



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



F E S I

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias  
de la Salud y la Educación

(UIICSE)

Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes

(LIPE)

“Detección de amibas de vida libre potencialmente patógenas en las  
lagunas “La Marmolera” y “Ojo de Agua”, en Ixhuatlancillo y  
Orizaba, Veracruz”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA:

JOSÉ DE JESÚS CHÁVEZ CASTAÑEDA

DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Este trabajo va dedicado a ti **Martha Castañeda Rodríguez**, una mujer que siempre ha estado ahí conmigo mucho antes de que naciera. Que no le importó afrontar infinidad de circunstancias para que yo siguiera adelante. Tu vida, tu esfuerzo, la sabiduría que me has compartido amorosamente y las memorias que hemos creado juntos... no puedo describir de forma exacta mediante las letras ni palabras lo eternamente agradecido por todo lo que has hecho y no cabe duda que, para regresarte todo ese amor y cariño, necesitaré vivir muchas vidas más. Recuerda que aún en el final de mi vida y aún después de ello, siempre tendré el orgullo y alegría de que usted haya sido, sea y seguirá siendo mi madre.

## Agradecimientos

A mi madrina Patricia, desde que tuve la enorme suerte de conocerla en mi infancia, le estoy enormemente agradecido por su apoyo. Por ayudar a mi madre. De verdad que me siento afortunado de contar con usted.

A mis abuelitos Micaela y Salvador, por haber criado a una gran mujer, sus obras aún perduran a pesar del paso del tiempo.

A mi asesora Dra. Elvia Gallegos Neyra, por su gran apoyo desde que la conocí.

Al Dr. Arturo Calderón por haberme aceptado desde el proyecto de LICyT.

A mis hermanos de espíritu Joshua Ariel Díaz Dávila, Francisco Javier Castellanos García y José Rodrigo Vázquez Camacho.

A Paco por sus consejos llenos de sinceridad y experiencia, siempre los tengo en mente. Muchas gracias por todo.

A Paty por su cariño y tiempo. Una mujer muy inteligente y profesional, además de tierna y muy sincera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todos los hermosos momentos que pasé y el aprendizaje obtenido. Si pudiera volver a nacer, volvería a entrar en esta hermosa institución.

Al pueblo de Orizaba, así como al resto del pueblo de Veracruz, un estado lleno de vida, cultura y gente muy trabajadora.

“Tercera Ley de Newton, la única manera de que los humanos descubran cómo llegar a alguna parte, es dejando algo atrás” -Nolan, C. (Director). (2014), *Interestelar* [Film].

## CONTENIDO

CONTENIDO .....	1
CONTENIDO DE FIGURAS .....	4
CONTENIDO DE CUADROS .....	5
I RESUMEN.....	1
II INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 Amibas de vida libre.....	2
1.2 Taxonomía de las amibas de vida libre .....	2
1.3 Ecología de las amibas de vida libre .....	5
1.4 Ciclo de vida de las amibas de vida libre .....	6
1.5 Patologías causadas por amibas de vida libre potencialmente patógenas .....	7
1.5.1 Afecciones del sistema nervioso central.....	7
1.5.1.1 Encefalitis amibiana granulomatosa.....	7
a) Rutas de invasión y mecanismos de patogenicidad .....	8
b) Síntomas y diagnóstico de la encefalitis amibiana granulomatosa .....	10
1.5.1.2 Encefalitis amibiana causada por <i>Sappinia</i> spp.....	11
1.5.1.3 Meningoencefalitis amibiana primaria .....	12
a) Ruta de invasión, síntomas clínicos y diagnóstico.....	12
b) Desarrollo y mecanismos de patogenicidad de <i>Naegleria fowleri</i> .....	13
c) Distribución de <i>Naegleria fowleri</i> .....	14
1.5.2 Afecciones oculares por amibas de vida libre .....	15
1.5.2.1 Queratitis amibiana por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	15
a) Ruta de invasión.....	15
b) Síntomas clínicos de queratitis amibiana por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	15
c) Diagnóstico clínico de queratitis amibiana por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	17
1.5.3 Afecciones dermatológicas causadas por amibas de vida libre.....	18
1.5.3.1 Acantamebiasis cutánea.....	18
a) Ruta de invasión.....	18
b) Síntomas clínicos de la acantamebiasis cutánea por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	19
1.5.3.2 Lesiones cutáneas por <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	19
1.6 Epidemiología de amibas de vida libre.....	20
1.6.1 Amibas de Vida Libre en México.....	20
III ANTECEDENTES .....	21



IV JUSTIFICACIÓN.....	24
V OBJETIVOS.....	25
1.1 Objetivo general .....	25
1.1.1 Objetivos particulares.....	25
VI ÁREA DE ESTUDIO.....	26
1.1 Laguna “La Marmolera”.....	27
1.2 Laguna “Ojo de Agua” .....	29
VII MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
1.1 Trabajo de campo .....	31
1.1.1 Recolección y transporte de muestras .....	31
1.1.2 Registro de factores ambientales <i>in situ</i> .....	32
1.2 Trabajo en el laboratorio.....	32
1.2.1 Cultivo y aislamiento de amibas de vida libre.....	33
1.2.2 Identificación morfológica y registro fotográfico .....	33
1.2.3 Medición de quistes y trofozoítos.....	33
1.2.4 Análisis estadístico .....	33
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
1.1 Registro fotográfico de AVL potencialmente patógenas .....	34
1.1.1 <i>Acanthamoeba astronyxis</i> (Ray y Hayes, 1954).....	34
1.1.2 <i>Acanthamoeba castellanii</i> (Douglas, 1930).....	35
1.1.3 <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> (Singh y Das, 1970).....	36
1.1.4 <i>Acanthamoeba griffini</i> (Sawyer, 1971) .....	37
1.1.5 <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (Puschkarew, 1913) .....	38
1.1.6 <i>Naegleria gruberi</i> (Schardinger, 1899; Wilson, 1916).....	39
1.1.7 <i>Naegleria</i> sp. (Alexieieff, 1912; emend. Calkins, 1913, Carter, 1970).....	40
1.1.8 <i>Sappinia pedata</i> (Dangeard, 1896).....	41
1.1.9 <i>Vahlkampfia</i> sp. (Chatton y Lalung-Bonnaire, 1912).....	42
1.1.10 <i>Vermamoeba</i> sp. (Alexeieff, 1912; emend. Page, 1974, antes <i>Hartmannella</i> ) .	43
1.2 Registro de amibas de vida libre no patógenas.....	44
1.2.1 <i>Rhizamoeba</i> sp. (Page, 1972) .....	44
1.2.2 <i>Vannella platipodia</i> (Gläser, 1912).....	45
1.3 Amibas de vida libre.....	46
1.3.1 Riqueza específica de AVL por temporada.....	48
1.4 Riqueza de AVL por sitio de muestreo .....	49

1.4.1 Laguna “Ojo de Agua” .....	49
1.4.1.1 Especies de amibas de vida libre .....	50
1.4.2 Laguna “La Marmolera” .....	51
1.4.2.1 Especies de amibas de vida libre .....	52
1.5 Riqueza de amibas de vida libre por biotopo .....	52
1.6 Parámetros físicos y químicos del agua .....	54
1.6.1 pH .....	54
1.6.2 Oxígeno disuelto .....	55
1.6.3 Conductividad .....	56
1.6.4 Temperatura del agua .....	57
1.7 Análisis estadístico .....	58
1.7.1 Índice de Jaccard .....	58
IX CONCLUSIONES .....	61
X RECOMENDACIONES .....	62
XI LITERATURA CITADA .....	63
ANEXO I .....	74
ANEXO II .....	76
1.1 Morfología de las amibas de vida libre .....	77
1.1.1 <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	77
a) Trofozoíto y quiste .....	77
b) Endosimbiosis con bacterias .....	79
1.1.2 <i>Naegleria</i> spp. ....	80
a) Trofozoíto, quiste y ameboflagelado .....	80
1.1.3 <i>Sappinia</i> spp. ....	82
a) Trofozoíto y quiste .....	83
b) Reproducción sexual .....	84
1.1.4 <i>Vahlkampfia</i> spp. ....	85
a) Trofozoíto y quiste .....	85
1.1.5 <i>Vermamoeba</i> spp. ....	85
a) Trofozoíto y quiste .....	85
ANEXO III .....	86

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de la vida organizado por Adl <i>et al.</i> , 2012.....	3
Figura 2. Ciclos de vida de las AVL .....	6
Figura 3. Corte de cerebro con granulomas causados por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	7
Figura 4. Rutas de invasión de <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	8
Figura 5. Modelo de invasión al epitelio corneal por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	9
Figura 6. Tomografía de paciente infectado por <i>Sappinia</i> sp.....	11
Figura 7. Trofozoítos de <i>Naegleria fowleri</i> .....	13
Figura 8. Queratitis por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	16
Figura 9. Procedimiento de raspado corneal para cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	17
Figura 10. Paciente con una infección cutánea por <i>Acanthamoeba</i> sp.....	18
Figura 11. Lesión nasal típica de infección por <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	19
Figura 12. Ubicación de las zonas de muestreo dentro de sus respectivos municipios.....	26
Figura 13. Localización de la primera zona de muestreo .....	27
Figura 14. Vista general de “La Marmolera” durante la época de secas.....	28
Figura 15. Zona litoral de “La Marmolera”.....	28
Figura 16. Localización del segundo sitio de muestreo.....	29
Figura 17. Entubamiento de parte de las aguas de "Ojo de Agua" .....	30
Figura 18. Vista general de “Ojo de Agua”.....	30
Figura 19. Vista general de los sitios muestreados en “La Marmolera”. ....	31
Figura 20. Vista general de los sitios muestreados en “Ojo de Agua” .....	32
Figura 21. <i>Acanthamoeba astronyxis</i> . Micrografía de quiste.....	34
Figura 22. <i>Acanthamoeba castellanii</i> . Micrografía de quiste.....	35
Figura 23. <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> . Micrografía de quiste .....	36
Figura 24. <i>Acanthamoeba griffini</i> . Micrografía de quiste .....	37
Figura 25. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> . Micrografía de quiste .....	38
Figura 26. <i>Naegleria gruberi</i> . Micrografía de trofozoíto .....	39
Figura 27. <i>Naegleria</i> sp. Micrografía de trofozoíto.....	40
Figura 28. <i>Sappinia pedata</i> . Micrografía de trofozoíto .....	41
Figura 29. <i>Vahlkampfia</i> sp. Micrografía quistes.....	42
Figura 30. <i>Vermamoeba</i> sp. Micrografía de quiste .....	43
Figura 31. <i>Rhizamoeba</i> sp. Micrografía de la fase flotante .....	44
Figura 32. <i>Vannella platipoda</i> . Micrografía de trofozoíto .....	45
Figura 33. Frecuencia total de géneros amibianos .....	48
Figura 34. Riqueza de AVL en ambas épocas de muestreo en los sitios .....	49
Figura 35. Distribución de géneros de AVL identificados en el sitio de “Ojo de Agua”.....	50
Figura 36. Distribución de géneros de AVL identificados en el sitio de “La Marmolera”..	51
Figura 37. Índice de Jaccard de las zonas de muestreo en temporada de secas .....	58
Figura 38. Índice de Jaccard de las zonas de muestreo en temporada de lluvia.....	59
Figura 39. Índice de Jaccard de similitud entre zonas de muestreo .....	60
Figura 40. Micrografía de luz en contraste de fases de <i>Acanthamoeba castellanii</i> a 40X...	78
Figura 41. Esquematación de quistes de <i>Acanthamoeba</i> .....	79
Figura 42. Clasificación de los quistes de <i>Acanthamoeba</i> .....	79
Figura 43. Fases de <i>Naegleria fowleri</i> .....	80
Figura 44. <i>Sappinia pedata</i> .....	82

Figura 45. <i>Sappinia pedata</i> : (A) Grabado de Dangeard de 1896 .....	83
Figura 46. División celular en <i>Sappinia diploidea</i> (Nägler, 1909) .....	84
Figura 47. <i>Vahlkampfia signyensis</i> .....	85
Figura 48. <i>Vermamoeba</i> spp.....	85

## CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de las AVL. ....	4
Cuadro 2. Géneros y especies de AVL identificadas durante los dos muestreos. ....	47
Cuadro 3. Presencia de especies de AVL en muestras de agua y de biopelículas.....	53
Cuadro 4. pH registrado en ambos sitios de muestreo .....	54
Cuadro 5. Oxígeno disuelto registrado en ambos sitios de muestreo en ambas épocas .....	55
Cuadro 6. Conductividad registrada en ambos sitios de muestreo en ambas épocas .....	56
Cuadro 7. Temperatura registrada en ambos sitios de muestreo en ambas épocas .....	57
Cuadro 8. Medio de cultivo NNE monoxénico para AVL. ....	75
Cuadro 9. Algunas especies del género <i>Naegleria</i> .....	81
Cuadro 10. Características del líquido cefalorraquídeo en diferentes condiciones. ....	87

## I RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL), son un grupo de protozoos que se presentan en diversos hábitats, se pueden encontrar en diversos cuerpos de agua tanto de origen natural como artificial, algunas tienen la habilidad de proliferar como formas de vida parasitarias en otros seres vivos, incluyendo a los humanos. Ciertas especies son agentes causales de algunas enfermedades en humanos como meningoencefalitis amibiana primaria, encefalitis amibiana granulomatosa, queratitis amibiana y acantamebiosis cutánea. El desenlace de estas afecciones por lo general termina en un deceso del paciente. En México no se cuenta con muchos reportes sobre la distribución de estos protozoos. Del mismo modo los reportes por infección por AVL's son escasamente reportados en algunos estados de la República como Veracruz de Ignacio de la Llave. Se llevó a cabo un estudio en el año 2015 en dos cuerpos de agua superficial en el estado de Veracruz, en dos localizaciones, la primera en el municipio de Orizaba conocido como "Ojo de Agua", el cual es un centro acuático recreativo y la segunda en el municipio de Ixhuatlancillo, en la laguna denominada "La Marmolera". Se realizaron dos muestreos; el primero en la época de secas en el mes de mayo y el segundo en época de lluvias en el mes de octubre. Se tomaron registros *in situ* de variables físicas y químicas como pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura del agua. Las muestras de agua y biopelículas recolectadas fueron cultivadas en medio NNE a una temperatura de 37 °C y posteriormente se identificaron morfológicamente para luego tener un registro fotográfico. De las 17 especies de AVL encontradas, ocho tienen reportes de importancia médica en humanos por tener potencial patógeno, el género *Acanthamoeba* fue el más frecuente en ambos cuerpos de agua. Las variables físicas y químicas del agua no presentaron valores significativos, cuyos índices oscilaron dentro de los ámbitos de tolerancia de las AVL según la literatura citada. Se realizó un análisis de similitud para encontrar diferencias significativas entre ambas épocas estacionales para ambos sitios de muestreo, el cual arrojó que no había diferencias significativas y mostró una distribución aleatoria de las AVL, además se cree que estos parámetros físicos y químicos ejercen una presión que evita la proliferación en exceso de las AVL, siendo lo ideal un monitoreo regular de estos cuerpos de agua para prevenir adquirir alguna infección por las AVL en usuarios que están en contacto con estos sitios. En conclusión, se generó el primer registro de AVL en el estado de Veracruz, reportando AVL que han sido reportadas con potencial patógeno con base a la literatura citada ya que se tiene especies con registros de infección en humanos registradas en otros estudios realizados. Se espera que este trabajo ayude a la contribución del conocimiento de la diversidad de protozoos del país y de la región.

## II INTRODUCCIÓN

### 1.1 Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) denominadas como amibas “típicas”, se encuentran agrupadas dentro de las Gimnamebas o “amibas desnudas” (Gallegos *et al.*, 2009b; Page, 1976). Dichos protozoos no poseen una adaptación óptima hacia la vida parasitaria, debido a ello se les considera como parásitos facultativos y para describir esta capacidad que tienen algunas amibas para vivir de forma libre y como endoparásitos se les ha denominado con el término de “anfizóico”, derivado del griego “ἀμφί”, que quiere decir “de ambos lados”, cuando son parásitos dentro del cuerpo humano, generalmente provocan la muerte del hospedero. No todas las AVL causan enfermedades en otros seres vivos, pero aquellas que las ocasionan se les considera como organismos oportunistas que pueden causar infecciones en zona como el sistema nervioso central (SNC), en los ojos, así como lesiones en la piel y otras enfermedades (Gallegos *et al.*, 2014).

### 1.2 Taxonomía de las amibas de vida libre

Durante mucho tiempo los protozoos fueron clasificados bajo criterios morfológicos, pero gracias a los estudios taxonómicos contemporáneos se ha corroborado que la naturaleza de este grupo es polifilética. Bajo el esquema realizado por Adl y colaboradores en 2012, basándose en estudios moleculares y filogenéticos, las amibas fueron organizadas en cuatro super grupos: Amoebozoa, Excavata, Opisthokonta y SAR (Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria) (Fig. 1).

Amebozoa (Lühe 1913; Cavalier Smith, 1998). Se agregan amibas desnudas o tecadas las cuales tienen crestas mitocondriales tubulares y que a menudo están ramificadas. Estas amibas pueden tener más de un núcleo, el enquistamiento es común además de tener una morfología variable; tienen la capacidad de tener reproducción sexual y asexual además de presentar la formación de pseudópodos no eruptivos con forma variable.

Excavata (Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson 2003). Grupo de protistas que poseen una profunda ranura de alimentación denominado surco oral o “excavado” de ahí su denominación. Las partículas de alimentos son dirigidas a la cavidad oral mediante corrientes generadas por cilios dispuestos en los bordes del surco. Poseen mitocondrias atípicas, altamente modificadas. Algunos son endosimbiontes y viven en ambientes anóxicos. Su agrupación es algo controversial debido a que los estudios filogenéticos han apuntado a un origen monofilético. La ranura de alimentación por suspensión es una apomorfía homóloga a la de *Jakoba libera*. Incluyen amibas con una fase flagelada en algún punto de su ciclo de vida y el movimiento eruptivo de pseudópodos es común.

