las proteínas estableciéndose así, los patrones de reconocimiento para antígenos de *N. fowleri*, *E. histolytica* y *A. culbertsoni*.

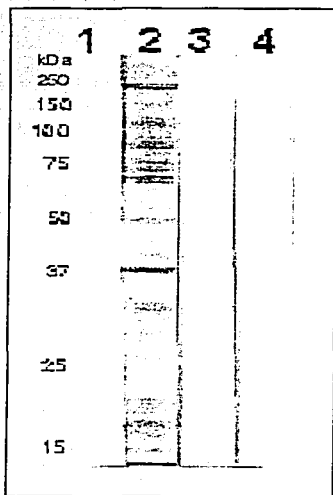


Fig. 2. Patrón de reconocimiento de antígenos de *N. fowleri*, mediante inmunoblot en membranas de nitrocelulosa. Carriles: (1) Marcador de peso molecular. (2) Patrón de reconocimiento de antígenos de *N. fowleri* utilizando como primer anticuerpo suero de conejo anti-*N. fowleri*. (3) Suero preinmune. (4) Control, (sólo se agregó el segundo anticuerpo). Se utilizó una dilución 1:4000 tanto para el primer y segundo anticuerpo. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

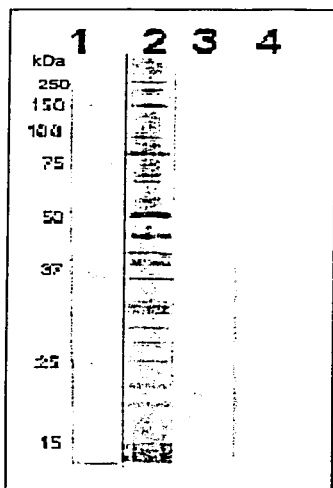


Fig. 3. Patrón de reconocimiento de antígenos de *E. histolytica*, mediante inmunoblot en membranas de nitrocelulosa. Carriles: (1) Marcador de peso molecular. (2) Patrón de reconocimiento de antígenos de *E. histolytica* utilizando como primer anticuerpo suero de conejo anti-*E. histolytica*. (3) Suero preinmune. (4) Control, (sólo se agregó el segundo anticuerpo). Se utilizó una dilución 1:4000 tanto para el primer y segundo anticuerpo. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

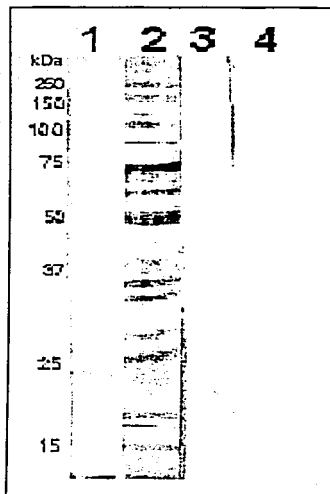
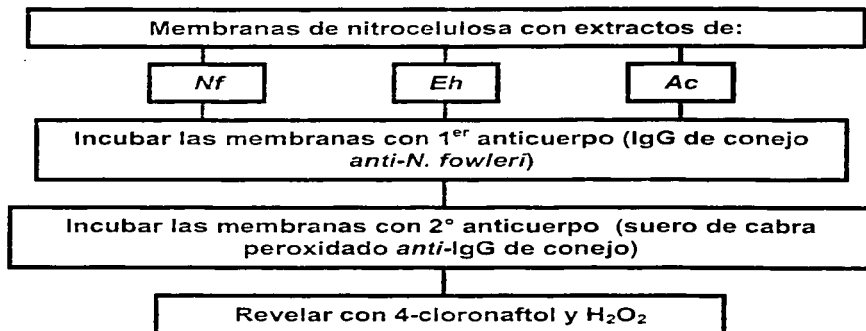


Fig. 4. Patrón de reconocimiento de antígenos de *A. culbertsoni*, mediante inmunoblot en membranas de nitrocelulosa. Carriles: (1) Marcador de peso molecular. (2) Patrón de reconocimiento de antígenos de *A. culbertsoni* utilizando como primer anticuerpo suero de conejo anti-*A. culbertsoni*. (3) Suero preinmune. (4) Control, (sólo se agregó el segundo anticuerpo). Se utilizó una dilución 1:4000 tanto para el primer y segundo anticuerpo. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Determinación de reacciones cruzadas. La estrategia a seguir, fue la siguiente:

### DETERMINACIÓN DE REACCIONES CRUZADAS



Para comprobar la existencia de reacciones cruzadas se realizaron inmunoblots utilizando IgG anti-*N. fowleri* (contra los tres extractos amibianos: *N. fowleri*, *E. histolytica* y *A. culbertsoni* respectivamente), IgG anti-*E. histolytica* (contra los tres extractos amibianos: *N. fowleri*, *E. histolytica* y *A. culbertsoni* respectivamente) e IgG anti-*A. culbertsoni* (contra los tres extractos amibianos: *N. fowleri*, *E. histolytica* y *A. culbertsoni* respectivamente). Se encontró que existen algunos anticuerpos del suero anti-*N. fowleri* que reconoce antígenos de *E. histolytica*, y *A. culbertsoni*. De igual forma, los sueros anti-*E. histolytica* y anti-*A. culbertsoni*, son capaces de reconocer antígenos de los tres extractos amibianos (fig. 5, 6 y 7). Estos resultados demuestran que *N. fowleri* comparte antígenos con las otras dos especies. Se observó que existe mayor reacción cruzada entre *N. fowleri* y *E. histolytica* que con *A. culbertsoni* (fig. 5, 6 y 7; tablas 2, 3 y 4).

La figura 5 muestra las reacciones cruzadas entre *N. fowleri* y las otras dos especies, *E. histolytica* y *A. culbertsoni* respectivamente. En la tabla 2, se presentan los pesos moleculares de los antígenos que son compartidos entre las tres especies. Como puede

observarse, la reacción cruzada es mayor entre *N. fowleri* y *E. histolytica*, ya que son 7 bandas las reconocidas por el suero anti-*N. fowleri* en el extracto de *E. histolytica* y sólo 4 bandas en el extracto de *A. culbertsoni*. Los valores de los pesos moleculares de las bandas, se obtuvieron mediante el análisis de las imágenes con el programa *Kodak Digital Science 1D v.2.0.1* de Kodak Scientific Imaging Systems.