Opisthokonta (Cavalier-Smith, 1987, emend. Adl *et al.*, 2005). Organismos uninucleados sin mastigonemas presentes al menos en una etapa de su ciclo de vida. Poseen un par de centriolos o cinetosomas por lo general modificados. Dentro de este grupo están algunos protistas flagelados, ameboides, esporozoos, animales y hongos.

SAR (Cavalier-Smith, 1987, emend. Adl *et al.*, 2005). Este acrónimo se forma por tres grupos unidos dentro de este clado: Stramenpoles (Cleve, 1873), Alveolata (Nanny y McCoy, 1976) y Rhizaria (Moestroup y Sengco, 2001):

Stramenopiles (Cavalier-Smith, 1987, emend. Adl *et al.*, 2005): Organismos con motilidad, generalmente tienen dos cilios. Usualmente presentan un cilio anterior con mastigonemas dispuestos en un par de hileras y un cilio posterior, presentan tubulación en las crestas mitocondriales.

Alveolata (Cavalier-Smith, 1987, emend. Adl *et al.*, 2005): Tienen la característica de poseer alveolos corticales, sus crestas mitocondriales suelen ser tubulares o ampulitorio. Aquí se incluyen organismos que poseen cilios o flagelos pudiendo ser de vida libre o parasitarios.

Rhizaria (Cavalier-Smith, 1987, emend. Adl *et al.*, 2005). Organismos que presentan pseudópodos finos con patrones variables yendo de simples, ramificados o anastomosados.

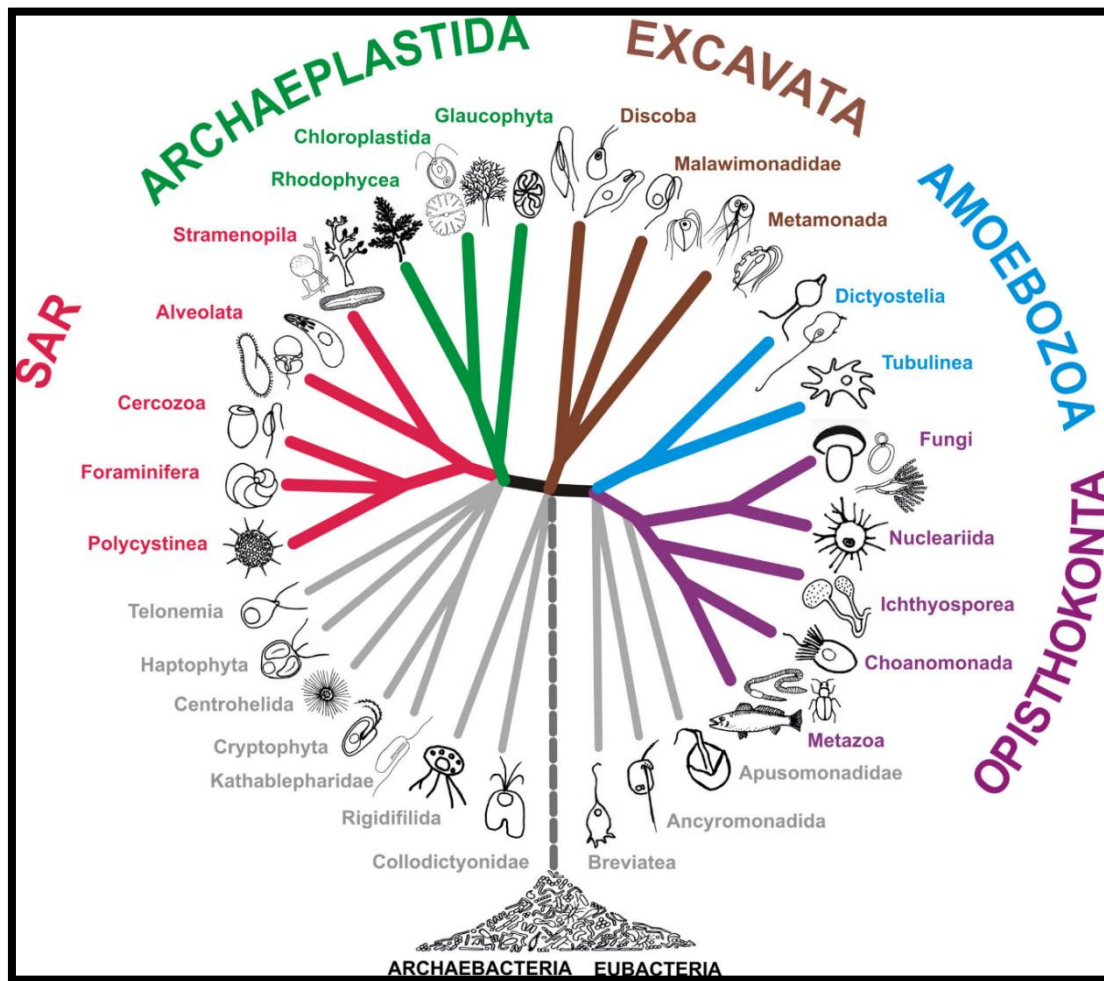


Figura 1. Árbol de la vida organizado por Adl *et al.*, 2012. Las amibas de vida libre se ubican en los supergrupos Amoebozoa, Excavata, Opisthokonta y SAR.

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo de protistas muy variados que se han ubicado taxonómicamente en diferentes apartados los cuales a su vez se han clasificado en varias subdivisiones para una eficaz identificación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de las AVL. Esquema realizado con base en Adl *et al.*, 2012.

Supergrupo	Amoebozoa	●Discosea	●●Longamoebia	●●Flabellinia		
			●●●Centramoebida	●●●Thecamoebida	●●●Vannellida	
			<i>Acanthamoeba</i>	<i>Sappinia</i>	<i>Vannella</i> *	
			<i>Balamuthia</i>			
		●Tubulinea	●●Euamoebida	●●Leptomyxida		
			<i>Vermamoeba</i>	<i>Rhizamoeba</i> *		
	Excavata	●Discoba	●●Discicristata			
			●●●Heterolobosea			
			●●●●Tetramitia			
			<i>Naegleria</i>			
				<i>Vahlkampfia</i>		

\*Géneros que no se tiene reportes de infección o coinfección.

Los géneros que han sido reportado con potencial patógeno son *Acanthamoeba*, el cual fue descrita por primera vez por Sir Aldo Castellani en 1930 que reportó la presencia de una amiba en cultivos de *Cryptococcus pararoseus* (Cabello-Vílchez, 2015; Marciano, 2003), *Balamuthia* es una amiba que fue clasificada dentro de la familia Leptomyxidae por su morfología y su movimiento tipo limax, actualmente solo se reconoce una especie, *B. mandrillaris*. El género *Naegleria*, lleva este nombre en honor al zoólogo francés Mathieu Naegler; en 1899 Franz Shardingier descubre una amiba que nombra como *Amoeba gruberi* pero años más tarde en 1912 Alexeieff le cambia el género por *Naegleria* (Siddiqui y Khan, 2014), *Sappinia* fue establecido por Pierre Augustin Dangeard en 1896 y las clasificó como de vida libre (Walochnik *et al.*, 2010), el género *Vahlkampfia* nace de las observaciones realizadas por Chatton y LaLung-Bonnaire en 1912 (Bonilla y Ramírez, 2014), *Vermamoeba* (antes *Hartmannella*), es descrito por Alexeieff, sus especies son demasiado comunes en el planeta (Oddó, 2006).



### 1.3 Ecología de las amibas de vida libre

Las AVL están ampliamente distribuidas en todo el planeta, de ahí que se le consideren como organismos cosmopolitas y/o ubicuos. Se les ha aislado del suelo, polvo, aire, agua continental, agua marina, piscinas, agua residual, sedimentos, aire acondicionado, lentes de contacto, cultivos celulares, equipo dental, lavados gastrointestinales, cultivos bacterianos y fúngicos, (Astorga, 2016; Gallegos *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 1979). Viven principalmente donde existen cuerpos de agua, ya sea continental hasta hipersalina, pudiéndose encontrar en las interfaces: agua-suelo, agua-planta, agua-aire, agua-animal (Coleman *et al.*, 1977; Foissner, 1987; Gallegos *et al.*, 2014). Han sido aisladas de vegetación y animales como peces, anfibios, reptiles y mamíferos; así como en la cavidad nasofaríngea de humanos aparentemente sanos y de pacientes inmunodeficientes (Castrillón y Orozco, 2013; Gallegos *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 1978).

Se propone que las amibas denominadas como del “suelo” son especies acuáticas las cuales han invadido hábitats terrestres, a pesar de encontrarse en varios sitios, todas tienen en común que la presencia de humedad es un factor esencial para su desarrollo, también se han encontrado en muestras obtenidas de la atmósfera, pero esto último ha sido en forma de quiste, infiriendo que el viento arrastró a sus formas de resistencia desde el suelo o superficie acuática (Gallegos *et al.*, 2014; Smirnov y Goodkov, 1999). Las amibas juegan un rol fundamental dentro de la cadena trófica bacteriana, siendo consideradas como valiosas depredadoras de bacterias ya que depredan el 50 % de la biomasa total bacteriana y así como la materia orgánica suspendida en el medio (Gallegos *et al.*, 2014; Marciano-Cabral, 1988). Partiendo de la premisa de que las AVL son residentes típicos de los suelos, se les considera que poseen un papel dentro del ciclo de los nutrientes ya que estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana de fósforo y nitrógeno en formas que las plantas pueden aprovechar, causando así un incremento en la biomasa de origen vegetal (Gallegos *et al.*, 2014)

## 1.4 Ciclo de vida de las amibas de vida libre

Las amibas de vida libre pueden presentar dos o tres fases/estadios. *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba*, tienen un ciclo que presenta dos fases (Fig. 2), una llamada trofozoíto la cual es la forma infectiva y activa, la otra fase se caracteriza por una estructura de resistencia llamada quiste, en la cual la amiba se aísla de su entorno como respuesta a condiciones poco favorables y le confiere alta resistencia incluso ante algunos tratamientos médicos. El género *Naegleria* (Fig.2) además de presentar un quiste y un trofozoíto, tiene la capacidad de proyectar flagelos para poder moverse en el entorno acuático ya sea en cuerpos de agua o dentro del hospedero, esta forma no representa riesgo de infección a diferencia del trofozoíto y no se tiene registro de que en esta forma la amiba se alimente (Marciano-Cabral, 1988). En el caso de *Sappinia*, presenta un ciclo similar a *Acanthamoeba*, pero no se tiene bien estudiado su vía de acceso a los humanos, aunque se sospecha que existe una relación con zonas donde el ganado ha defecado, ya que originalmente se aisló esta amiba en muestras de estiércol (Walochnik *et al.*, 2010). La principal vía de acceso de estas amibas con base en las muestras obtenidas en pacientes infectados, es la nariz y de forma previa haber realizado actividades acuáticas (Astorga, 2016; Castrillón y Orozco, 2013; Yoder *et al.*, 2012; Visvesvara, 2010). La morfología de las principales AVL potencialmente patógenas aisladas en el presente trabajo se encuentran en el anexo II.

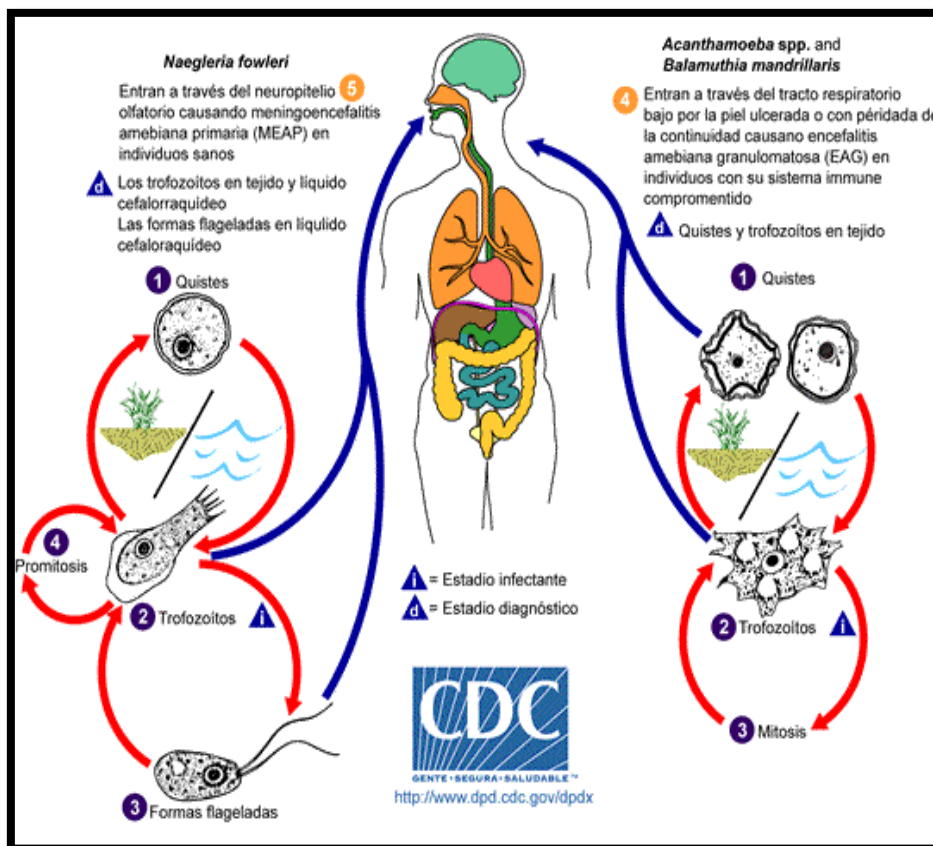


Figura 2. Ciclos de vida de las AVL de los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Naegleria* (CDC, 2013).

## 1.5 Patologías causadas por amibas de vida libre potencialmente patógenas

Algunas AVL además de tener un potencial patogénico en humanos, también pueden afectar a casi todos los grupos zoológicos registrados, además de poseer asociaciones de tipo endosimbióticas con bacterias de naturaleza patógena en humanos e inclusive estos organismos bacterianos incrementan la patogenicidad de las amibas (Gallegos *et al.*, 2014; Trabelsi *et al.*, 2012; Marciano, 2003). La versatilidad endosimbiótica que poseen ha sido un foco de análisis sobre su potencial uso como incubadoras de agentes patógenos.

### 1.5.1 Afecciones del sistema nervioso central

#### 1.5.1.1 Encefalitis amibiana granulomatosa

Es una enfermedad oportunista causada por *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris*; la cual se caracteriza por la aparición de una respuesta granulomatosa en el tejido infectado de ahí que se le nombre así al padecimiento como “Encefalitis Amibiana Granulomatosa” o EAG, de un modo más coloquial se le llama “acantamebiosis” (Fig. 3) (Bonilla y Ramírez, 2014; Castrillón y Orozco, 2013; Oddó, 2006). Cabe mencionar que los casos de infección por *Balamuthia mandrillaris* son escasos ya que es difícil de aislar y observar (Cabello-Vílchez, 2016).

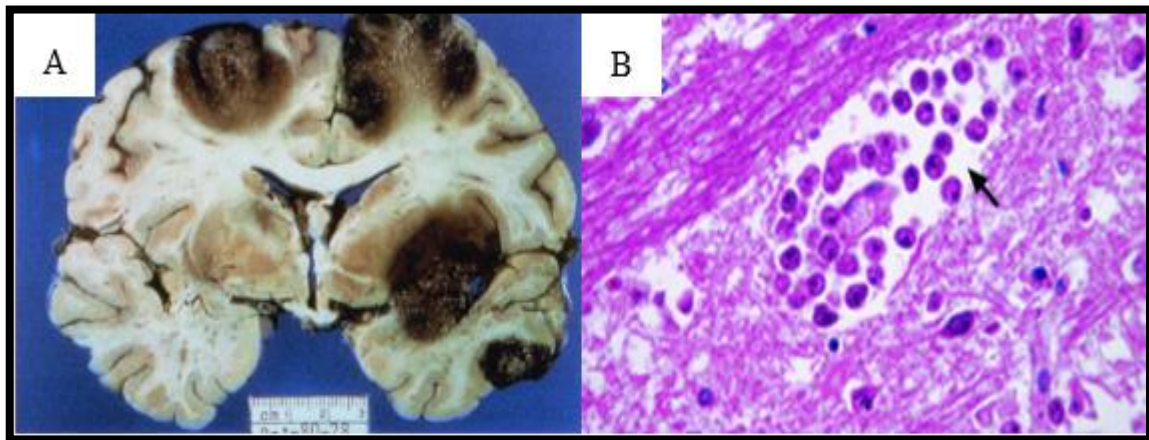


Figura 3. Corte de cerebro con granulomas causados por *Acanthamoeba* spp., (A) y Micrografías de numerosos trofozoítos alrededor de vasos sanguíneos (flecha negra) en el interior del cerebro, tinción de hematoxilina-eosina (B) (Marciano-Cabral, 2003).

## a) Rutas de invasión y mecanismos de patogenicidad

En el caso de *Acanthamoeba*, la ruta de invasión de los trofozoítos suele ser por ulceraciones cutáneas, tracto respiratorio bajo y el neuroepitelio olfatorio (Fig. 4), una vez que ingresan se dispersan por vía hematógna (Castrillón y Orozco, 2013; Chertorivski-Woldenberg *et al.*, 2012), hasta alcanzar el sistema nervioso central (SNC). Una vez dentro del SNC las zonas dianas son el cerebro, cerebelo. Los mecanismos de patogenicidad no han sido estudiados a fondo, pero hasta ahora se tiene conciencia de que la producción de enzimas por parte de las amibas, las cuales son de tipo hidrolasas lisosomales y fosfolipídicas causan necrosis en el tejido cerebral (Castrillón y Orozco, 2013). También se ha identificado que estos organismos liberan proteasas, proteinasas y elastasas (Fig. 5).

El primer paso crítico es su adhesión a la superficie de los tejidos a través de la expresión de una proteína transmembrana de aproximadamente 130 kDa, conocida como proteína ligada a manosa-PLM (en inglés: *mannose-binding protein-MBP*), que se une a glicoproteínas que contienen manosa expresadas en las células blanco (Cabello-Vílchez, 2015; Castrillón y Orozco, 2013; Visvesvara, 2010). El trofozoíto presenta amebostomas, los cuales fagocitan las células del huésped. Cuando se hacen análisis en el tejido *post mortem* se observa edema cerebral con necrosis hemorrágica. Durante el proceso defensivo del cuerpo por parte del sistema inmunológico, los leucocitos polimorfonucleares y células multinucleadas rodean y zonas de tejido afectada (Astorga, 2016).