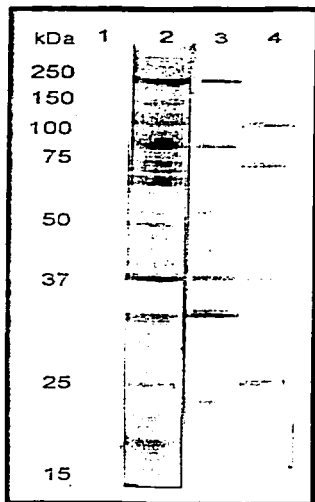


Fig. 5. Reacciones cruzadas de anticuerpos anti-*N. fowleri* con proteínas de *E. histolytica* y *A. culbertsoni*. Inmunoblot utilizando un extracto ambiguo por tira, las cuales fueron preincubadas con IgG de conejo anti-*N. fowleri* para determinar cuales son los anticuerpos que presentan reacción cruzada. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) extracto de *N. fowleri*, (3) extracto de *E. histolytica*, (4) extracto de *A. culbertsoni*. La dilución de los dos anticuerpos fue de 1:4000. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

**Tabla 2. Pesos moleculares de los antígenos reconocidos con suero anti-*N. fowleri* en los tres extractos amibianos.**

EXTRACTO <i>N. fowleri</i> vs SUERO anti- <i>N. fowleri</i>	EXTRACTO <i>E. histolytica</i> vs SUERO anti- <i>N. fowleri</i>	EXTRACTO <i>A. culbertsoni</i> vs SUERO anti- <i>N. fowleri</i>
317		
230	230	
197		
143		
116		116
90	90	
75		75
72		
67		
56		
52	52	
49		
46	46	
44		
41		
38	38	38
32	32	
28		
24		24
21	21	
19		
16		
15		

Las bandas detectadas son el resultado de las reacciones cruzadas entre las tres especies utilizando suero anti-*N. fowleri*. Los valores de los pesos moleculares se determinaron utilizando el programa *Kodak Digital Science 1D v.2.0.1*. Los pesos moleculares están expresados en kDa.

Las reacciones cruzadas entre las tres especies, utilizando IgG anti-*E. histolytica* se muestran en la fig. 6. Como puede observarse, existe un mayor número de antígenos que comparten entre sí, *N. fowleri* y *E. histolytica*.

Los pesos moleculares de las bandas de los antígenos compartidos utilizando IgG anti-*E. histolytica*, se presentan en la tabla 3. De igual forma, *E. histolytica* comparte mayor número de antígenos con *N. fowleri* (9 bandas), que con *A. culbertsoni* (3 bandas)

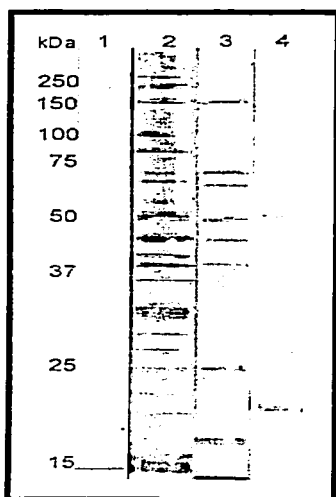


Fig. 6. . Reacciones cruzadas de anticuerpos anti-*E. histolytica* con proteínas de *N. fowleri* y *A. culbertsoni*. Inmunoblot utilizando un extracto ambiguo por tira, las cuales fueron preincubadas con IgG de conejo anti-*E. histolytica* para determinar cuales son los anticuerpos que presentan reacción cruzada. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) extracto de *E. histolytica*, (3) extracto de *N. fowleri*, (4) extracto de *A. culbertsoni*. La dilución de los dos anticuerpos fue de 1:4000. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

**Tabla 3. Pesos moleculares de los antígenos reconocidos con suero anti-*E. histolytica* en los tres extractos amibianos.**

EXTRACTO <i>E. histolytica</i> vs SUERO anti- <i>E. histolytica</i>	EXTRACTO <i>N. fowleri</i> vs SUERO anti- <i>E. histolytica</i>	EXTRACTO <i>A. culbertsoni</i> vs SUERO anti- <i>E. histolytica</i>
271		
229		
161	161	
131		
102		
86		
66	66	
62	62	
57		
51	51	51
46	46	
43		
40		
38	38	
35		
32		
28		
24	24	24
23	22	
22		
21		
19		19
16	16	
11		

Las bandas detectadas son el resultado de las reacciones cruzadas entre las tres especies utilizando suero anti-*E. histolytica*. Los valores de los pesos moleculares se determinaron utilizando el programa *Kodak Digital Science 1D v.2.0.1*. Los pesos moleculares están expresados en kDa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por último, la figura 7 muestra la reacción cruzada entre las tres especies utilizando IgG anti-*A. culbertsoni*. Como puede observarse, es precisamente *A. culbertsoni* la que menos antígenos comparte con las otras especies.

La tabla 4 muestra los valores de los pesos moleculares de los antígenos compartidos.