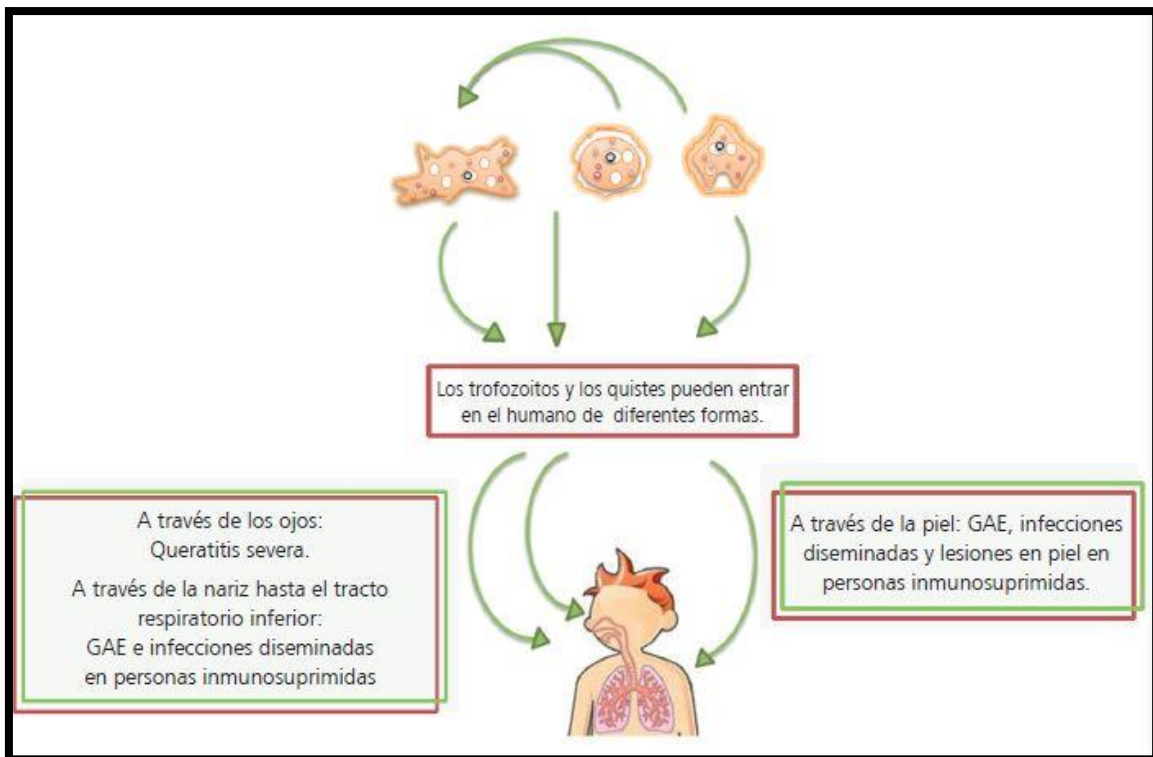


Figura 4. Rutas de invasión de *Acanthamoeba* spp.: lesiones en la piel, fosas nasales, ojos. Son las rutas de entrada de esta AVL (Castrillón y Orozco, 2013).

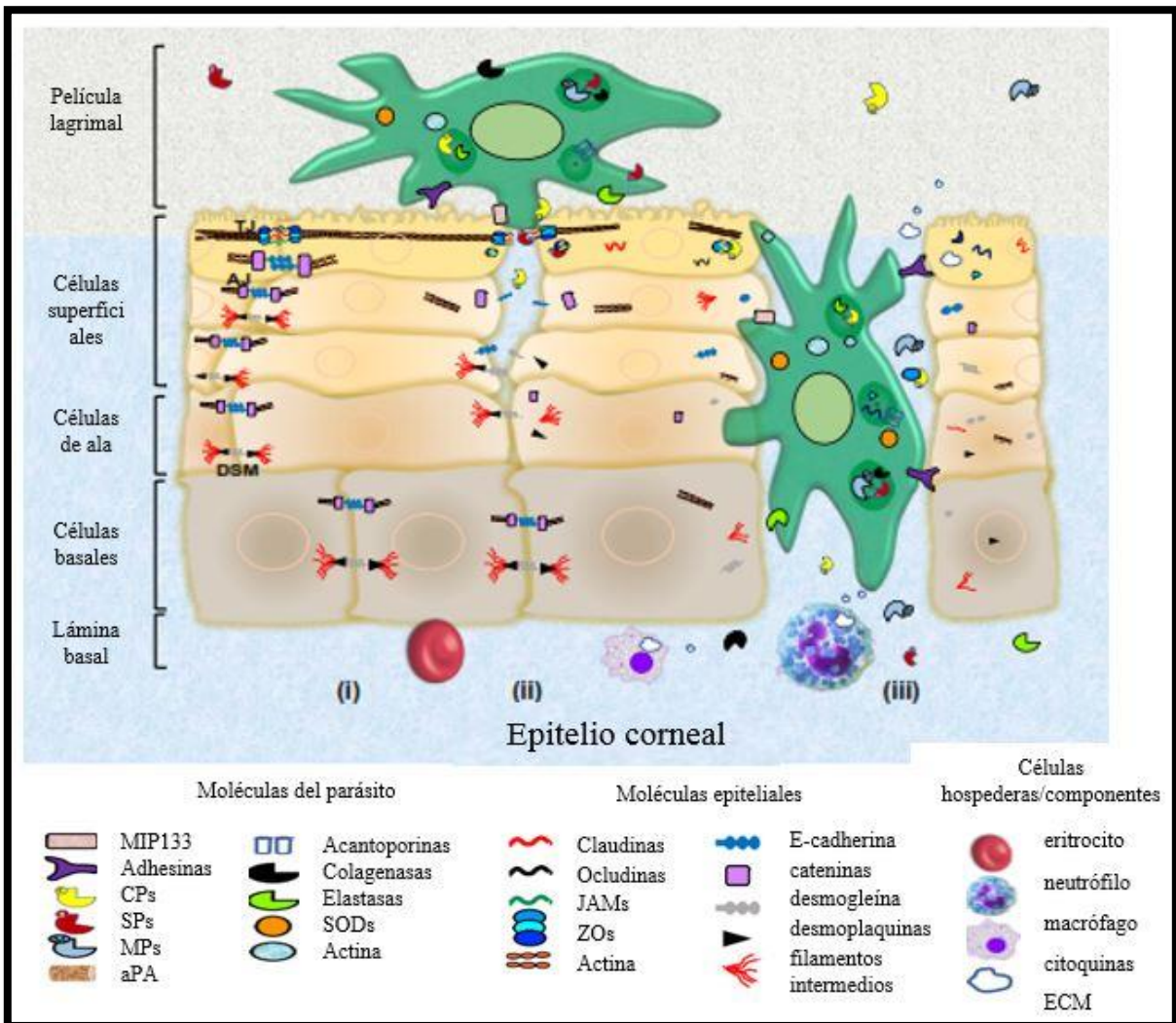


Figura 5. Modelo de invasión al epitelio corneal por *Acanthamoeba* spp. i) Epitelio estratificado de la córnea que funge como una barrera sólida por las uniones estrechas (TJ) en la capa superior de las células superficiales. En las capas siguientes, así como en las células del ala y basales solo tienen uniones adherentes (AJ) y desmosomas (DSM). ii) Los trofozoítos se adhieren a las células epiteliales en la zona del espacio intercelular, abriendo las uniones intercelulares (IJ) con la participación de adhesinas, proteasas y proteínas citolíticas inducidas por manosa de 133 kDa (MIP133). Los componentes de las IJ se degradan e internalizan selectivamente. iii) Una vez que las barreras son interrumpidas, las células epiteliales se separan y lisan, permitiendo la entrada de los trofozoítos a la lámina basal y finalmente al SNC. La acantoporina, proteasas, actina y la superóxido dismutasa (SOD) son cruciales en esta etapa. En respuesta el sistema inmune concentra neutrófilos y macrófagos e induce la producción de citoquinas (Betanzos *et al.*, 2019).

## **b) Síntomas y diagnóstico de la encefalitis amibiana granulomatosa**

La encefalitis amibiana granulomatosa se presenta en pacientes inmunocomprometidos, su curso es lento y progresivo. En los casos de infecciones no se sabe con certeza el periodo exacto de su incubación, tomando así semanas a meses para que se empiecen a presentar síntomas clínicos. El pronóstico para el paciente es poco favorable (Bonilla y Ramírez, 2014; Cabello-Vílchez, 2015; Khan, 2004; Marciano-Cabral, 2003). La enfermedad es crónica y una vez iniciados los síntomas el paciente puede presentar: cefalea, alteraciones del estado mental, fiebre leve, convulsiones, hemiparesia, vómitos, coma, rigidez de cuello y alteración de la visión (Bonilla y Ramírez, 2014; Cabello-Vílchez, 2015; Castrillón y Orozco, 2013; Chertorivski-Woldenberg *et al.*, 2012; Jercic, 2007; Marciano, 2003; Oddó, 2006; Tello *et al.*, 2020).

En el ingreso al hospital, el diagnóstico es generalmente de meningitis piógena; en el hospital, el cuadro clínico es de un continuo deterioro, somnolencia, y algunas veces con convulsiones (Cabello-Vílchez, 2015; Oddó, 2006). Usualmente la EAG es confundida con una leptomeningitis de tipo bacteriana, meningitis tuberculosa o una encefalitis vírica (Astorga, 2016). Estas amibas no son lo suficientemente conocidas por el personal de salud, por lo tanto, puede haber un subdiagnóstico o confusión con otros agentes etiológicos y no sospechar de la presencia de amibas de vida libre patógenas (Ayala y Peralta, 2009; Cabello-Vílchez, 2015). Una forma de diagnosticar a la amiba como agente causal es mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas usando suero anti-*Acanthamoeba* o anti-*B. mandrillaris* de suero de conejo además el uso de PCR es muy útil para confirmar la presencia de *B. mandrillaris* (Cabello-Vílchez, 2016).

En 2018, en Monterrey, México; un paciente adulto de 41 años de edad se le diagnosticó EAG después de hacerle una biopsia, el paciente murió tres meses después de haberle diagnosticado la enfermedad (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2018). En ocasiones cuando se extrae líquido cefalorraquídeo (LCR) se observan quistes y trofozoítos; al momento de analizar el LCR su contenido proteico tiende a ser elevado y la concentración de glucosa va de normal a baja (Bonilla y Ramírez, 2014; Chertorivski-Woldenberg *et al.*, 2012). Para las biopsias de tejido cerebral dañado, al ser vistas en microscopio muestran la presencia de formas tróficas y de resistencia (quistes). De esta forma se confirma un cuadro de acantamebiosis, las muestras de tejido se pueden teñir con hematoxilina y eosina (HyE) o por inmunofluorescencia indirecta (IIF).

### 1.5.1.2 Encefalitis amibiana causada por *Sappinia* spp.

En el año 2001, se informó de un caso de infección por *Sappinia* sp., se trató de un paciente masculino de 38 años de edad, no presentaba inmunosupresión y tenía un cuadro de encefalitis amibiana luego de haber tenido una infección en los senos paranasales (Gelman *et al.*, 2003). Era un agricultor a menudo involucrado en el manejo de los animales de pastoreo, presentaba pérdida de la conciencia, vómito, dolor de cabeza bifrontal, fotofobia y visión borrosa. Se detectó una masa solitaria de 2 cm en el lóbulo temporal izquierdo posterior. La lesión hemorrágica necrotizante (Fig. 6) fue extirpada y diseccionada, en las partes diseccionadas se le encontraron trofozoítos. Las amibas se presentaron alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 6), tenían un diámetro de 40 a 60  $\mu\text{m}$  y presentaban dos núcleos claramente distinguibles entre sí pero fijamente yuxtapuestos. Después de la escisión de la lesión y el tratamiento de múltiples fármacos sobre todo de una combinación de azitromicina, pentamidina vía intravenosa, itraconazol y flucitosina; finalmente el paciente se recuperó (Gelman *et al.*, 2003; Walochnik *et al.*, 2010).

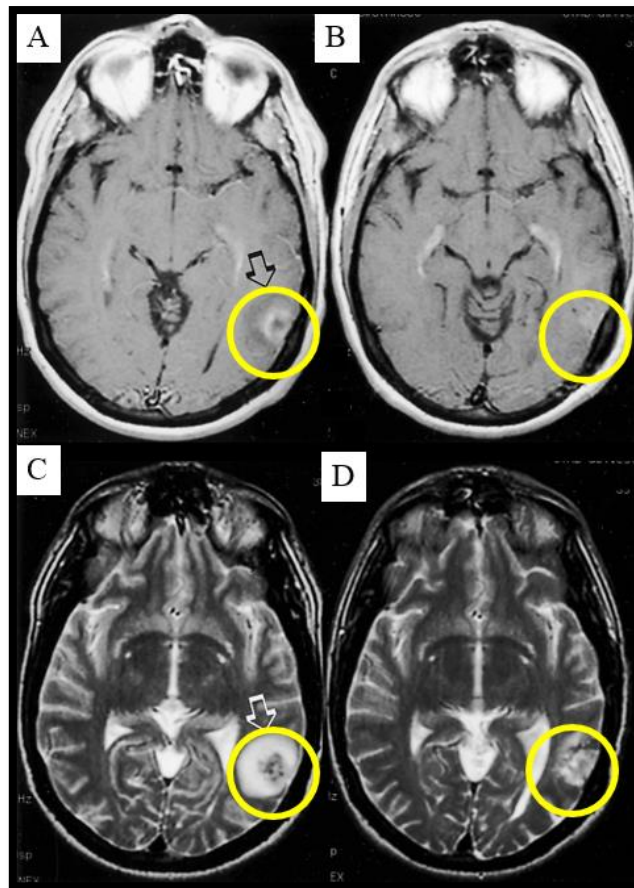


Figura 6. Tomografía de paciente infectado por *Sappinia* sp. A-C) Señalado con flechas y círculos amarillos, muestra el área del cerebro inflamada por encefalitis amibiana granulomatosa. B-D) Posterior a la extirpación de la zona infectada, se nota mejoría en la zona (Gelman *et al.*, 2003).

### 1.5.1.3 Meningoencefalitis amibiana primaria

También conocida como naegleriosis, es una infección aguda del sistema nervioso central (SNC), la cual se caracteriza por ser necrotizante, hemorrágica y por lo general suele ser fatal. El curso completo de la infección puede durar de tres a diez días.

#### a) Ruta de invasión, síntomas clínicos y diagnóstico

El acceso por parte del trofozoíto ocurre por invasión directa a través de la mucosa nasal y la lámina cribosa; ligado al desarrollo de actividades recreativas dentro de cuerpos de agua generalmente en las épocas cálidas cuando a las personas les ingresa el agua por presión a las fosas nasales (Kemble *et al.*, 2012; Vélez *et al.*, 2013; Visvesvara *et al.*, 2007). El trofozoíto lisa e ingiere eritrocitos (eritrofagocitosis) y otras células mientras avanza invasivamente por la mucosa nasal, migrando a través del nervio olfatorio, atravesando la placa cribiforme logrando llegar al neuroepitelio olfatorio de ahí avanzan al espacio subaracnoideo y finalmente invade el encéfalo (Martínez *et al.*, 2016; Rivera-Aguilar *et al.*, 2000). Dentro del cerebro ocasionan edema y necrosis hemorrágica por la producción de hidrolasas lisosomales, proteasas, neuroamidases, lipasas, elastasas y fosfolipasas que degradan la mielina dando como resultado graves daños irreparables en el infectado (Marciano *et al.*, 1982). De 1995 a 2004, *N. fowleri* causó la muerte a 23 personas en los Estados Unidos (Blair *et al.*, 2008). La manifestación de los síntomas suele ocurrir entre un día a siete días posteriores a la exposición. Los síntomas de la infección son similares a las meningitis de tipo bacteriano o viral. Dichos síntomas incluyen dolor de cabeza, fiebre, rigidez del cuello, anorexia, vómito, estado alterado de la conciencia, convulsiones y coma (Shibayama *et al.*, 2007). El tiempo promedio desde el inicio de los síntomas hasta la muerte usualmente es de cinco días (Yoder *et al.*, 2012).

Los métodos serológicos son poco eficaces debido a la poca a nula respuesta de anticuerpos cuando se quiere detectar casos de MEAP. Un método para su detección es la preparación de líquido cefalorraquídeo (LCR) (Fig. 7), a simple vista se ve turbio y purulento. Visto al microscopio de luz, contraste de fases o ambas, se puede ver un aumento de células principalmente neutrófilos (Chertorivski-Woldenberg *et al.*, 2012). Una vez observando la muestra se podrán identificar las formas tróficas muy fácilmente al observarse una forma limax de rápido avance por el campo de visión y un núcleo bien marcado además de su movimiento eruptivo. La tinción de Giemsa o de Wright permite ver el citoplasma teñido de azul claro y el núcleo de un color rosa. Como dato adicional, cuando las muestras son centrifugadas y observadas posteriormente, los trofozoítos tienen un aspecto redondeado, plano y sin presencia de pseudópodos (Bonilla y Ramírez, 2014; Martínez *et al.*, 2016; Chertorivski-Woldenberg *et al.*, 2012).

Para que un diagnóstico sea positivo a naegleriosis, se tienen que aislar siempre trofozoítos ya sea del LCR (Fig. 7) o de muestras cerebrales obtenidas por biopsia. Hay que tener cuidado al momento de analizar las muestras ya que suelen confundirse las células amibianas con células epiteliales, macrófagos o simple sedimento de la muestra. El cultivo de *Naegleria* requiere del mismo medio y preparación que *Acanthamoeba*. La MEAP es muy similar a la meningitis bacteriana y los resultados de laboratorio son semejantes (Chertorivski-



Woldenberg *et al.*, 2012). El nivel de glucosa suele estar en rangos bajos y el contenido de proteínas es alto (Anexo III, Cuadro 10). La muerte se debe a un incremento de la presión intracraneana aunado a la herniación cerebral llevando a un paro cardiopulmonar y edema pulmonar. A pesar de tener una naturaleza infecciosa, se limita exclusivamente al SNC y la donación de órganos de pacientes finados por MEAP es viable (Bennett *et al.*, 2008).

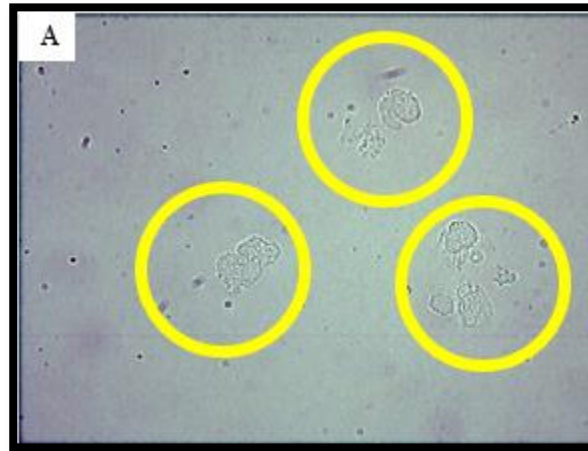


Figura 7. A) Trofozoítos de *Naegleria fowleri* (círculos amarillos) aislados del LCR de un paciente. Se muestra el citoplasma rodeando un notorio núcleo. (Vélez *et al.*, 2013).

#### **b) Desarrollo y mecanismos de patogenicidad de *Naegleria fowleri***

Una hora después de la invasión por *Naegleria fowleri*, existe una interacción con la mucosa nasal y pasadas seis horas los trofozoítos son rodeados por una reacción inflamatoria agudizada por neutrófilos (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2016). La respuesta innata para eliminar a *N. fowleri* resulta ser insuficiente, luego de las doce horas de la infección los trofozoítos se unen y logran penetrar el neuroepitelio olfatorio (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2016; Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Shibayama *et al.*, 2013). Cuando transcurren treinta horas desde la infección los trofozoítos ya se encuentran en la placa cribiforme, de dos a tres días las amibas llegan al bulbo olfatorio sin causar una respuesta inflamatoria (Jarolim *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2016; Rojas-Hernández *et al.*, 2004). Al transcurrir cuatro días de la infección se presenta un cuadro inflamatorio agudo que consiste en neutrófilos y eosinófilos además el número de trofozoítos observados en el bulbo olfatorio aumentan. En un lapso de cinco a siete días se observan extensas áreas de necrosis lítica y hemorrágica (Martínez *et al.*, 2016; Rivera-Aguilar *et al.*, 2000).

El primer paso durante el proceso de invasión es la adhesión, una de las proteínas que se relacionan con este fenómeno es una proteína del tipo de las integrinas de 60 kDa la cual ha sido encontrada fuera de su membrana (Han *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2016). Las proteasas poseen un papel crucial en la vida y proceso infectivo, la esfingomielina es degradada por la acción de enzimas fosfolipasas (Chang, 1979; Hysmith y Franson, 1982). También se sabe de la presencia de fosfatasa y leucina aminopeptidasa, así como de las naeglerioporos A y B (N-A y N-B) proteínas proteolíticas que son tóxicas en células humanas, la participación de

cisteína proteasa durante el procesamiento bioquímico de los naeglerioporos resulta esencial (Herbst *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2016). Un tipo de proteasa presente en *N. fowleri* la cathepsina B, tiene la capacidad de degradar la inmunoglobulina A, G y M (IgA, IgG e IgM), así como el colágeno, fibronectina, hemoglobina y albúmina (Lee *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2016). Otro mecanismo importante de patogenicidad asociado a la invasión del sistema nervioso central (SNC) es la locomoción activa (Fulton, 1977) así como el proceso de fagocitosis de diversas células del hospedero (Alonso y Zubiaur, 1985; Marciano-Cabral y John, 1983). La presencia de Nf-actina está asociada con el proceso de fagocitosis de *N. fowleri*, esta proteína se encuentra presente en los amebostomas y en el citoplasma de los pseudópodos durante dicho proceso (Lee *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2010). El proceso de evasión contra las IgA e IgG se debe al desarrollo de estructuras de tapón que evitan el reconocimiento por parte de estas inmunoglobulinas, también evita la lisis por activación de la vía del complemento gracias a una molécula de tipo CD59 (Ferrante y Thong, 1979; Shibayama *et al.*, 2003).

### **c) Distribución de *Naegleria fowleri***

Son sensibles a condiciones extremas como la desecación y pH muy elevado. *N. fowleri* se encuentra en abundancia en aguas con temperaturas elevadas por arriba de los 37 °C y sobrevive bien a temperaturas de hasta 50 °C (Kemble *et al.*, 2012). Su aislamiento en individuos sanos en áreas endémicas es raro y tales individuos a menudo tienen anticuerpos contra el organismo (Bennett *et al.*, 2008). También se ha aislado de cuerpos de agua con temperaturas bajas como manantiales con temperaturas de 16 °C y en profundidades medias a superficiales. Además, se tiene registro de presencia de *Naegleria* en aguas de pozo y están ligadas a la muerte de dos infantes en Arizona, Estados Unidos de Norteamérica (Blair *et al.*, 2008). En el año 2012 se agregó a la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos Sanitarios y Calidad del Agua que Deben Cumplir las Albercas”, el género *Naegleria*. En piscinas la presencia de cloro libre residual en concentraciones de 2mg/L<sup>-1</sup> puede inhibir su presencia (Chertorivski-Woldenberg *et al.*, 2012). *Naegleria fowleri* puede crecer en el ambiente cuando la temperatura es superior a 30 °C, con un límite por encima de 45-46 °C. Esa es la razón por la cual esta ameba se encuentra con frecuencia en las aguas de enfriamiento de las industrias, como las centrales eléctricas (De Jonckheere, 2011).

Como medida de protección el Ministerio de Salud de Francia estableció que un cuerpo de agua que contenga más de 100 organismos de *N. fowleri* por litro, se considera peligroso y que las centrales termoeléctricas que usen agua para enfriar deben clorarla si se rebasa este límite (Cabanés *et al.*, 2001; De Jonckheere, 1976). La distribución natural de *N. fowleri* suele ser en aguas del trópico y subtropical, mientras que en países templados y fríos tiende a proliferar en verano, no se tienen reportes de aislamiento en agua marina lo que sugiere sensibilidad a la osmolaridad alta; presenta una distribución vertical en el agua asociado a la concentración de manganeso y hierro, además de que se ha correlacionado con la presencia de cianobacterias y eubacterias infiriendo así una función natural de control poblacional de bacterias (Martínez *et al.*, 2016). Se han aislado más fácilmente en ambientes que de alguna manera han sido alterados por la humanidad como aquellos donde se ha presentado un calentamiento anormal (Lares *et al.*, 2017).

## 1.5.2 Afecciones oculares por amibas de vida libre

### 1.5.2.1 Queratitis amibiana por *Acanthamoeba* spp.

La queratitis amibiana (QA) es una inflamación crónica de la córnea, en la cual suelen estar involucradas *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba griffini*, *Acanthamoeba pearcei*, *Acanthamoeba echinulata*, *Acanthamoeba divionensis*, *Acanthamoeba lugdunensis*, *Acanthamoeba mauritaniensis*, *Acanthamoeba polyphaga* (este es el agente causal que más ha sido aislado en casos clínicos), *Acanthamoeba quina*, *Acanthamoeba rhyodes*, *Acanthamoeba triangularis*, *Acanthamoeba royreba*, entre otras especies. Dentro del tejido invadido por los trofozoítos, estos comienzan a fagocitar las células de sus alrededores y gracias a la acción de enzimas que *Acanthamoeba* libera al medio tisular, se ejecuta un proceso necrosante del tejido ocular (Fig. 8) (Castrillón y Orozco, 2013).

#### a) Ruta de invasión

En la QA, *Acanthamoeba* afecta un solo ojo y uno de los parámetros que fomenta el desencadenamiento de la infección es el uso de soluciones salinas caseras contaminadas o con deficiente calidad microbiológica, empleadas en el lavado de lentes de contacto; esta afección incurre en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes (Bonilla y Ramírez, 2014; Oddó, 2006.) La infección progresa produciendo una ulceración de la córnea, que puede resultar en ceguera en casos muy severos. Es una enfermedad difícil de tratar y de diagnosticar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de las queratitis herpéticas, fúngica o micobacteriana, lo que ocasiona que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen muchos meses (Cabello-Vílchez, 2015). Trabajos experimentales han registrado que esta queratitis ocurre solamente en humanos, cerdos y hámsteres, pero otros animales son refractarios a la infección (De Jonckheere, 2002; Fernández, 2014; Oddó, 2006). Una vez que las amibas se han establecido en el estroma corneal, son difíciles de erradicar, habiendo recurrencia de la infección después del tratamiento. Esto debido a que las formas de resistencia (quistes), soportan el efecto de los medicamentos mejor que sus formas tróficas y cuando los niveles de los fármacos comienzan a disminuir en el medio, inicia una nueva recuperación de las colonias de amibas. Los pacientes pueden llegar a necesitar más de un tratamiento de trasplante corneal para reparar el daño (Fernández, 2014).

#### b) Síntomas clínicos de queratitis amibiana por *Acanthamoeba* spp.

Una característica principal es la inflamación de la córnea y la sensación de tener un cuerpo extraño alojado en el ojo (Fig. 8). Además, puede presentar otros síntomas tales como: Intenso dolor ocular, enrojecimiento ocular, fotofobia, visión borrosa, congestión conjuntiva, presencia de un anillo estromal en la zona del iris y la pupila (Fig. 8), rompimiento epitelial recurrente de córnea. En todo caso, si se sospecha que la infección se deba a una amiba o únicamente para descartar su presencia se procede a realizar un raspado corneal (Fig. 9) (Bonilla y Ramírez, 2014; De Jonckheere, 2002; Fernández, 2014; Oddó, 2006).

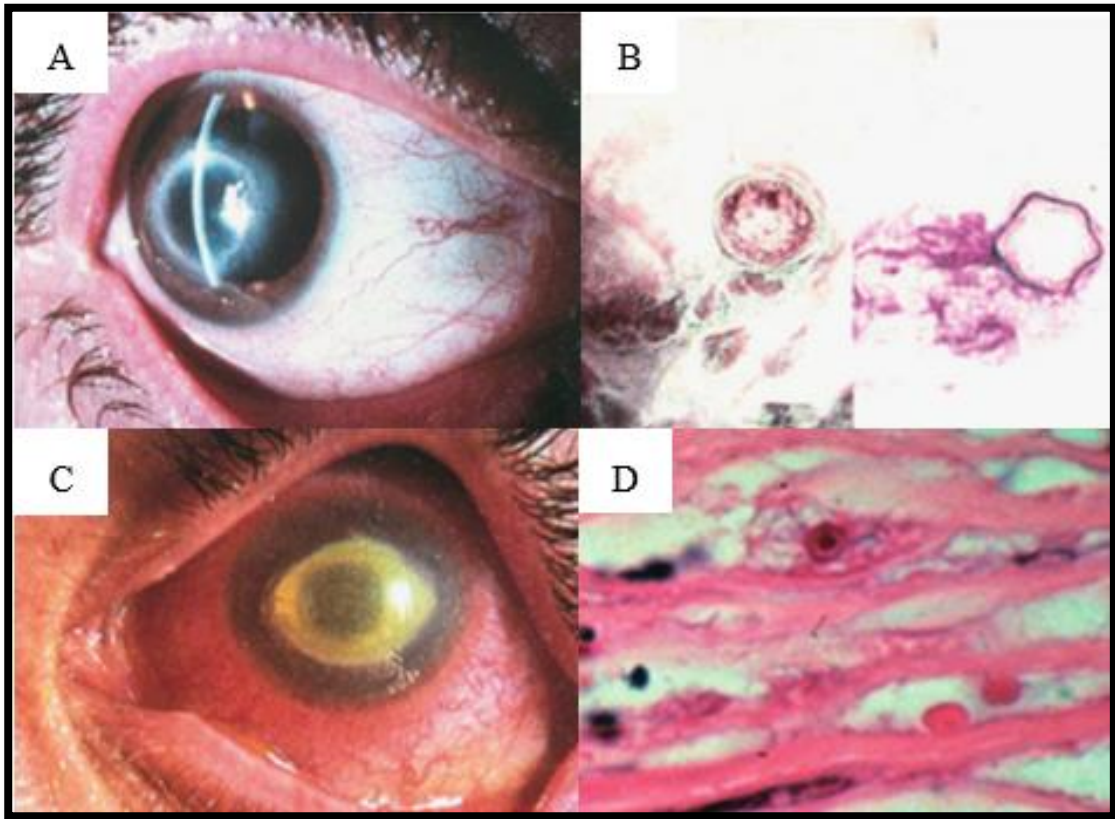


Figura 8. Queratitis por *Acanthamoeba* spp., (A) Examen de lámpara de hendidura al ojo de un paciente que muestra un anillo estromal en iris y pupila una característica típica de la enfermedad. (B) Un raspado corneal teñido con tricromo muestra la presencia de un trofozoítos de *Acanthamoeba* y un quiste, 1000X. (C) Vista general de un ojo infectado por *Acanthamoeba* spp. (D) Sección teñida con hematoxilina-eosina de tejido corneal desbridado que enseña un trofozoíto, 1000X (Visvesvara *et al.*, 2007).

### c) Diagnóstico clínico de queratitis amibiana por *Acanthamoeba* spp.

Además de una queratitis vírica o de naturaleza fúngica, también se le ha atribuido la infección a *Herpes simplex* o alguna bacteria, pero es prontamente descartado al salir sus correspondientes pruebas de detección negativas. Cuando está en estadios tempranos de infección, se les detecta un patrón epitelial dendriforme, el cual posteriormente acaba desarrollándose en un anillo alrededor del ojo constituido por la aglomeración de leucocitos polimorfonucleares en la zona afectada (De Jonckheere, 2002; Fernández, 2014; Oddó, 2006). La cual al efectuarse los análisis histopatológicos arrojan una queratitis necrotizante aguda o subaguda con inflamación granulomatosa del tejido corneal y congestión conjuntival, en la zona es posible la presencia tanto de formas tróficas como de resistencia (De Jonckheere, 2002).

Un diagnóstico temprano es fundamental y se tiene que tomar en cuenta otros antecedentes y síntomas para poder proceder al tratamiento. La tinción tricrómica de Giemsa, tinción de Wright, tinción blanca de calcoflúor o azul de Evans, la utilización de anticuerpos fluorescentes en raspados corneales, el uso de PCR y la microscopía confocal muestra de forma rápida la presencia de estos organismos (Pérez-Irízabal *et al.*, 2005) (Fig. 9).

Debido a que las infecciones por *Acanthamoeba* son de naturaleza crónica, hay tiempo para que se desarrolle una respuesta de anticuerpos; sin embargo, no se ha demostrado que sean protectores contra las amibas (Bonilla y Ramírez, 2014). En estudios *in vivo*, los parásitos atacan sólo el epitelio corneal previamente dañado, nunca el epitelio intacto, y la presencia de células de Langerhans en la córnea previene el desarrollo de las lesiones (De Jonckheere, 2002; Fernández, 2014; Oddó, 2006).

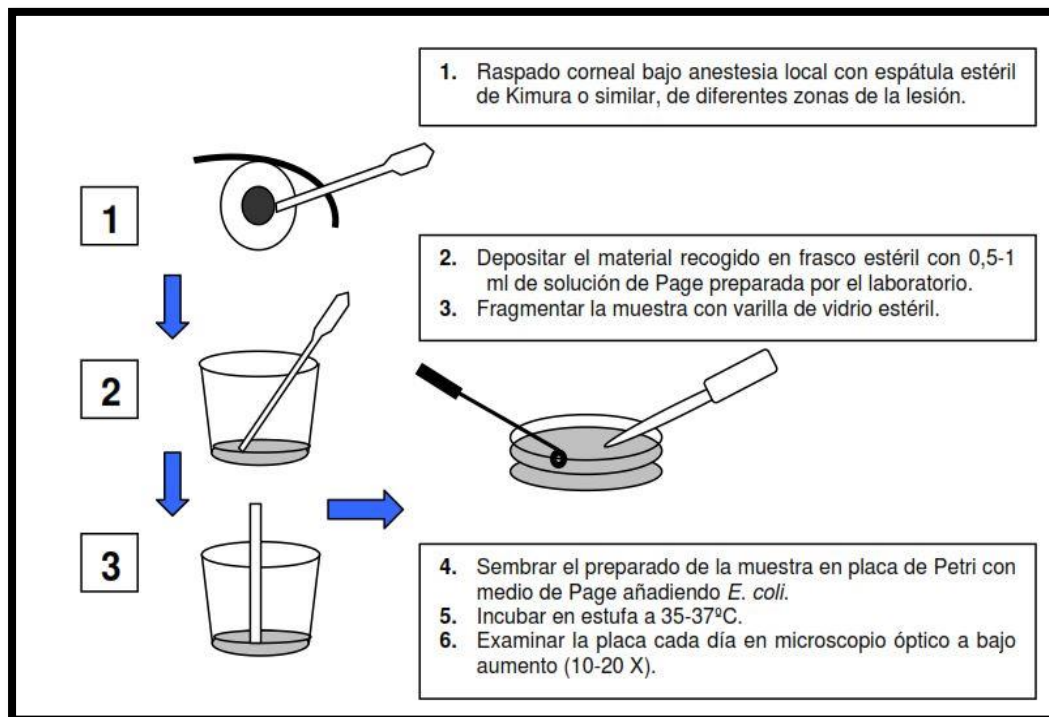


Figura 9. Procedimiento de raspado corneal para cultivo de *Acanthamoeba* spp. El medio puede ser cambiado por medio NNE con bacteria *Enterobacter aerogenes* desactivada (Pérez-Irízabal *et al.*, 2005).