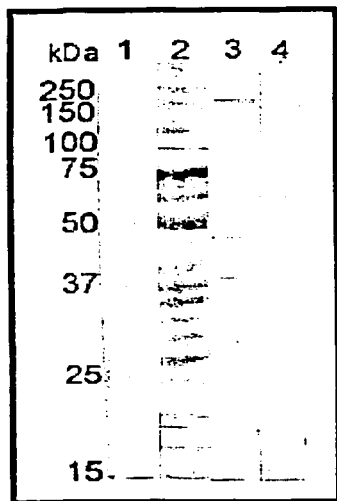


Fig. 7. . Reacciones cruzadas de anticuerpos anti-*A. culbertsoni* con proteínas de *N. fowleri* y *E. histolytica*. Inmunoblot utilizando un extracto ambiental por tira, las cuales fueron preincubadas con IgG de conejo anti-*A. culbertsoni* para determinar cuales son los anticuerpos que presentan reacción cruzada. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) extracto de *A. culbertsoni*, (3) extracto de *N. fowleri*, (4) extracto de *E. histolytica*. La dilución de los dos anticuerpos fue de 1:4000. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



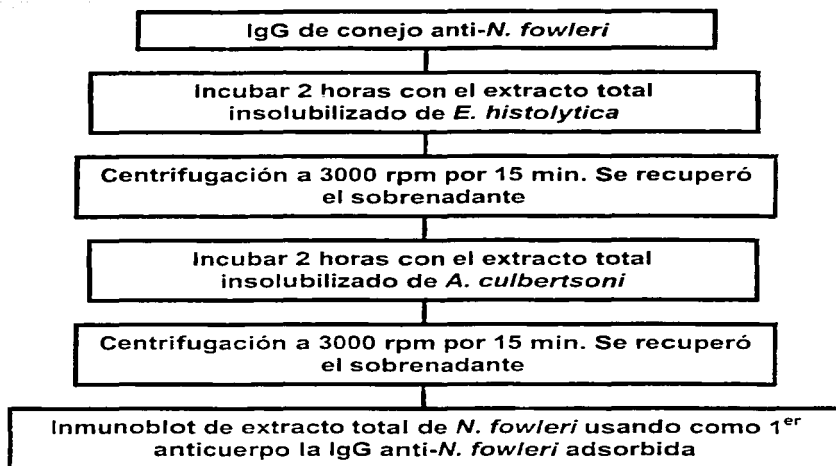
**Tabla 4. Pesos moleculares de los antígenos reconocidos con suero anti-A. culbertsoni en los tres extractos amibianos.**

EXTRACTO <i>A. culbertsoni</i> vs SUERO anti-A. <i>culbertsoni</i>	EXTRACTO <i>N. fowleri</i> vs SUERO anti-A. <i>culbertsoni</i>	EXTRACTO <i>E. histolytica</i> vs SUERO anti-A. <i>culbertsoni</i>
250		
197	197	197
118		
93		
67	67	67
56	56	56
53		
46	46	
41		
38	38	
35		
32		
28	28	
25		
22		22
18		
17		
16	16	

Las bandas detectadas son el resultado de las reacciones cruzadas entre las tres especies utilizando suero anti-A. *culbertsoni*. Los valores de los pesos moleculares se determinaron utilizando el programa *Kodak Digital Science 1D v.2.0.1*. Los pesos moleculares están expresados en kDa.

Para el objetivo particular 3, la estrategia fue la siguiente:

### IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE *N. fowleri*



Identificación de antígenos específicos de *Naegleria fowleri*. Se realizaron pruebas de adsorción para poder establecer los antígenos específicos de *N. fowleri*. La IgG anti-*N. fowleri* se incubó por dos horas con el extracto total de *E. histolytica* y posteriormente se volvió a incubar con el extracto total de *A. culbertsoni*.

El sobrenadante de las adsorciones se utilizó para realizar inmunoblots con extracto total de *N. fowleri* que se incubaron con el suero adsorbido.

La figura 8 muestra los antígenos que fueron reconocidos por el suero anti-*N. fowleri* después de ser adsorbido con los extractos totales de *E. histolytica* y *A. culbertsoni*. Al menos 9 bandas no se perdieron durante las adsorciones. El carril 4 es la adsorción del suero anti-*N. fowleri* adsorbido con extracto total de *N. fowleri* dos veces. Como era de esperarse, no hubo reconocimiento de bandas en el inmunoblot.

La tabla 5 presenta los pesos moleculares de los antígenos específicos de *N. fowleri* después de las pruebas de adsorción.

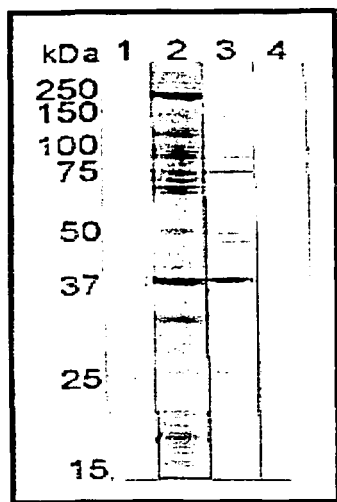


Fig. 8. Antígenos específicos de *N. fowleri* después de las pruebas de adsorción. Inmunoblot utilizando el extracto total de *N. fowleri*, las cuales fueron preincubadas con IgG de conejo anti-*N. fowleri* adsorbido previamente con el extracto total de *E. histolytica* y con el extracto total de *A. culbertsonii*, para determinar cuales son los antígenos específicos de *N. fowleri*. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) extracto de *N. fowleri*, preincubado con suero anti-*N. fowleri* sin adsorber, (3) extracto de *N. fowleri* preincubado con el suero anti-*N. fowleri* adsorbido, (4) extracto de *N. fowleri* preincubado con el suero anti-*N. fowleri* adsorbido con extracto total de *N. fowleri*. La dilución de los dos anticuerpos fue de 1:4000. El inmunoblot se reveló con 4-cloronaftol.

**Tabla 5. Pesos moleculares de los antígenos específicos reconocidos con suero anti-*N. fowleri* adsorbido con los extractos totales de *E. histolytica* y *A. culbertsoni*.**

EXTRACTO <i>N. fowleri</i> vs SUERO anti- <i>N. fowleri</i>	EXTRACTO <i>N. fowleri</i> vs SUERO anti- <i>N. fowleri</i> (adsorbido)
317	
230	
197	
143	143
116	116
90	90
75	75
72	
67	
56	
52	
49	49
46	46
44	
41	
38	38
32	
28	
24	24
21	
19	
16	
15	15

Las bandas detectadas son los antígenos específicos de *N. fowleri* después de las pruebas de adsorción. Los valores de los pesos moleculares se determinaron utilizando el programa *Kodak Digital Science 1D v.2.0.1*. Los pesos moleculares están expresados en kDa.

TRIS CON  
FALCÓN ORIGIN

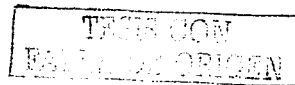
## 8. DISCUSIÓN.

Actualmente, la identificación de *Naegleria fowleri* como agente causal de la meningoencefalitis amibiana primaria, se realiza mediante la observación microscópica directa del organismo, en muestras de líquido cefalorraquídeo o en los cortes de cerebro obtenidos *postmortem*, lo cual requiere de personal especializado para poder realizar la identificación, sin contar que se requiere de tiempo para poder cultivar a la amiba e identificarla a nivel de especie. Desafortunadamente el curso clínico de la enfermedad dura entre 4 y 7 días, por lo que la mayoría de los individuos infectados muere antes de que se identifique al agente causal.

En este trabajo se obtuvieron dos logros muy importantes. Por un lado se confirmó y se amplió el conocimiento sobre lo señalado previamente por Rivera *et al.* (2000), en el sentido de que se presenta reacción cruzada entre *N. fowleri*, *E. histolytica*; y también se demostró que existe reacción cruzada con *A. culbertsoni*.

Este es un dato importante ya que desde la década de los 80's, se había argumentado que *N. fowleri* presentaba una reacción cruzada muy leve con *N. gruberi* (Cursons *et al.*, 1980). Sin embargo, este planteamiento fue rápidamente rechazado (Reilly, *et al.*, 1983; Marciano Cabral, *et al.*, 1987a), y posteriormente se comprobó que sí había una producción de anticuerpos reactivos a *N. fowleri*, y que era generada por la exposición a otras amibas del mismo género, en particular *N. lovaniensis* (Marciano Cabral, *et al.*, 1987a), amiba por cierto, no patógena en humanos (John, 1993).

La demostración de que *N. fowleri* comparte antígenos con amibas de otros géneros es un factor importante que sirve de apoyo para plantear posibles explicaciones sobre la incidencia y comportamiento de la MEAP. Sobre todo si se toma en cuenta que las amibas de vida libre potencialmente patógenas se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo y se pueden encontrar con facilidad en cuerpos de agua de uso recreativo e industrial, cabría esperar que la incidencia de casos fuese elevado, sin embargo, los reportes de infecciones por AVL, son relativamente extraños, y una posible explicación sería la protección contra *N. fowleri* que se estaría dando por efecto de la interacción con otros patógenos como por ejemplo *E. histolytica*.

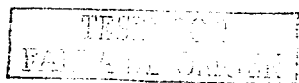


Se logró evidenciar que hay antígenos compartidos entre los 200 y los 15 kDa utilizando IgG de conejo anti-*N. fowleri*. Rivera *et al.* (2000) mencionan que hay reacción cruzada entre *N. fowleri* y *E. histolytica* y que se pueden reconocer al menos 5 proteínas cuyos pesos moleculares son: 170, 105, 62, 50 y 46 kDa, utilizando IgA humana, lo que complementa nuestros resultados ya que la reacción cruzada se da con diferentes isotipos, en este trabajo, usando IgG, los antígenos compartidos entre estas dos especies son, con IgG anti-*N. fowleri*: 230, 90, 52, 46, 38, 32, y 21, y con IgG anti-*E. histolytica* los antígenos compartidos tienen los siguientes pesos moleculares: 161, 66, 62, 51, 46, 38, 24, 22, y 16.

También se demostró que *N. fowleri* presenta reacción cruzada con *A. culbertsoni*. En contraste con lo reportado por Powell *et al.* (1994), en el presente trabajo se ha demostrado que al menos 4 proteínas entre los 250 y 15 kDa pueden ser reconocidas por anticuerpos IgG de conejo anti-*N. fowleri* en extractos de *A. culbertsoni*. Los pesos moleculares de estos antígenos son: 116, 75, 38, y 24 (tabla 2); y usando suero anti-*A. culbertsoni* en extracto de *N. fowleri*, se reconocen las siguientes bandas: 197, 67, 56, 46, 38, 28 y 16 (tabla 4).

El hecho de demostrar que *N. fowleri* comparte antígenos con otros géneros amibianos como con *E. histolytica* y *A. culbertsoni* es muy importante ya que podría explicar que a través de la exposición a estos microorganismos, los humanos pueden presentar una respuesta inmunológica que de alguna manera brinde protección contra *N. fowleri*, lo cual explicaría la baja incidencia de la enfermedad a nivel mundial en regiones donde es endémica y más tomando en cuenta que *E. histolytica* es el protozoo patógeno más ampliamente distribuido en territorio nacional (Cercedo, *et al.*, 1996; Gómez, *et al.*, 1995). Por otro lado, también se ha demostrado que amibas del género *Acanthamoeba*, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, aguas de todo tipo, suelo, aire, etc. (Bonilla, 2000; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997; Rivera *et al.* 81, 86a, 94). Lo cual significa que de una manera u otra existe una continua exposición a esos antígenos, sin que se desarrolle ninguna de las infecciones que producen, sin embargo es posible que dicha exposición confiera cierta resistencia a la infección que produce *N. fowleri*.

El otro punto, y quizás el más importante de este trabajo fue el hecho de identificar antígenos específicos de *N. fowleri* mediante las pruebas de adsorción ya que de esta



forma se eliminó una de las limitantes del uso de las técnicas serológicas como pruebas diagnósticas, radica en el hecho de no poder contrarrestar la presencia de las reacciones cruzadas y por ende, de dejar la duda de posibles falsos positivos o negativos según sea el caso.

Se identificaron 9 bandas que son específicas de *N. fowleri*, que tienen un peso molecular aproximado de 143, 116, 90, 75, 49, 46, 38, 24 y 15 kDa respectivamente (tabla 5) y que resultan de la eliminación de anticuerpos de reacciones cruzadas mediante las pruebas de adsorción, contra *E. histolytica* y *A. culbertsoni*.