### 1.5.3 Afecciones dermatológicas causadas por amibas de vida libre

#### 1.5.3.1 Acantamebiasis cutánea

A la acantamebiasis cutánea (AC) por *Acanthamoeba* spp. se le nombra también como dermatitis acantamebiana (DA). Puede ser una lesión primaria de la piel (Fig. 10) o manifestación secundaria de una infección diseminada (Oddó, 2006). Afecta básicamente a personas inmunocomprometidas (aunque hay casos de pacientes inmunocompetentes), por ejemplo, los pacientes con cuadros de desnutrición, cáncer, personas bajo medicación inmunosupresora especialmente personas con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Gianinazzi *et al.*, 2009; Oddó, 2006).

#### a) Ruta de invasión

El acceso de la amiba se da por pequeñas lesiones en la superficie de la piel y suelen estar bien localizadas en un solo punto, pero normalmente se diseminan por vía hematógica a otros lados del cuerpo llegando así al SNC.



Figura 10. Paciente con una infección cutánea por *Acanthamoeba* sp., (Astorga, 2016).

## **b) Síntomas clínicos de la acantamebiasis cutánea por *Acanthamoeba* spp.**

La AC causa lesiones que se traducen en procesos inflamatorios, los cuales afectan la epidermis, dermis e hipodermis, habitualmente granulomatosos y a veces con granulomas maduros perfectamente delineados. La mortalidad reportada de la AC sin compromiso del SNC es de aproximadamente 73%; cuando además está afectado el encéfalo, la mortalidad llega a 100% (Gianinazzi *et al.*, 2009; Oddó, 2006).

### **1.5.3.2 Lesiones cutáneas por *Balamuthia mandrillaris***

Cabello-Vílchez en el año 2015 reportó en sus investigaciones con pacientes, la presencia de infecciones dérmicas cuyo agente causal fue identificado como *Balamuthia mandrillaris*. Se reportó que las personas estuvieron expuestas al suelo de forma directa antes de presentar las lesiones dérmicas, todos ellos presentaron unas placas gruesas que en algunas ocasiones presentaron lesiones satelitales entorno a la principal, siendo su diámetro muy variado, la tonalidad de la lesión va desde un rojo ligero hasta una tonalidad violácea. A veces al momento de ser palpada pudieron sentirse lisas o rugosas. En algunos casos desarrollaron sinusitis, úlceras necrotizantes, eritema y cuando las lesiones no se trataron abarcaron el rostro del paciente (Seas y Bravo, 2006) (Fig. 11).



Figura 11. Lesión nasal típica de infección por *Balamuthia mandrillaris*. (Seas y Bravo, 2006).

## **1.6 Epidemiología de amibas de vida libre**

El número de infecciones por amibas de vida libre puede considerarse de tasa baja de incidencia, pero esto es únicamente debido a los reportes que se han logrado realizar y que tienen totalmente identificada a las AVL como fuente de la enfermedad. La meningoencefalitis amibiana primaria afecta generalmente a niños y jóvenes que gozan de un estado de salud sano, pero previamente a la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, han estado expuestos a fuentes de agua naturales en épocas cálidas del año o en piscinas con calefacción, pero también se tiene reporte de infección por exposición a agua contaminada usada en el lavado de cara y por inhalación de polvo (Astorga, 2016; Bonilla y Ramírez, 2014; Kemble *et al.*, 2012; Vélez *et al.*, 2013; Visvesvara *et al.*, 2007). La mayor parte de los casos de meningoencefalitis amibiana primaria se han comunicado en distintos lugares de Estados Unidos como Virginia, Florida, Georgia o California, y en países como Bélgica, República Checa, Australia, Nueva Zelanda, India, Nigeria o Tailandia (Pereira y Pérez, 2003).

### **1.6.1 Amibas de Vida Libre en México**

En México se tiene un registro de 33 casos de MEAP, de los cuales Mexicali posee 23, los demás reportes han provenido de Sonora, Monterrey, Michoacán y Tamaulipas. (Bonilla y Ramírez, 2014; Shibayama *et al.*, 2007). Los casos registrados de EAG causados por *Balamuthia mandrillaris* son en total 12 hasta el año 2014, siendo la CDMX y el estado de Jalisco poseedores de cuatro casos respectivamente, el Estado de México, Puebla y Guanajuato reportaron solamente un caso cada uno (Bonilla y Ramírez, 2014; Rositas *et al.*, 2006). Se ha contabilizado 16 casos de encefalitis amibiana granulomatosa siendo *Balamuthia mandrillaris* el agente causal y cuatro casos de queratitis amibiana por *Acanthamoeba* spp (Bonilla y Ramírez, 2014; Cabello-Vilchez, 2014; Lares-Villa, 2001; Lares-Villa *et al.*, 1993; Riestra *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 1994).



### III ANTECEDENTES

En 1978, Rivera y colaboradores dieron curso a un estudio morfológico de dos especies de AVL, *Naegleria gruberi* y *Acanthamoeba astronyxis*, siendo realizada una descripción detallada de los organelos en cada una de las fases del ciclo vital de estas amibas. Dichos organismos fueron obtenidos de muestras procedentes de piscinas de seis centros deportivos de varios puntos de la Ciudad de México. Ponen énfasis sobre su presencia en dichos centros debidos a su importancia médica a causa de su potencial patógeno que caracteriza a varias especies de los grupos de AVL.

En 1983 Rivera y colaboradores estudiaron la presencia de AVLPP en agua de albercas localizadas en la ciudad de México, encontrando 12 especies entre ellas *N. fowleri* y *A. castellanii* estas especies fueron positivas a las pruebas de patogenicidad realizadas con animales.

En 1997, Gallegos realizó un estudio sobre AVL potencialmente patógenas en la región de la Huasteca Potosina en el estado de San Luis Potosí, encontrando los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*, además de relacionar su presencia con diferentes parámetros fisicoquímicos del agua, siendo la temperatura y materia orgánica como los de mayor influencia sobre el crecimiento y su distribución de estos protozoos.

En el 2001, Villa, Montenegro y Escozoba realizaron un estudio sobre AVL en cuerpos de agua de uso recreativo ante la necesidad de hacer una mayor divulgación sobre la importancia de las enfermedades causadas por las AVL y la falta de información en Hermosillo, Sonora en el año de 1996; asociaron los bajos niveles de cloración y la presencia de coliformes con el reporte de AVL potencialmente patógenas en estos cuerpos de agua.

En 2002, Marciano y Cabral realizaron un estudio detallado sobre el género *Acanthamoeba* como un agente patógeno en humanos causante de meningoencefalitis y queratitis. Concluyen que las infecciones de estas amibas en cuadros de queratitis y meningoencefalitis se manifiestan mayormente en casos donde el individuo tiene su sistema inmunológico comprometido como aquellos que poseen Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), además las AVLPP pueden ser reservorios de agentes bacterianos.

En 2004, Schuster y Visvesvara realizaron un informe sobre los géneros de AVL registrados hasta el día de hoy, detallando ciclos vitales, epidemiología y ecología. Concluyeron que no son una razón de alarma sanitaria debido a los casos registrados de infecciones, pero debido a ello no hay un tratamiento eficaz cuando se presenta la infección terminando en casos donde el paciente muere.

En 2006, Ávila y colaboradores realizaron un estudio de AVL potencialmente patógenas en aguas recreativas de un parque en Venezuela, exponiendo la capacidad de estos organismos a tolerar amplios márgenes de temperatura pasando de menos de 4 °C hasta exceder los 45 °C, dándole un gran nivel de exposición a personas comprometidas inmunológicamente. Obtuvieron que a temperaturas que iban de 24 a 29 °C había presencia de amibas que presentaban las características que correspondían a las de *Naegleria fowleri* y además en

muestras de agua más fría obtenidas de una cascada con temperaturas de 19 a 23 °C también había presencia de amibas con mismas características de *N. fowleri*. Concluyeron que sería pertinente un muestreo de forma periódica para vigilar la calidad del agua de esta zona recreacional, así como una campaña de concientización en los usuarios del lugar.

En 2009, Walochnik y Wylezich investigaron el género *Sappinia*, el cual contiene únicamente dos especies con algunas variantes en cada una, se tiene registro de ser una AVL capaz de infectar a una persona inmunocompetente cuya recuperación es satisfactoria.

En el 2010, Castillo y colaboradores, realizaron un estudio sobre amibas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de El Salvador, encontrando AVL en tres de 30 reservorios de agua estudiados, siendo así una dispersión de AVL no generalizada en el país y que la cloración de las aguas de balnearios no es una garantía absoluta para eliminar su presencia.

En 2012, Ortega y colaboradores realizaron una investigación con el objetivo de determinar la presencia de AVL patógenas del género *Acanthamoeba* en cuerpos de aguas naturales de la Huasteca Potosina. Cumplen con el objetivo de su investigación y concluyen que existe un riesgo potencial a la salud pública. Finalizan que el uso de técnicas de PCR resulta más eficaz y rápido que los métodos tradicionales para la identificación de AVL patógenas ambientales.

En 2012, Ramírez y colaboradores, realizaron un estudio con el objetivo de determinar la presencia de AVL en el agua de los pozos del municipio de Tizayuca, Hidalgo. Los estudios arrojaron la presencia de AVL del género *Vermamoeba* (*Hartmannella*) y *Vahlkampfia*, las cuales se les ha asociado a casos de meningoencefalitis y queratitis. Además, en una poza se registró *Acanthamoeba* la cual cuenta con potencial patógeno, pero en baja frecuencia. Concluyeron que no existe riesgo de infección por consumo de esta agua, aunque recomiendan desinfectarla previamente.

En 2014, Carbal y Foen en su tesis abordan casos de infección por AVL en México. Exponen la importancia de saber sus nichos naturales para poder recomendar un tratamiento médico oportuno en caso de infección, comentan la usual confusión que se da por la similitud sintomatológica entre padecimientos causados por algunas bacterias lo que causa complicaciones en pacientes. Entre sus muestras están cuerpos de agua empleados para fines recreativos.

En 2014, Gallegos y colaboradores realizaron una revisión de la información taxonómica y ecológica de los protistas amébidos de México en más de 142 publicaciones que abarcaron los años comprendidos de 1841 al 2012. Obteniendo un total de 315 especies de diferentes amibas y encontraron que los grupos dominantes fueron: Amoebozoa, Rhizaria y Excavata. La mayoría de los trabajos se han realizado en los estados del centro de la República Mexicana, siendo el Distrito Federal (ahora Ciudad de México) donde se han hecho más registros de estos organismos. Nueve estados carecen de registros sobre AVL, incluyendo los estados de Chiapas, Tabasco y Yucatán; entidades que gozan de una elevada diversidad biológica.

En 2015, Andrade y colaboradores realizaron una investigación para lograr obtener AVL de ríos de la Cuenca de México y relacionar su presencia con alguno de los factores fisicoquímicos y su potencial patogenicidad. Identificaron mediante PCR a tres especies potencialmente patógenas dentro del género *Acanthamoeba* y una para el género *Naegleria*. Los parámetros fisicoquímicos registrados estaban dentro de los valores reportados como ideales para la presencia de AVL por lo que no fueron significativos.

En 2016, Minetto y García en su tesis de grado estudiaron las amibas de vida libre en pozas termales de Churin, Perú, confirmaron la presencia de *Naegleria* spp. en las pozas termales, en especial aquellas con temperaturas superiores a 27 °C dónde obtuvieron mayores reportes de presencia.

En 2018, Gallegos y colaboradores realizaron un trabajo con amibas de vida libre en las playas de Tuxpan, Veracruz. En este trabajo mencionan la importancia de la temperatura elevada como un factor determinante para la proliferación de AVL siendo de origen natural o antropogénicas dichas fuentes de calor. A nivel ecológico tienen un papel regulador dentro de las poblaciones bacterianas. Se tomaron muestras de agua, alga, sedimento y biopelículas, siendo estas últimas donde se encontró un mayor número de AVL del género *Acanthamoeba*, además las variables físicas y químicas tales como oxígeno disuelto y salinidad influyeron en la presencia de AVL.

En 2018, Espinoza y colaboradores reportaron con base a una búsqueda en 14 canales de riego del Valle del Yaqui, Sonora y en una fuente termal, en marzo del 2015 y julio del 2016. La presencia en todas las muestras de dos especies de amibas del género *Naegleria*, *N. fowleri* y *Naegleria lovaniensis*. Siendo *N. lovaniensis* la más abundante en la región noroeste de México.

En 2019, Gallegos y colaboradores realizan el primer registro de AVL en el balneario natural “Hierve el Agua” en San Lorenzo Albarradas, Oaxaca. Registrando AVL del género *Acanthamoeba* lo cual mencionan es motivo para generar un siguiente estudio más detallado para saber si cuentan con potencial patógeno. Registraron parámetros físicos y químicos, pero no presentaron grandes diferencias entre los sitios de muestreo y dichos valores se encuentran dentro de los niveles ideales para la proliferación de AVL.

## IV JUSTIFICACIÓN

En México las escasas investigaciones sobre las amibas de vida libre, dificulta conocer la adecuada distribución de estas. Si se considera que las AVL se encuentran ampliamente distribuidas en cuerpos de agua de casi cualquier tipo ya que son uno de los grupos de protozoos con mayor distribución en la naturaleza, debido a la gran resistencia conferida por sus quistes, es posible considerar que estas amibas puedan ser aisladas de aguas recreativas de contacto directo y de cuerpos de agua destinados a la pesca o para el consumo humano.

El estado de Veracruz cuenta con un registro de AVL, únicamente en la zona costera de Tuxpan y en el Arrecife Ingeniero, pero no en cuerpos de agua dulce y en los casos de los municipios de Orizaba e Ixhuatlancillo se consideró que son centros urbanos y suburbanos respectivamente que poseen una alta disponibilidad de recursos hídricos, además de contar con una gran variedad de sitios con altos niveles de humedad y temperaturas cálidas, factores que promueven la proliferación de estos protozoos. Siendo la primera vez que se realiza un registro de AVL en dos cuerpos de agua dulce en el estado.

La presencia de AVL potencialmente patógenas representa un riesgo latente para la salud de usuarios que puedan estar en contacto con estos organismos oportunistas de forma accidental, los cuales pueden causar severas infecciones en las personas que incluso las puedan llevar a la muerte y que nunca se llegue a un diagnóstico determinado en la causa de defunción. Siendo así la detección de la presencia de AVL en estos sitios que no cuentan con un registro previo, como un valioso aporte para la protección de las personas que tengan actividades en dichas áreas, mediante la emisión de recomendaciones.

## V OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo general

- ❖ Registrar la presencia de amibas de vida libre potencialmente patógenas en el balneario “Ojo de Agua” y en la laguna de “La Marmolera”, en Orizaba e Ixhuatlancillo en el estado de Veracruz.

#### 1.1.1 Objetivos particulares

- ❖ Aislar y cultivar a las AVL de las muestras de biotopos obtenidos (agua y biopelículas) de ambos cuerpos de agua durante la época de lluvias y secas.
- ❖ Identificar morfológicamente mediante claves taxonómicas especializadas las especies de AVL presentes en los dos sitios de muestreo.
- ❖ Ubicar taxonómicamente las especies de AVL presentes en las dos temporadas.
- ❖ Comparar la riqueza específica de AVL obtenida por sitio de muestreo y biotopo.
- ❖ Ubicar biotopo y sitio de muestreo donde se haya encontrado mayor riqueza de amibas de vida libre potencialmente patógenas.
- ❖ Relacionar los factores físicos y químicos del agua con la presencia o ausencia de las AVL.
- ❖ Emitir recomendaciones para los usuarios de estos cuerpos de agua.

## VI ÁREA DE ESTUDIO

Situadas en la zona central de la región de las grandes montañas del estado de Veracruz se encuentran dos localidades (Fig. 12). La primera localidad pertenece al municipio de Ixhuatlancillo, se le dio el nombre de “La Marmolera” debido a que por las periferias hay una cantera donde trabajan el mármol, está ubicada en la zona norte de la región con las siguientes coordenadas:  $18^{\circ} 52' 22.07''$  N  $97^{\circ} 07' 48.05''$  O (Secretaria de Finanzas y Planeación del Estado de Veracruz, 2017a) (Fig.13). La segunda localidad “Ojo de Agua” se ubica en la región sur de Orizaba, un cuerpo de agua de origen freático, es una localidad muy conocida en todo el Valle de Orizaba (Fig. 16). La laguna fue adaptada para fines recreativos siendo sus coordenadas:  $18^{\circ} 51' 48.22''$  N  $97^{\circ} 04' 35.18''$  O. Parte de sus aguas están entubadas para ser distribuidas a la ciudad de Orizaba y alrededores (Fig. 17), también los lugareños les atribuyen propiedades curativas, además de que poseen temperaturas frías durante todo el año. Ambas regiones se caracterizan por tener bien marcadas dos épocas, una seca y de lluvias (Secretaria de Finanzas y Planeación del estado de Veracruz., 2017b).

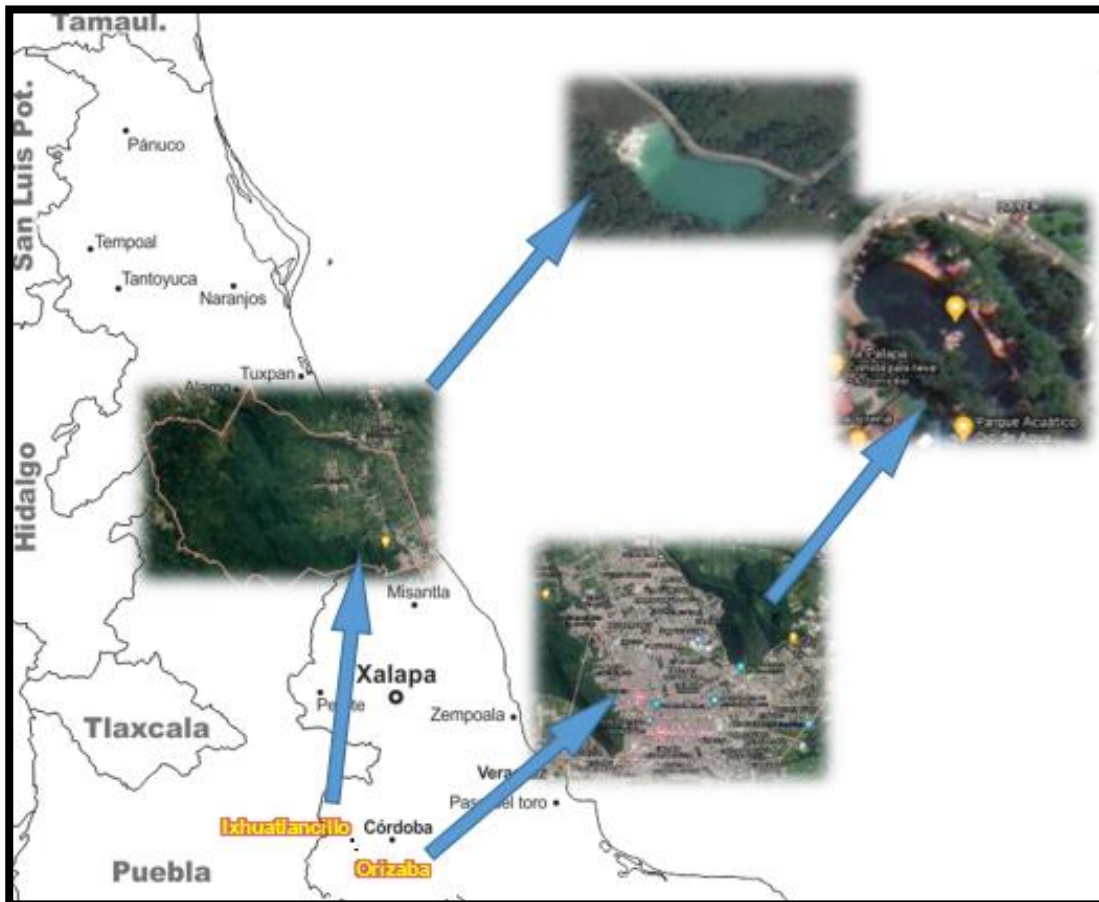


Figura 12. Ubicación de las zonas de muestreo dentro de sus respectivos municipios (en amarillo), así como su posición dentro del estado de Veracruz-Ignacio de la Llave (Google Earth, 2015).

## 1.1 Laguna “La Marmolera”

Ixhuatlancillo es un municipio con una altitud que va de los 1,300 a 3,100 msnm, el clima es templado húmedo con abundantes lluvias en verano en un 65 % del municipio y en el 33 % el clima es semicálido con lluvias en todo el año y finalmente un 2 % del territorio es subhúmedo con lluvias en verano, el rango de temperatura oscila de los 12 a los 20 °C como promedio y tienen una precipitación anual que va de 1,100 a 1,600 mm. Del total de su territorio, 20.7 km<sup>2</sup> están formados por densos bosques, 14.1 km<sup>2</sup> son pastizales, 9.6 km<sup>2</sup> están destinados a la agricultura y las zonas urbanas apenas abarcan 1.4 km<sup>2</sup> (SEFIPLAN, 2017a). En este municipio existe una laguna denominada como “La Marmolera” la cual se encuentra a los pies de un cerro conocido como “Cerro del Borrego” en un predio de libre acceso (Figs. 13, 14 y 15) cercano a los límites con el municipio de Orizaba. Está rodeada de algunos asentamientos rurales, debido a ello la existencia de esta laguna es poco conocida. La única actividad realizada aquí es la pesca de mojarra; la zona litoral tiene una coloración blanca debido a depósitos de hidróxido de calcio (cal) el cual dotó al terreno de características similares a arenas movedizas, siendo peligroso adentrarse en su orilla especialmente en épocas de lluvias (Fig. 15).

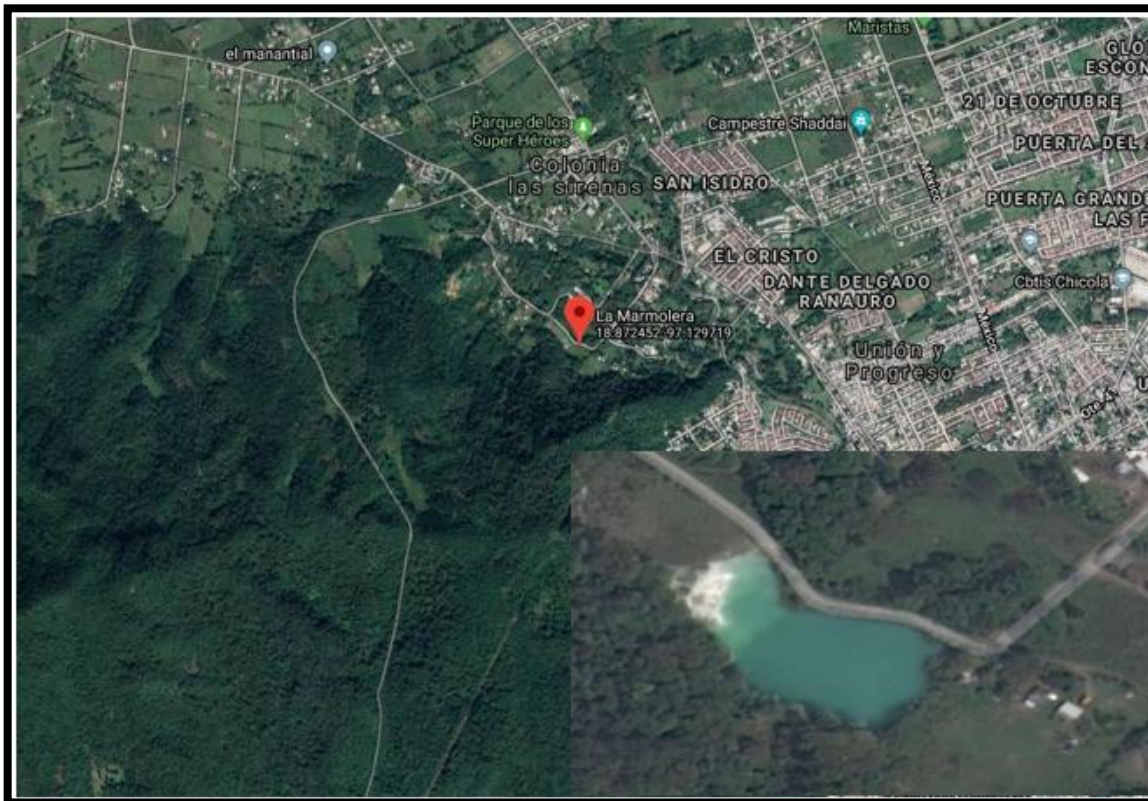


Figura 13. Localización de la primera zona de muestreo dentro del municipio de Ixhuatlancillo (Google Earth, 2015).



Figura 14. Vista general de “La Marmolera” durante la época de secas. Foto tomada por Chávez, 2015



Figura 15. Zona litoral de “La Marmolera”, la zona blanca son depósitos de cal. Foto tomada por Chávez, 2015.



## 1.2 Laguna “Ojo de Agua”

El municipio de Orizaba tiene una altitud que va entre 1,000 y 2,100 msnm, posee un clima semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano en un 91 % de su territorio y templado húmedo con abundantes lluvias en verano en el 9 % restante de tu extensión; con un rango térmico que va de 16 a 20 °C y una precipitación media anual que oscila entre los 1,500 a 2,000 mm<sup>3</sup>. Los tipos de suelo predominantes en ambas regiones son luvisoles y acrisoles (SEFIPLAN, 2017b). Hacia el sur del municipio se localiza “Ojo de Agua” (Fig. 16) el cual es un parque acuático de origen natural de libre acceso y que se encuentra a los pies del cerro “La Escamela” (Fig. 18), además de darle uso recreativo parte de sus aguas son entubadas para distribución (Fig. 17). El sitio forma parte de un gran sistema de agua denominado como Acuífero Orizaba-Córdoba, el cual se aprovecha mayoritariamente en forma de pozos, cuyos principales usos son industriales, público-urbano y agrícola (CONABIO, 2020).



Figura 16. Localización del segundo sitio de muestreo, el parque recreativo de origen natural “Ojo de Agua”, en Orizaba Veracruz (Google Earth, 2015).



Figura 17. Entubamiento de parte de las aguas de "Ojo de Agua" para la distribución en la periferia del municipio. Foto tomada por Chávez, 2015.



Figura 18. Vista general de "Ojo de Agua", al fondo está el cerro conocido como "La Escamela". Foto tomada por Chávez, 2015.

## VII MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1 Trabajo de campo

#### 1.1.1 Recolecta y transporte de muestras

Se realizaron dos muestreos en los cuerpos de agua anteriormente mencionados, durante los meses de abril y octubre correspondiente a las épocas de secas y de lluvia, respectivamente durante el año 2015 (Fig. 19 y 20). El material recolectado se detalla a continuación: Se tomaron muestras de agua de la zona litoral en diferentes puntos accesibles de cada lago. Las muestras fueron almacenadas en botellas estériles de polipropileno de boca ancha (NALGENE®) de 1000 ml cada una y conservadas a temperatura ambiente. En el caso de agua con biopelícula flotante se depositaron en tubos de 50 ml, en el caso de “La Marmolera” se colectaron muestras de agua con biopelícula de la zona más accesible. En la laguna “Ojo de Agua” además de la biopelícula se tomaron muestras de agua en la zona del embarcadero.



Figura 19. Vista general de los sitios muestreados en “La Marmolera”: MA: Muestras de agua, MBP: Muestras de biopelículas. (Google Earth, 2015).



Figura 20. Vista general de los sitios muestreados en “Ojo de Agua”: OA: Muestras de agua, OABP: Muestras de biopelículas. (Google Earth, 2015).

### 1.1.2 Registro de factores ambientales *in situ*

En “Ojo de Agua” y “La Marmolera” se registraron los siguientes parámetros físicos y químicos del agua: pH, conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y oxígeno disuelto ( $\text{mg}/\text{L}$ ), esto con ayuda de un potenciómetro digital HANNA modelo HI98130 (el cual se introdujo en el agua a una profundidad de 15 cm aproximadamente y con tiempo necesario para lograr una lectura estable, para la temperatura atmosférica el electrodo fue expuesto al aire libre hasta que se obtuvo una lectura fija). Para las lecturas de oxígeno disuelto se recurrió de un oxímetro digital marca YSI 85, que se midió a la misma profundidad que para los otros parámetros.

### 1.2 Trabajo en el laboratorio

Posteriormente el transporte de las muestras tuvo un lapso no superior a las 24 horas previas a su obtención de la zona al Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes del Departamento ubicado en la UIICSE, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Tlalnepantla, Estado de México.

### **1.2.1 Cultivo y aislamiento de amibas de vida libre**

De cada muestra de agua y agua con biopelículas, se tomaron alícuotas de 50 ml y se concentraron por centrifugación a 2,500 rpm durante 10 minutos (centrífuga Boeco-U32) en tubos de 50 ml. Se decantó el sobrenadante hasta dejar un volumen final aproximado de 0.5 ml y el sedimento fue resuspendido y se vaciaron tres gotas en una placa de Petri con agar no nutritivo (NNE) con *Enterobacter aerogenes* previamente inactivada con calor por 15 minutos a 72 °C (De Jonckheere, 1979), (Anexo I, Cuadro 14), esto con la finalidad de que las amibas pudieran alimentarse de la bacteria. Las placas Petri fueron puestas dentro de una incubadora a 37 °C durante 24 horas. La observación de las placas de medio no nutritivo con *E. aerogenes* (NNE) se realizó con un microscopio invertido en contraste de fases a 10, 20 y 40X (Nikon Eclipse TS100) para verificar el crecimiento amibiano, revisándolas al siguiente día y su posterior clasificación por morfotipo. En las placas de Petri donde se registraron amibas, se marcó la zona de mayor abundancia y para realizar un posterior corte de agar de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, dicho fragmento se traspasó a otra placa (NNE) nueva y se cultivó a temperatura ambiente. Las cajas Petri con agar NNE se colocaron en posición invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación.

### **1.2.2 Identificación morfológica y registro fotográfico**

El primer paso para la observación microscópica fue hacer un barrido con solución salina y colocar la muestra en un portaobjetos para ser observada en el microscopio invertido en contraste de fases a 10, 20 y 40X (Nikon Eclipse TS100). Con ayuda de claves taxonómicas y el atlas de amibas de vida libre elaborados por Page (1988), Pussard y Pons (1977) y el uso de la guía virtual de Siemensma (2016) se realizó la identificación taxonómica. El registro fotográfico se llevó a cabo con una cámara fotográfica Nikon Coolpix 990, se auxilió de una tablet Samsung Galaxy Note 10.1 2014Ed y un smartphone Huawei G630. La identificación de los aislados amibianos se realizó tomando en cuenta los criterios morfológicos de los quistes y trofozoítos.

### **1.2.3 Medición de quistes y trofozoítos**

Se hicieron preparaciones en fresco de las amibas aisladas en laminillas y fueron observadas en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 40X (Nikon Eclipse TS100). De cada aislado se registraron las medidas de 50 trofozoítos (largo y ancho) y 50 quistes (diámetro largo y ancho en algunos casos).

### **1.2.4 Análisis estadístico**

Para determinar la similitud entre especies encontradas en ambos sitios de muestreo. Se realizó un análisis de agrupamiento empleando el índice de Jaccard, utilizando el programa de acceso libre Past® v 3.23 (2015) (Chao *et al.*, 2004).

## VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de las especies amibianas obtenidas en los muestreos se basó en criterios morfológicos establecidos en las claves taxonómicas de Page (1988), Pussard y Pons (1997) y Siemensma (2017). Las muestras fueron preparadas para ser estudiadas en fresco bajo microscopio óptico por contraste de fases. Cabe mencionar que para la identificación de las especies del género *Acanthamoeba*, los estudios de los quistes son de vital importancia debido a la semejanza de los trofozoítos que obstaculiza la correcta identificación. En el caso del género *Naegleria* los criterios de identificación son similares a los mencionados en el género *Acanthamoeba*. A continuación, se enlista el catálogo de AVL patógenas y no patógenas encontradas en el presente estudio. Para el caso de la taxonomía y morfología de las AVL, consultar anexo II.

### 1.1 Registro fotográfico de AVL potencialmente patógenas

#### 1.1.1 *Acanthamoeba astronyxis* (Ray y Hayes, 1954)

Amiba perteneciente al grupo II dentro de la categoría de clasificación morfológica, el ectoquiste y endoquiste son fácilmente diferenciados, el endoquiste posee una forma más o menos estrellada y el ectoquiste tiene apariencia rugosa, el primero se une al segundo a nivel de las aristas de los brazos del endoquiste (Visvesvara, 1991). La especie no tiene reportes de casos clínicos registrados hasta la fecha.

---

#### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

- Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004
- Longamoebia Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011
- Centramoebida Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

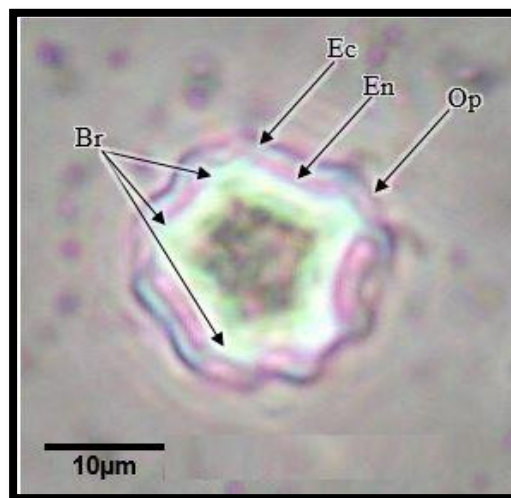


Figura 21. *Acanthamoeba astronyxis*. Micrografía de quiste, se aprecia el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), brazos (Br) y Opérculo (Op). Tomada en microscopio por contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.2 *Acanthamoeba castellanii* (Douglas, 1930)

Amiba perteneciente al grupo II de la clasificación morfológica, con ectoquiste redondo a ovoide liso, endoquiste es arrugado, su núcleo es visible (Visvesvara, 1991). Está asociada a casos de encefalitis y queratitis.

---

Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

● Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● Longamoebia Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011

●●● Centramoebida Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

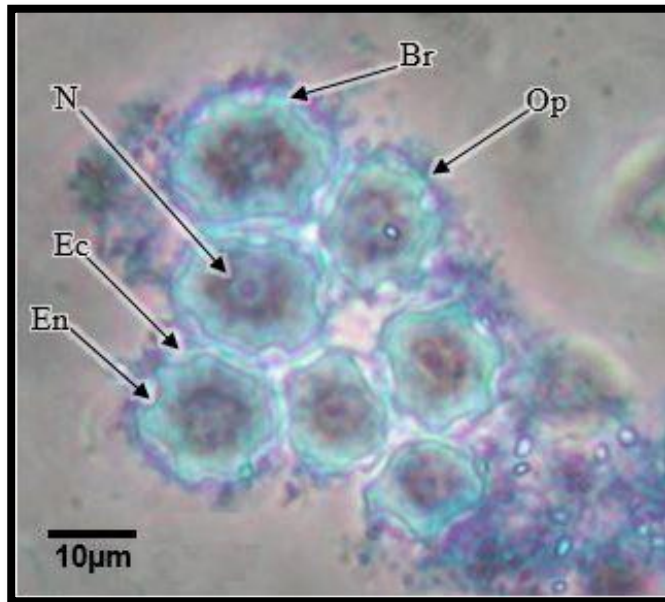


Figura 22. *Acanthamoeba castellanii*. Micrografía de quiste, se aprecia el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N), brazos (Br) y Opérculo (Op). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X) y con tinción de azul de metileno el cual permite resaltar las paredes de celulosa del quiste. Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.3 *Acanthamoeba culbertsoni* (Singh y Das, 1970)

Amiba perteneciente al grupo III de la clasificación morfológica. Ectoquiste delgado pudiendo ser ondulado o no. Endoquiste por lo general es redondo, pero puede presentar de tres a cinco curvas suaves en su periferia (Visvesvara, 1991). Está asociada a casos de queratitis y encefalitis.