Como se mencionó anteriormente, no se sabe aún si las reacciones entre anticuerpos humanos y *N. fowleri*, son un reflejo de la exposición al antígeno amibiano o es el resultado de una reacción cruzada debida a otra amiba (Cerva, 1989; Dubray *et al.*, 1987; Marciano Cabral, 1988; Reilly *et al.*, 1983). Por ejemplo, Potasman *et al.* (1986) demostró que de forma natural, existen personas que presentan anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*, sin poder identificar la fuente de estimulación antigénica. Por lo que se ha sugerido que debe haber similitudes antigénicas entre organismos patógenos y no patógenos.

La identificación de estos antígenos específicos de *N. fowleri*, brinda la oportunidad de desarrollar estrategias para su identificación, a través de métodos indirectos como lo son las pruebas inmunológicas, de tal suerte que se permita el diagnóstico certero de la enfermedad producida por esta amiba.

El objetivo a futuro es que a través de pruebas serológicas se logren diagnosticar las infecciones de amibas de vida libre en humanos. Sin embargo, aún queda mucho por hacer, ya que para lograr esto, se debe contar con una batería de antígenos amibianos que sean representativos de las diferentes especies y géneros, a fin de reconocer la presencia de anticuerpos en muestras de suero humano, contra estos microorganismos.

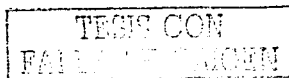
YESIS GONZÁLEZ  
FALLA DE ORIGEN

## 9. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- 1) *Naegleria fowleri* presenta antígenos específicos que pueden ser identificados mediante técnicas inmunológicas como el inmunoblot.
- 2) Los resultados demuestran que *N. fowleri* presenta un perfil complejo de proteínas, la mayoría de las cuales aparentemente son altamente inmunogénicas en conejos.
- 3) Por lo menos son 9 bandas las que comprenden el perfil de antígenos específicos de *N. fowleri* cuyos pesos moleculares son: 143, 116, 90, 75, 49, 46, 38, 24 y 15 kDa.
- 4) Las reacciones con suero inmune de conejo, demostraron que cada especie de las amibas utilizadas es serológicamente diferente.
- 5) Existe reacción cruzada entre *N. fowleri*, *E. histolytica* y *A. culbertsoni*; y que hay mayor similitud antigénica entre *N. fowleri* y *E. histolytica*.

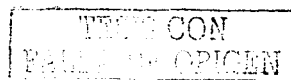
Es importante mencionar que si bien es cierto que se ha logrado demostrar reacción cruzada entre *N. fowleri* y otras cepas amibianas e identificar antígenos específicos, los eventos asociados con la exposición a antígenos de *N. fowleri* o a la inducción de anticuerpos, aún no se ha podido elucidar.





## 10. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Bonilla P., Ramirez E., Ortiz R., Calderon A., Gallegos E. y Hernandez D. 1999. Occurrence of pathogenic and free-living amoebae in aquatic systems of the Huasteca Potosina, Mexico. Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers. Leiden. The Netherlands.
- 2) Bonilla P. 2000. Heterogeneidad de las amibas de vida libre con potencial patógeno aisladas de la atmósfera de la Ciudad de México. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 106pp.
- 3) Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248.
- 4) Brown T. 1979. Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the pathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo cell cultures. *Journ. Med. Microbiol.* 12:363.
- 5) Butt CG. 1968. The pathology of amebic encephalitis. *J. Bull. Pathol.* 9:83.
- 6) Cain ARR., Mann PG., y Warhurst DC. 1979. IgA and primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet.* 1:441.
- 7) Campbell S. 1993. Amebic brain abscess and meningoencephalitis. *Seminars in Neurol.* 13(2):153.
- 8) Carter RF. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* 100:217.
- 9) Carter RF. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66:193.
- 10) Cercedo C.B.V., Cercedo O.J.F., Castillo R.G. 1996. Amibiasis: Estudios endoscópicos. *Acta Médica.* 31:21.
- 11) Cerva L., Serbus C. y Skocil V. 1973. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitologica.* 20:97.
- 12) Cerva L., Kasprzak W. y Mazur T. 1982. *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plants. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 26:152.



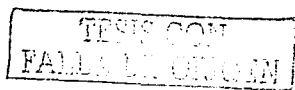
- 13) Cerva L. 1989. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **33**:99.
- 14) Cline M., Carchman R., Marciano-Cabral F. 1986. Movement of *Naegleria fowleri* stimulated by mammalian cells *in vitro*. *J. Protozool.* **33**:10.
- 15) Conde BM. 1990. *Entamoeba histolytica*: Relacion huesped parasito y respuesta inmune. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **32**:215.
- 16) Coronado-Gutierrez R. y Lopez-Ochoterena E. 1980. Analisis protozoologico de diez piscinas localizadas en el Distrito Federal y el Estado de Morelos, Mexico. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **22**:157.
- 17) Culbertson CG., Smith J. y Minner J. 1958. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. *Science.* **127**:1506.
- 18) Cursons RTM. y Brown TJ. 1978. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J. Clin. Pathol.* **31**:1.
- 19) Cursons RTM., Keys EA., Brown TJ., Learmonth J., Campbell C., y Metcalf P. 1979. IgA and primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet.* **i**:223.
- 20) Cursons RTM., Brown TJ., Keys EA., Moriarty KM., Till D. 1980. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect. Immun.* **29**:401.
- 21) Chang SL. 1974. Ethyological, pathological, epidemiological, and diagnostical consideration of primary amoebic meningoencephalitis. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **3**:135.
- 22) Chang SL. 1978. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:368.
- 23) De Jonckheere JF. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:751.
- 24) De Jonckheere JF. 1978. Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water. *Protistologica.* **14**:475.
- 25) De Jonckheere JF. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* **130B**:205.
- 26) De Jonckheere JF. 1981b. Pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* spp. in thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.* **28**:56.