---

#### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

● Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● Longamoebia Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011

●●● Centramoebida Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

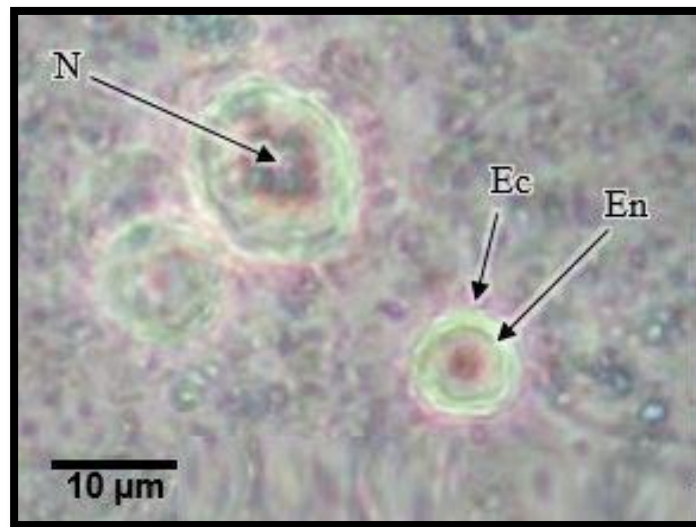


Figura 23. *Acanthamoeba culbertsoni*. Micrografía de quiste, se aprecia el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.



#### 1.1.4 *Acanthamoeba griffini* (Sawyer, 1971)

Amiba del grupo II con base en criterios morfológicos de quiste. El ectoquiste presenta una formación de aspecto rugoso y el endoquiste presenta formas poligonales, triangulares, ovaladas e incluso redondeadas (Castrillón y Orozco, 2013). La especie tiene reportes de casos queratitis.

---

##### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

- Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004
  - Longamoebia Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011
    - Centramoebida Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

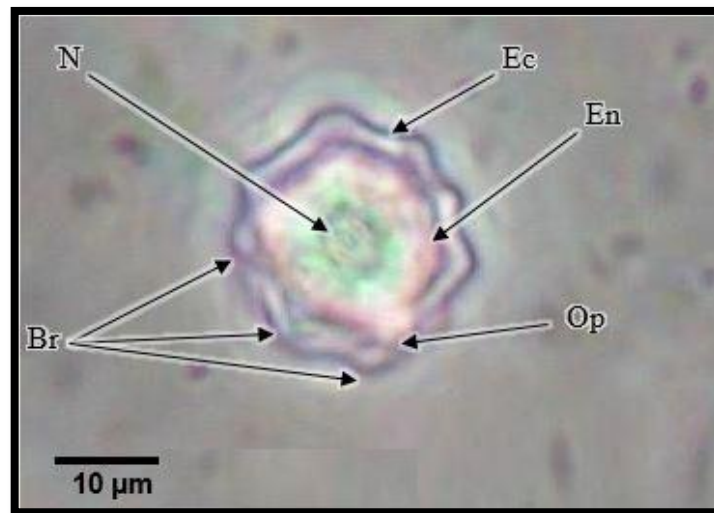


Figura 24. *Acanthamoeba griffini*. Micrografía de quiste, se aprecia el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y brazos (Br) y Opérculo (Op). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.5 *Acanthamoeba polyphaga* (Puschkarew, 1913)

Amiba perteneciente al grupo II según clasificación morfológica. Ectoquiste rugoso y endoquiste presenta formas cuadrangulares (Castrillón y Orozco, 2013). La especie está asociada a reportes de queratitis.

---

Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

● Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● Longamoebia Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011

●●● Centramoebida Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

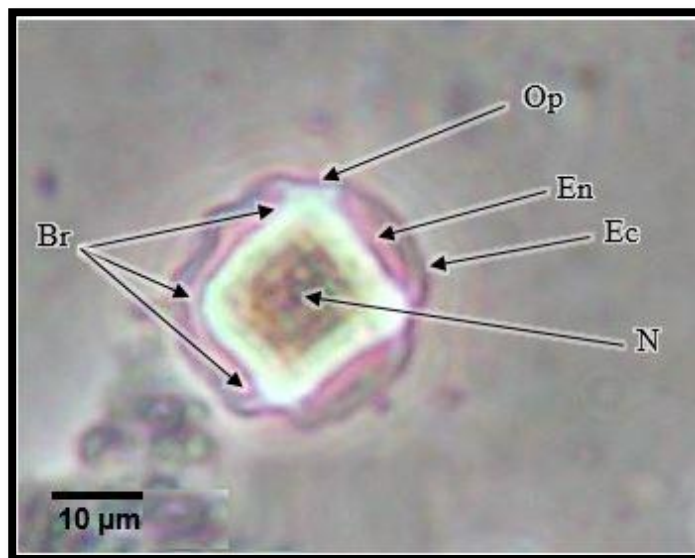


Figura 25. *Acanthamoeba polyphaga*. Micrografía de quiste, se aprecia el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y brazos (Br) y Opérculo (Op). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.6 *Naegleria gruberi* (Schardinger, 1899; Wilson, 1916)

Presenta un estadio flagelar, núcleo bien definido y fácil de encontrar tanto en quiste como en trofozoíto. En quiste el núcleo asemeja a una diana de tiro lo que facilita su identificación, poro de desenquistamiento es poco visible. Trofozoíto presenta movimientos eruptivos (Page, 1974). Visvesvara reporta patogenicidad en ratones en ensayos con esta especie. La especie tolera temperaturas hasta de 39 °C.

---

#### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Excavata Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson 2003

- Discoba Simpson in Hampl *et al.*, 2009 (R)
  - Discicristata Cavalier-Smith 1998
    - Heterolobosea Page y Blanton 1985
      - Tetramitia Cavalier-Smith, 1993, emend. Cavalier-Smith en Cavalier-Smith y Nikolaev, 2008

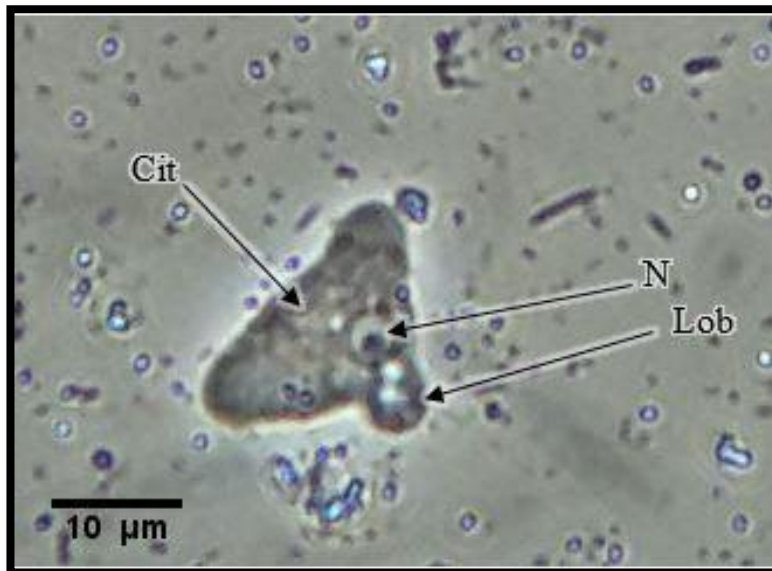


Figura 26. *Naegleria gruberi*. Micrografía de trofozoíto, se aprecia movimientos eruptivos típicos del género, núcleo bien definido (N), lobópodos eruptivos (Lob) y citoplasma de aspecto granular (Cit). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.7 *Naegleria* sp. (Alexieieff, 1912; emend. Calkins, 1913, Carter, 1970)

Presenta estadio flagelar, núcleo bien definido y fácil de encontrar tanto en quiste como en trofozoíto, trofozoíto presenta movimientos eruptivos (Page, 1974). Se clasificó hasta género debido a falta de pruebas de patogenicidad.

---

#### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Excavata Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson 2003

● Discoba Simpson in Hampl *et al.*, 2009 (R)

●● Discicristata Cavalier-Smith 1998

●●● Heterolobosea Page y Blanton 1985

●●●● Tetramitia Cavalier-Smith, 1993, emend. Cavalier-Smith en Cavalier-Smith y Nikolaev, 2008

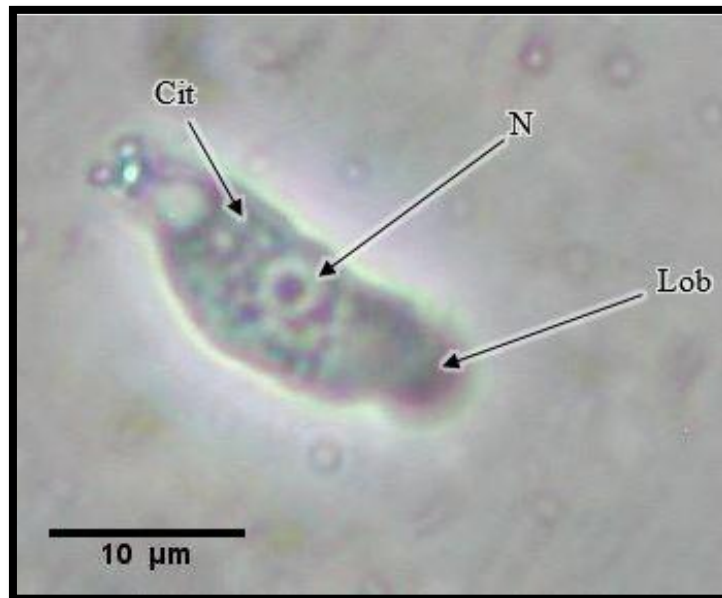


Figura 27. *Naegleria* sp. Micrografía de trofozoíto, se aprecia movimientos eruptivos típicos del género, núcleo bien definido (N), lobópodos eruptivos (Lob) y citoplasma de aspecto granular (Cit). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.8 *Sappinia pedata* (Dangeard, 1896)

Locomoción monopodial con un gran hialoplasma en parte anterior de la célula. Presentan dos núcleos unidos mutuamente siendo una de sus características principales. Quistes son generalmente binucleados y presentan reproducción de tipo sexual (Wylezich *et al.*, 2010). Asociada al único caso registrado de encefalitis no letal (Wylezich *et al.*, 2010). Se tiene pocos datos sobre la especie.

---

#### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

- Discosea Cavalier-Smith *et al.* (2004) (R)
- Flabellinia Smirnov *et al.* 2005 (R)
- Thecamoebida Schaeffer 1926 (R)

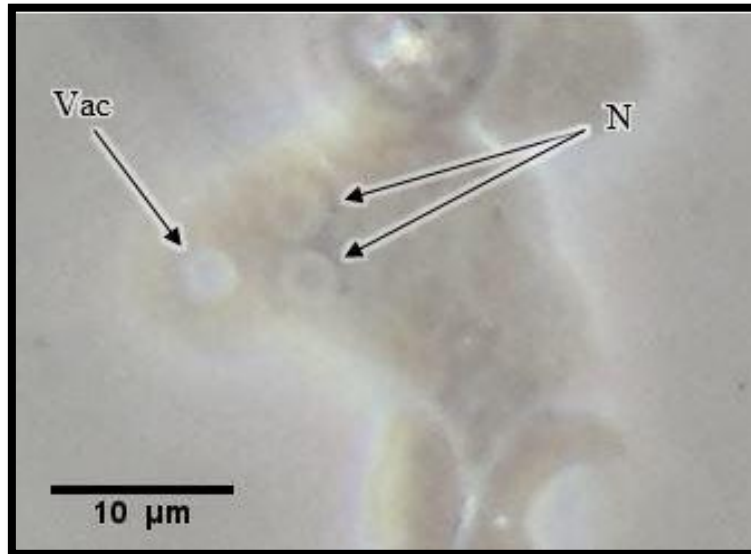


Figura 28. *Sappinia pedata*. Micrografía de trofozoíto, el organismo muestra su estado de doble nucleación (N), una gran vacuola (Vac), de movimientos lentos. Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.9 *Vahlkampfia* sp. (Chatton y Lalung-Bonnaire, 1912)

Amiba heterolobosa sin estadio flagelar, el quiste no presenta mucílago, se tiene un reporte de una especie en una infección junto con *Vermamoeba* sp, causando queratitis en paciente que empleaba lentes de contacto (Aitken *et al.*, 1996).

---

#### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Excavata Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson 2003

- Discoba Simpson in Hampl *et al.*, 2009 (R)
  - Discicristata Cavalier-Smith 1998
    - Heterolobosea Page y Blanton 1985
      - Tetramitia Cavalier-Smith 1993, emend. Cavalier-Smith in Cavalier-Smith y Nikolaev 2008 (Vahlkampfiidae Jollos 1917)

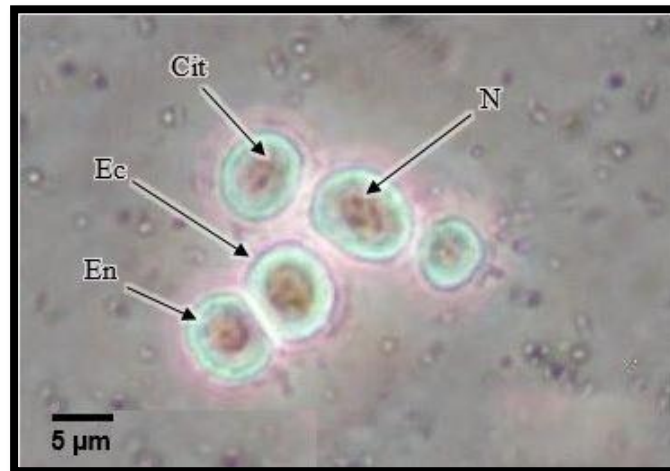


Figura 29. *Vahlkampfia* sp. Micrografía quistes, se aprecia el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y citoplasma (Cit). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.1.10 *Vermamoeba* sp. (Alexeieff, 1912; emend. Page, 1974, antes *Hartmannella*)

Trofozoíto posee una locomoción monopodial estable no eruptiva con una prominente zona hialina en la parte contraria a la zona de desplazamiento. Quistes son bilaminares redondos o ligeramente ovalados. Citoplasma sin cristales citoplásmicos prominentes. Glycocálix delgado (Siemensma, 2016). Existe reporte de coinfección con *Vahlkampfia* causando queratitis amibiana en paciente que empleaba lentes de contacto (Aitken *et al.*, 1996). Quistes con diámetro de 7 – 8  $\mu\text{m}$  con base a 7 organismos medidos.

---

#### Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

- Tubulinea Smirnov *et al.* 2005 (R)
- Euamoebida Lepšĭ 1960, emend. Smirnov *et al.* 2011 (R)

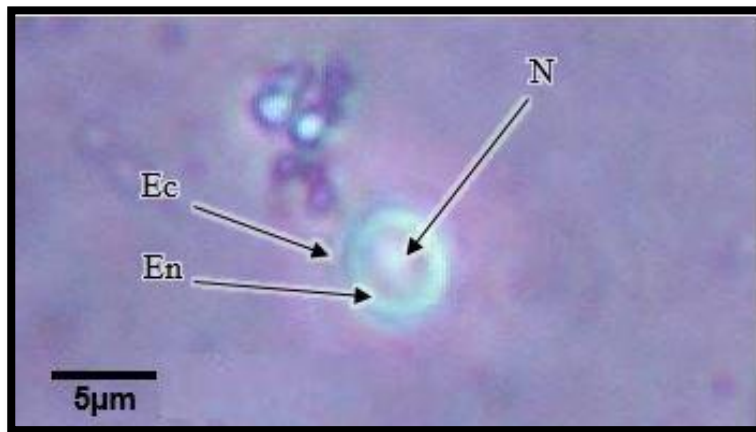


Figura 30. *Vermamoeba* sp. Micrografía de quiste, presenta una bilaminación en sus paredes y se logra diferenciar el ectoquiste (Ec) y endoquiste (En) así como el núcleo (N). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

## 1.2 Registro de amibas de vida libre no patógenas

Cabe resaltar que para poder aislar a las AVL uno de los métodos es el uso de cultivo a temperaturas de 37 °C o superiores, existen protozoos que toleran dichos rangos de temperatura y en el siguiente apartado de registra dos casos.

### 1.2.1 *Rhizamoeba* sp. (Page, 1972)

Amiba que posee una forma de desplazamiento tipo limax a una del tipo flabelado, posee de un núcleo a unos pocos, Las células adoptan una forma similar a la de un cometa (Siemensma, 2016). Este género originalmente se consideraba como amibas marinas, pero se encontraron semejanzas con amibas encontradas en los suelos y de agua dulce (Page, 1972).

---

Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

●Tubulinea Smirnov *et al.* 2005 (R)

●●Leptomyxida Pussard and Pons 1976, emend. Page 1987 (R)

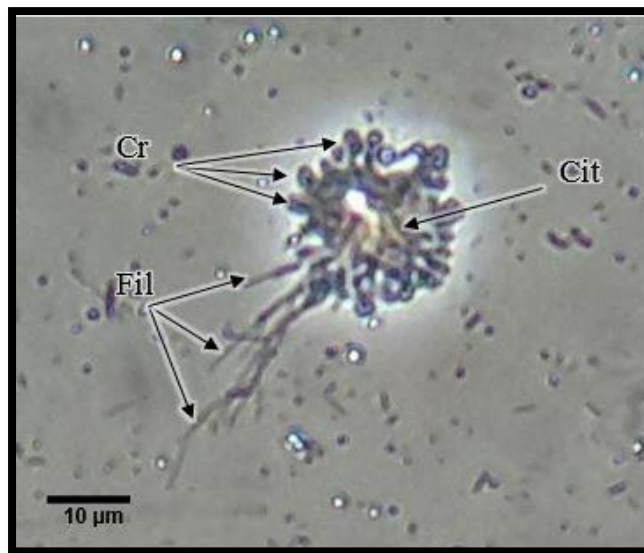


Figura 31. *Rhizamoeba* sp. Micrografía de la fase flotante, de movimientos lentos, el citoplasma Cit); presenta una forma circular con crestas (Cr), en la zona posterior emana proyecciones filamentosas (Fil). Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.



### 1.2.2 *Vannella platipodia* (Gläser, 1912)

Amiba con una forma usual de espátula o flabelada, contiene un hialoplasma cristalino, núcleo y nucléolo fácilmente diferenciados y rápida ubicación (Siemesnma, 2016). El diámetro registrado de los organismos fue de 10 a 30 micras en promedio.