- 27) De Jonckheere JF., Pernin P., Scaglia M. y Michel R. 1984. A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* **31**:324.
- 28) Diaz JO., Rosales A., Cifuentes MJ. y Mascaro C. 1991. Sucker-like structures in two strains of *Acanthamoeba* scanning electron microscopy study. *Intern. Journ. Parasitol.* **21**(3):365.
- 29) Dubray BL., Wilhelm WE., y Jennings BR. 1987. Serology of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* in a hospital survey. *J. Protozool.* **34**:322.
- 30) Duma RJ., Rosenblum WI., McGehee RF., Jones MM. y Nelson EC. 1971. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*: Two new cases, response to amphotericin B, and a review. *Ann. Intern. Med.* **74**:923.
- 31) Dunnebacke TH. y Schuster FL. 1985. Morphological response of cultured cells to *Naegleria* amoeba cytopathogenic material. *J. Cell Sci.* **75**:1.
- 32) Ferrante A. 1984. Mechanism of immunity to pathogenic free-living amoeba. *Australian Microbiol.* **5**:153.
- 33) Ferrante A. y Mocatta TJ. 1984. Human neutrophils require activation by mononuclear leucocyte conditioned medium to kill the pathogenic amoeba, *Naegleria fowleri*. *Clinic. Exp. Immuno.* **56**:559.
- 34) Ferrante A. y Bates EJ. 1988. Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infect. Immun.* **56**:3320.
- 35) Ferrante A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunology.* **13**:31.
- 36) Ferreira GE., Lares VF., Fernandez QG., Nieburg P., Ruiz MC. 1997. Meningoencefalitis amibiana primaria: dos brotes en Mexicali, Baja California, Mexico. *ITSON-DIEP.* **5**:43.
- 37) Fowler M. y Carter F. 1965 Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Brit. Med. J.* **2**:740.
- 38) Gomez AAV., Soto HB., Rivera GJL., Gonzalez SE. 1995. Tratamiento del absceso hepatico amibiano en niños. Revision de 20 casos. *Rev. Med. IMSS.* **33**:67
- 39) Hanadto HH., Aufy SM., el-Hayawan IA., Saleh MH. y Nagaty IM. 1993. Study of free living amoebae in Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **23**:631.

- 40) Hysmith RM. y Franson RC. 1982a. Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta.* 712:698.
- 41) Hysmith RM. y Franson RC. 1982b. Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta.* 711:26.
- 42) Jager BV. y Stamm WP. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet.* ii:1343.
- 43) John DT., Cole TB. y Bruner Ra. 1985. Amebostomes of *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 32:12.
- 44) John DT. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. In: Parasitic Protozoa, Ed. Kreier J.P. y Baker J.R. Academic Press. Nueva York. 140.
- 45) John DT. y Howard MJ. 1993. Virulencia of *Naegleria fowleri* affected by axenic cultivation and passage in mice. *Folia Parasitol.* 40:187.
- 46) Kadlec V., Skvarova J., Cerva L. y Nebazniva D. 1980. Virulent *Naegleria fowleri* in indoor swimming pool. *Folia Parasitol. Prague.* 27:11.
- 47) Kasprzak W., Mazur T. y Cerva, L. 1982. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitol. Prague.* 29:211.
- 48) Kenney M. 1971. The Micro-Kolmer complement fixation test in routine screening for soil ameba infection. *Health Lab. Sci.* 8:5.
- 49) Kilvington S., Beeching JR. y White GD. 1991. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29:310.
- 50) Lares VF., 2001. Free-living amoebae infections in Mexico. IXth. International Meeting on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. John Libbey Eurotext. Paris, Francia. 13-18.
- 51) Lopez-Corella E., De Leon BB. y De Jonckheere JF. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo Michoacan, Mexico. *Bol. Med. Hosp. Inf. Mex.* 9:619.
- 52) Lowrey DM. y McLaughlin J. 1985. Subcellular distribution of hydrolases in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 32:616.
- 53) Marciano-Cabral F. y Cline M. 1987. Chemotaxis by *Naegleria fowleri* for bacteria. *J. Protozool.* 34:127.



- 54) Marciano-Cabral F., Cline ML. y Bradley SG. 1987a. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria species*. *J. Clin. Microbiol.* **25**:692.
- 55) Marciano-Cabral F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Rev.* **52**:114.
- 56) Marciano-Cabral F., Zoghby KL. y Bradley SG. 1990. Cytopathic action of *Negleria fowleri* amoebae on rat neuroblastoma target cells. *J. Protozool.* **37**:138.
- 57) Martinez AJ. y Amado-Ledo E. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amibas de vida libre. *Protozoología, Epidemiología y Neuropatología. Morfología Normal y Patológica.* **B3**:679.
- 58) Martinez AJ. 1985. Free-living Amebas: Natural history prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press, Boca Raton, Florida. U.S.A. 156 p.
- 59) Martinez AJ., Guerra AE., Garcia J., Cespedes G., Gonzalez J. y Visvesvara G. 1994. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol.* **87**:430.
- 60) Martinez JA., y Visvesvara G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* **7**:583.
- 61) Page FC. 1974. To further study of taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of three new species and to key to generates. *Arch. Protistenk.* **116**:149.
- 62) Page FC. 1976. An illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 180pp.
- 63) Page FC. 1988. A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122pp.
- 64) Pelczar JM., Reid DR+, y Chan SC. 1982. Microbiologia. McGraw Hill, Nueva York. 826pp.
- 65) Potasman I., Araujo F.G., Remington J.S. 1986. Toxoplasma antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **24**:1050.
- 66) Powell EL., Newsome AL., Allen SD., y Knudson GB. 1994. Identification of antigens of pathogenic free-living amoebae by protein immunoblotting with rabbit immune and human sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1**(5):493.
- 67) Reilly MF., Bradley MK., y Bradley SG. 1982. Agglutination of *Naegleria fowleri* by human serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **170**:209.



- 68) Reilly MF., White KL. y Bradley SG. 1983. Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect. Immunity*. **42**:645.
- 69) Rivera F. y Paz ME. 1978. Criterios taxonomicos para las amebas limax. *Arch. Mex. Anat.* **15**:72.
- 70) Rivera A.V., Hernandez M.D., Rojas H.S., Oliver A.G., Tsutsumi V., Herrera G.N., Campos R.R. 2000. Immunoblot analysis of IgA antibodies to *Naegleria fowleri* in human saliva and serum. *Parasitol Res.* **86**:775.
- 71) Rivera F., Ortega A., Lopez-Ochoterena E. y Paz M. 1979. A quantitative, morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **98**:465.
- 72) Rivera F., Galvan M., Robles R., Leal P., Gonzalez L. y Lacy AM. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.* **28**:54.
- 73) Rivera F., Romero R. y Medina F. 1984a. Meningoencefalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. Med. Mexico*. **27**:113.
- 74) Rivera F., Medina F., Ramirez P., Alcocer J., Vilaclara G., Robles E. 1984b. Pathogenic and free-living protozoa isolated by culture from nasopharyngeal and oral regions of odontological patients. *Environ. Res.* **33**: 428.
- 75) Rivera F., Garcia G., Lugo A., Zierold E., Islas J., Ramirez E. y Bonilla P. 1986a. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution Journal*. **28**:185.
- 76) Rivera F., Rosas I., Castillo M., Chavez M., Gomez R., Chio RE. e Islas J. 1986b. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and regions of dental patients II. *J. Environ. Res.* **39**:364.
- 77) Rivera F., Roy-Ocotla G., Rosas I., Ramirez E., Bonilla P. y Lares F. 1987a. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *J. Environ. Res.* **42**:149.
- 78) Rivera F., Sanchez MR., Lugo A., Ramirez P., Ortiz R. y Calderon A. 1987b. Ciliates in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution*. **34**:245.
- 79) Rivera F., Lares F., Bonilla P., Ramirez E., Ramirez P. y Paulin A. 1988. Pathogenic amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. In: *Hazardous Waste: Detection, control, treatment*. Ed. Abbou, R. Elsevier Science, Amsterdam: 1175.

- 80) Rivera F., Lares F., Gallegos E., Ramirez E., Bonilla P., Calderon A., Martinez J., Rodriguez S. y Alcocer J. 1989a. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *J. Environ. Res.* **50**:289.
- 81) Rivera F., Gallegos E., Bonilla P., Ramirez E., Calderon A., Ortiz R. y Rodriguez S. 1991. Felix Dujardin (semblanza historica). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **42**:13.
- 82) Rivera F., Bonilla P., Ramirez E., Calderon A., Rodriguez S., Ortiz R., Hernandez D. y Rivera V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* **74**:65.
- 83) Robert VB. y Rorke LB. 1973. Primary amebic encephalitis, probably from *Acanthamoeba*. *Ann. Intern. Med.* **79**:174.
- 84) Rodriguez-Perez E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectologia.* **4**:263.
- 85) Sadaka HA., el-Nassery SF., Samra LM. y Awadalla HN. 1994. Isolation and identification of free-living amoeba from some water source in Alexandria. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **24**:247.
- 86) Scaglia M., Strosselli M., Grazioli V., Bernuzzi M. y De Jonckheere JF. 1983. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1282.
- 87) Schuster FL. 1979. Small amebas and ameboflagellates. En: Levandowsky M. y Hunter SH (eds.) *Biochemistry and physiology of protozoa*, 1(2):215.
- 88) Skocil V., Cerva L. y Serbus C. 1970. Epidemiological study of amoebas of the limax group in military communities. First reports. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **14**:61.
- 89) Skocil V., Dvorak R., Sterba J., Slajs J., Serbus C. y Cerva L. 1972. Epidemiological study of the incidence of amoebas of the limax group in military communities. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **16**:101.
- 90) Sykora JL., Keleti G. y Martinez J. 1983. Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:974.
- 91) Tew JG., Burmeister J., Green EJ., Pflaumer SK., y Goldstein J. 1977. A radioimmunoassay for human specific for microbial antigens. *J. Immunol. Meth.* **14**:231.
- 92) Valenzuela G., Lopez-Corella E. y De Jonckheere JF. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**:558.

TRABAJOS  
 FALTA DE ORIGEN

- 93) Visvesvara GS., Schuster FL. y Martinez J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. sp., Agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* **40**:504.
- 94) Wang SS. y Feldman HA. 1967. Isolation of *Hartmannella* species from human throats. *N. Engl. J. Med.* **277**:1174.
- 95) Weekers, PHH. 1993. *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. Ecophysiological, biochemical and biological differences. Tesis Doctoral. University of Nijmegen, The Netherlands. 122 pp.
- 96) Wellings FM., Amuso SL. y Lewis AL. 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**:661.
- 97) Wellings FM., Amuso SL., Lewis AL., Farmelo MJ., Moody DJ. y Oiskowics CL. 1979. Pathogenic *Naegleria*, Distribution in Nature. Environmental Protection Agency, Cincinnati, EPA/600/1-79-018.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



APÉNDICE 1  
**MEDIOS DE CULTIVO**

**Medio Bactocasitona al 2%.**

Bactocasitona	2 gr
Agua destilada	100 ml

Se disuelve la Bactocasitona en agua destilada, se vacía en frascos de vidrio con tapón de rosca y se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min.

Antes de utilizarse se agregan 10 ml de suero fetal de bovino (en condiciones de esterilidad) a cada frasco con bactocasitona.

**Medio Chang modificado.**

Peptona Biotriptasa	16.6 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 gr
Dextrosa	2.7 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9 gr
Agua destilada	1 lt

Se mezclan los componentes en seco, se disuelven en agua destilada y se vierte en frascos de vidrio con tapón de rosca. Se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min.

Antes de utilizarse se agregan 10 ml de suero fetal de bovino (en condiciones de esterilidad) a cada frasco con medio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Medio Ty1-S-33

Biosate	30 gr
Glucosa	10 gr
NaCl	2 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 gr
Cisteína	1 gr
Citrato férrico de amonio	0.0236 gr
Ácido ascórbico	0.2 gr

Se mezclan los componentes en seco, se disuelven en agua destilada y se vierte en frascos de vidrio con tapón de rosca. Se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE 2  
**ELECTROFORESIS E INMUNOBLOT**

**Solución de poliacrilamida**

<i>REACTIVO</i>	<i>50 ml</i>
Acrilamida	15 g
Bis-Acrilamida	0.4 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a 4°C en oscuridad total.