---

Clasificación taxonómica

Supergrupo: Amoebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith 1998 (Eumycetozoa Zopf 1884, emend Olive 1975)

● Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004, sensu Smirnov *et al.*, 2011

●● Flabellinia Smirnov *et al.*, 2005

●●● Vannellida Smirnov *et al.*, 2005

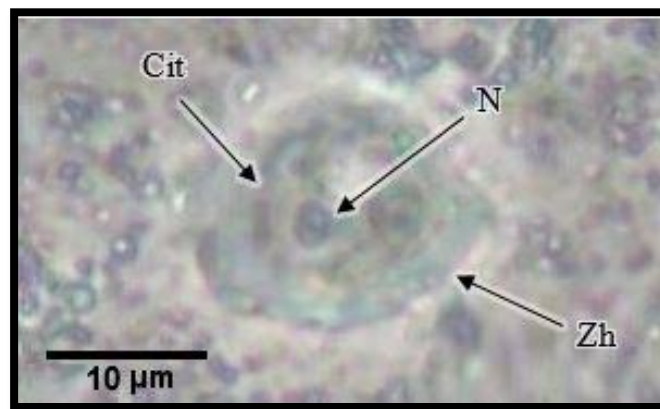


Figura 32. *Vannella platipoda*. Micrografía de trofozoíto, presenta movimientos lentos, el citoplasma (Cit); muestra una forma circular con una zona posterior elongada similar al filo de un hacha (Zh), se le aprecia un núcleo (N) Tomada en microscopio de contraste de fases (40X). Clasificación taxonómica con base en Adl *et al.*, 2012.

### 1.3 Amibas de vida libre

Como lo menciona Schuster y Visvesvara en el 2004, la termotolerancia no es sinónimo de patogenicidad. Pero también no todos los protozoos crecen en temperaturas cálidas y con parámetros físicos y químicos muy variables. Ante la presencia del calentamiento global derivado de la actividad humana en el planeta, es casi un hecho que los nichos ambientales disponibles para las amibas termotolerantes serán cada vez más amplios, especialmente para amibas como las del género *Naegleria*. Las AVL son organismos que proliferan en un amplio espectro de condiciones ambientales como es el caso del género *Acanthamoeba*.

Además tomando en cuenta lo mencionado por Gallegos y cols. en el 2009, sobre el potencial de los protozoos como bioindicadores, recordemos que las AVL son organismos heterótrofos de tipo eurioicos, capaces de soportar una amplia variedad de condiciones ambientales yendo desde temperaturas inferiores a 4 °C hasta más de 45 °C (Ávila *et al.*, 2006), lo que las hace ideales para ser usadas como posibles bioindicadores en cuerpos de agua naturales que de encontrarse un número elevado de cierta especie o género de AVL, podría considerarse un riesgo para la población que se encuentre cerca de esta fuente de agua y del mismo modo un posible indicio de contaminación. Por lo tanto, esto le suma más motivos para continuar generando reportes de estudio sobre estos protozoos en el país.

Del total de muestras de diferentes biotopos en ambos cuerpos de agua superficiales muestreados durante la época de secas y de lluvias, se identificaron un total de 17 especies pertenecientes a nueve géneros de AVL. Siendo el género *Acanthamoeba* el que presentó un mayor número de especies en ambas lagunas (Cuadro 2) (Fig. 33). De las 17 especies identificadas, ocho tienen reportes de importancia médica en humanos por tener potencial patógeno. Algunos organismos se identificaron a nivel de género debido a que se requieren estudios de tipo molecular e inclusive de patogenicidad como fue el caso de *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba*.

Fueron medidos 50 quistes (Cuadro 2) de forma aleatoria por cada especie o género y tuvieron diámetros de  $\pm 14$  a 16  $\mu\text{m}$  para casi todas las especies con excepción del género *Vannella* y *Rhizamoeba* con promedios de 20 y 25  $\mu\text{m}$  (ver anexo II), se propone que las condiciones del medio acuático influyen en el crecimiento de estas AVL. Schuster en el 2004 menciona que el factor principal para la distribución de AVL como el caso de *Acanthamoeba*, es la disponibilidad de bacterias como fuente principal de alimento y aguas cálidas principalmente; en ambos cuerpos de agua existe disponibilidad de alimento bacteriano como lo son las biopelículas, pero no se tiene reporte alguno de un caso de infección, con base en esto se especula que el medio ejerce una presión en las poblaciones de AVL que las mantiene en niveles virtualmente seguros para uso humano.

En caso de darse reportes de infección por AVL en esta región de Veracruz, se podría inferir un desequilibrio en las condiciones de las aguas. De ahí la importancia de un monitoreo regular de estos cuerpos de agua superficiales. El presente estudio es el primer registro obtenido de la distribución de AVL dentro de la región de las Grandes Montañas en el estado Veracruz, generando un primer antecedente a la contribución del conocimiento sobre AVL en el estado.

Cuadro 2. Géneros y especies de AVL identificadas durante los dos muestreos y promedio de medidas de AVL obtenidos.

Género	Especie	Diámetro (µm)
<i>Acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> *	13
	<i>Acanthamoeba castellanii</i> *	14
	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> *	15
	<i>Acanthamoeba griffini</i> *	17
	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	15
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> *	18
	<i>Acanthamoeba royreba</i> *	17
<i>Leptomyxa</i>	<i>Leptomyxa</i> sp.	16
<i>Naegleria</i>	<i>Naegleria gruberi</i>	14
	<i>Naegleria</i> sp.	13
<i>Penardia</i>	<i>Penardia</i> sp.	16
<i>Rhizamoeba</i>	<i>Rhizamoeba</i> sp.	25
<i>Sappinia</i>	<i>Sappinia pedata</i> *	20
<i>Vannella</i>	<i>Vannella platipodia</i>	20
	<i>Vannella</i> sp.	18
<i>Vahlkampfia</i>	<i>Vahlkampfia</i> sp.	5
<i>Vermamoeba</i>	<i>Vermamoeba</i> sp.	5

\*Especies de AVL con reporte de potencial patógeno en humanos.

### 1.3.1 Riqueza específica de AVL por temporada

Para ambas épocas “Ojo de Agua” fue el cuerpo de agua que presentó mayor riqueza de especies amibianas, en comparación con “La Marmolera” (Fig. 33). La época de sequía comprende los primeros meses del año y en ambos cuerpos de agua la frecuencia de AVL fue constante, sin presentar cambios significativos en la presencia de los géneros obtenidas (Fig. 34), el mismo fenómeno se observó durante el muestreo realizado en octubre en la época de lluvias. La actividad humana se intensifica en los meses de abril a mayo en “Ojo de Agua”, la cual corresponde al periodo vacacional, aunque las actividades recreativas/deportivas son constantes durante todo el año, en contraste con “La Marmolera”, donde la actividad humana es nula salvo la pesca ocasional de mojarra por parte de los habitantes de las periferia del sitio de muestreo, esto es relevante ya que se relaciona directamente con la naturaleza cosmopolita de las AVL debido a que así aumenta las posibilidades de un contacto directo con la población (Schuster y Visvesvara, 2004).

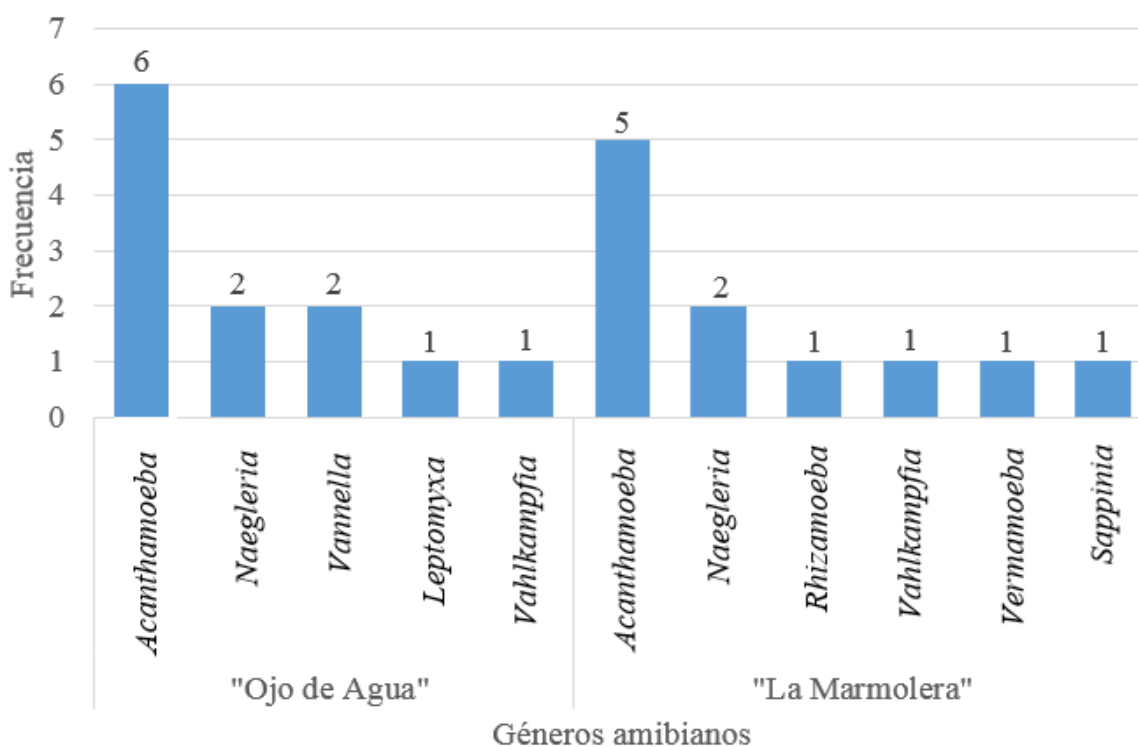


Figura 33. Frecuencia de aislados por géneros amibianos por especies registradas para ambos lagos.

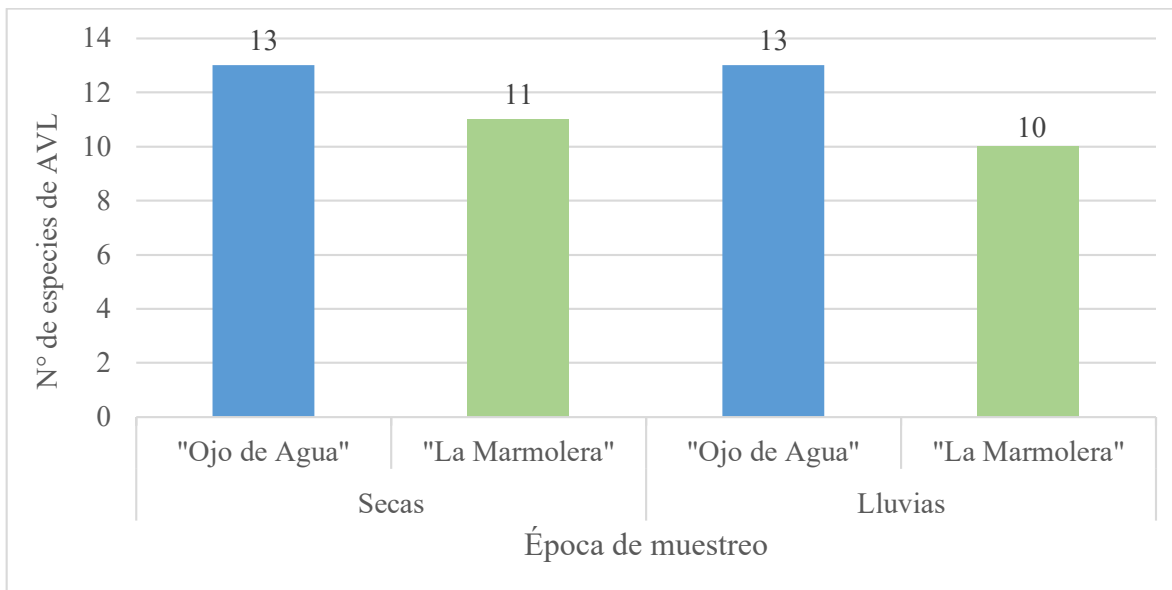


Figura 34. Riqueza de AVL en ambas épocas de muestreo en los sitios de “Ojo de Agua” y “La Marmolera”.

#### 1.4. Riqueza de AVL por sitio de muestreo

##### 1.4.1 Laguna “Ojo de Agua”

“Ojo de Agua” es un cuerpo de agua que ha sido adaptado para ser un balneario que es visitado por los lugareños y turistas; donde se reúnen para practicar actividades acuáticas como la natación durante varias horas, siendo la actividad humana permanente en el lugar. Este fue el sitio con mayor riqueza durante las dos épocas del año y con base a lo citado por Schuster y Visvesvara en el 2004, esto es relevante debido a que la exposición por parte de la población hacia este grupo de microorganismos se incrementa, lo que se traduce en un riesgo potencial de infección, en especial en grupos vulnerables inmunológicamente. Este cuerpo de agua, además de tener presencia permanente de personas a lo largo del año, posee alta actividad biológica como la presencia de biopelículas cercanas a la superficie y abundante crecimiento de plantas subacuáticas en las partes más cercanas a la orilla con excepción de la zona donde se realizan actividades de natación y la zona donde nace el agua. Siendo así que esta zona cumple con uno de los parámetros para la presencia de amibas de vida libre. De los géneros identificados en las muestras de “Ojo de Agua”, el género *Acanthamoeba* presentó una mayor proporción de especies (Fig. 35), seguida del género *Naegleria* y *Vannella*. Dentro de *Acanthamoeba* se registraron especies con potencial patógeno de las cuales se hablará en el siguiente apartado.

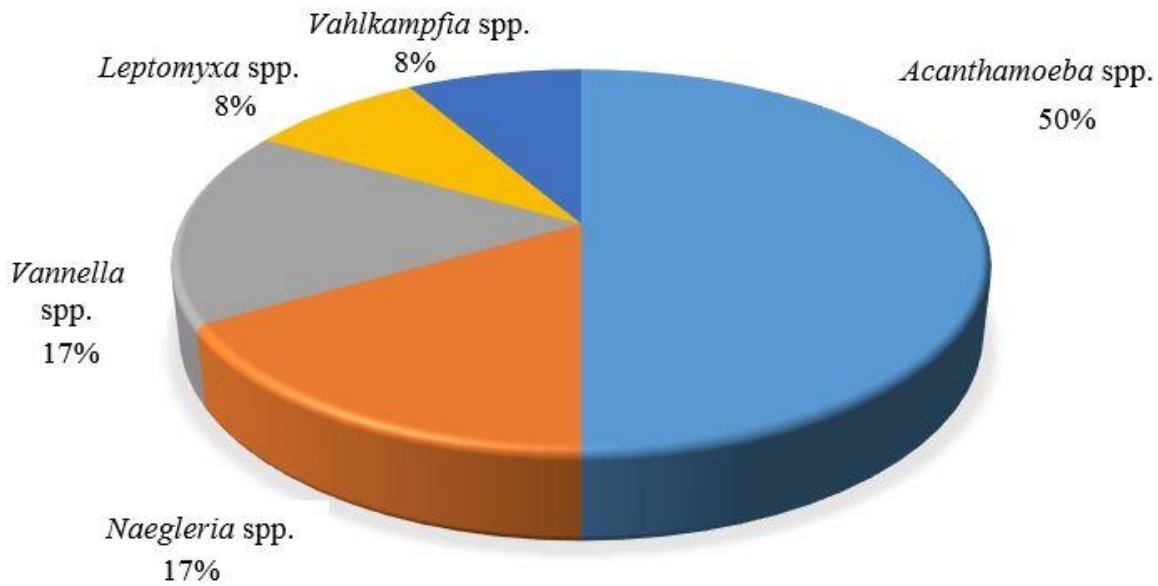


Figura 35. Proporción de AVL por géneros identificados en el sitio de “Ojo de Agua”.

#### 1.4.1.1 Especies de amibas de vida libre

*Acanthamoeba* es un género cuya biología le ha permitido una amplia distribución en muchas zonas del planeta (Schuster y Visvesvara, 2004). Las especies más frecuentes en este cuerpo de agua fueron: *A. polyphaga*, *A. castellanii* y *A. astronyxis*. La primera se tiene registro de causar casos clínicos de queratitis amibiana, la segunda tiene reporte de encefalitis amibiana granulomatosa y la última no posee hasta la fecha casos clínicos asociados, pero la incluyen en la lista de especies con potencial patógeno (Bonilla y Ramírez, 2014). Con base en los registros obtenidos de las muestras de “Ojo de Agua” en los meses de mayo y octubre, el género *Acanthamoeba* fue el que obtuvo una mayoría registrada con seis especies y el resto de AVL’s se distribuyó en *Naegleria*, *Vannella*, *Penardia* y *Leptomyxa*. La literatura citada menciona que las amibas con potencial patógeno hasta ahora registradas son: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. lenticulata*, *A. lugdunensis*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. royreba* (Astorga, 2016; Ayala y Peralta, 2009; Bonilla y Ramírez, 2014; Cabello-Vilchez, 2015; Castrillón y Orozco, 2013; Oddó, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007). De este grupo, cinco especies fueron reportadas en las muestras de “Ojo de Agua” (*Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. royreba*).

### 1.4.2 Laguna “La Marmolera”

El cuerpo de agua “La Marmolera” se ubica a los pies del cerro conocido como “Cerro del Borrego” hacia su zona norte tomando como referencia la entrada sur que da acceso al ecoparque de nombre homónimo, a diferencia de “Ojo de Agua”, este no cuenta con alguna adaptación para uso recreacional o de consumo, es poco conocido en la zona al grado de no tener menciones en documentos oficiales. Con relación en la comparación entre el mes de mayo (época de secas) y del mes de octubre (época de lluvias), el género con mayor presencia también fue *Acanthamoeba*, abarcando cerca del 50% de los géneros identificados, seguida del género *Naegleria* (Fig. 36). Si se compara de forma general con “Ojo de Agua”, “La Marmolera” presentó un menor número con relación de géneros identificados. A diferencia de “Ojo de Agua”, “La Marmolera” es un cuerpo de agua superficial que no muestra mucha actividad visible en la superficie, sus aguas suelen estar en calma y los pobladores de las periferias no le dan un uso recreativo. Siendo la actividad humana aparentemente nula.