NOTA: Este reactivo es muy tóxico por lo que se requiere para su preparación, usar guantes y cubrebocas.

**Amortiguador Gel Separador (Tris-Base 1.5M, pH 8.8)**

<i>REACTIVO</i>	<i>100 ml</i>
Tris-Base	18.15 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Ajustar el pH a 8.8  
Almacenar a 4°C.

**Amortiguador Gel Separador (Tris-Base 0.5M, pH 6.8)**

<i>REACTIVO</i>	<i>100 ml</i>
Tris-Base	6 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Ajustar el pH a 6.8  
Almacenar a 4°C.



## **SDS 20%**

<i>REACTIVO</i>	<i>50 ml</i>
SDS	5 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a temperatura ambiente.

## **Amortiguador de Tratamiento 2X SDS (Tris-Base 0.125M, pH 6.8, SDS 4%, Glicerol 20%, 2-Mercaptoetanol 10%)**

<i>REACTIVO</i>	<i>10 ml</i>
Amortiguador	2.5 ml
Gel Concentrador	
SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
2-Mercaptoetanol	0.2 ml
Azul de Bromofenol	0.2 mg

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Dividir en alícuotas de 200  $\mu$ l y almacenar a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

## **APS 10% (Persulfato de amonio)**

<i>REACTIVO</i>	<i>1 ml</i>
APS	0.1 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
NOTA: Debe prepararse al momento en que se correrá la electroforesis.

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

**Amortiguador de Electroforesis (Tris-Base 0.025 M, pH 8.3, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%)**

<b>REACTIVO</b>	<b>1 litro</b>
Tris-Base	3.025 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a 4°C.

**Colorante Azul de Coomasie R-250 (Azul de Coomasie R-250 0.025%, Metanol 40%, Ácido acético 7%)**

<b>REACTIVO</b>	<b>1 litro</b>
Azul de Coomasie R-250	0.25 g
Metanol	400 ml

Agitar hasta disolver.

Ácido acético	70 ml
---------------	-------

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a temperatura ambiente en oscuridad total.

**Solución Desteñidora No. 1**

<b>REACTIVO</b>	<b>1 litro</b>
Metanol	400 ml
Ácido acético	70 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a temperatura ambiente.

## Solución Desteñidora No. 2

<b>REACTIVO</b>	<b>1 litro</b>
Metanol	50 ml
Ácido acético	70 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.

Almacenar a temperatura ambiente.

## PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

### GEL SEPARADOR

<b>REACTIVO</b>	<b>GEL 10%</b> <b>10ml</b>	<b>GEL 7.5 %</b> <b>10 ml</b>	<b>GEL 12%</b> <b>10 ml</b>
Poliacrilamida	3.33 ml	2.5 ml	4.16 ml
Amortiguador Tris-Base pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS 20%	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Agua bidestilada	4 ml	4.87 ml	3.2 ml
Temed	6.5 $\mu$ l	6.5 $\mu$ l	6.5 $\mu$ l
APS 10%	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

### GEL CONCENTRADOR

<b>REACTIVO</b>	<b>5 ml</b>
Poliacrilamida	0.67 ml
Amortiguador Tris-Base pH 6.8	1.25 ml
SDS 20%	25 $\mu$ l
Agua bidestilada	3 ml
Temed	5 $\mu$ l
APS 10%	80 $\mu$ l

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Amortiguador de Transferencia.**

<b>REACTIVO</b>	<b>1 litro</b>
Tris-Base	3.025 g
Glicina	14.4 g
Agua bidestilada	500 ml
Metanol	200 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a 4°C.

### **Solución Bloqueadora 6%**

<b>REACTIVO</b>	<b>50 ml</b>
Leche Descremada	1.2 g

Disolver en PBS-Tween y aforar a la cantidad correspondiente.

### **Solución Sustrato y Cromógeno.**

<b>REACTIVO</b>	<b>20 ml</b>
Metanol	3.5 ml
4-Cloronaftol	10 mg
PBS 1X	16.5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µl

NOTA: Este reactivo es muy tóxico por lo que se requiere para su preparación, usar guantes y cubrebocas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**APÉNDICE 3**  
**REACTIVOS**

**PBS 10X**

<i>REACTIVO</i>	<i>1 litro</i>
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a 4°C.

**PBS 1X**

<i>REACTIVO</i>	<i>1 litro</i>
PBS 10X	100 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a 4°C.

**PBS-Tween**

<i>REACTIVO</i>	<i>1 litro</i>
PBS 10X	100 ml
Tween 20	0.5 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a 4°C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### **Trisma-Base 100 mM**

<i>REACTIVO</i>	<i>100 ml</i>
Tris-Base	1.211 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.  
Almacenar a 4°C.

### **PHMB 20 mM**

<i>REACTIVO</i>	<i>20 ml</i>
PHMB	0.144 g

Disolver en Tris-Base 100 mM y aforar a la cantidad correspondiente.

### **EDTA 20 mM**

<i>REACTIVO</i>	<i>20 ml</i>
EDTA	0.149 g

Disolver en Tris-Base 100 mM y aforar a la cantidad correspondiente.

### **ZnCl<sub>2</sub> 20 mM**

<i>REACTIVO</i>	<i>20 ml</i>
ZnCl <sub>2</sub>	0.055 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Cóctel de Inhibidores (PHMB, EDTA, ZnCl<sub>2</sub>)

<i>REACTIVO</i>	<i>20 ml</i>
PHMB 20 mM	5 ml
EDTA 20 mM	5 ml
ZnCl <sub>2</sub> 20 mM	5 ml
PBS 1X	5 ml

Mezclar todos los componentes. Hacer alícuotas de 1 ml.

Almacenar a -70°C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN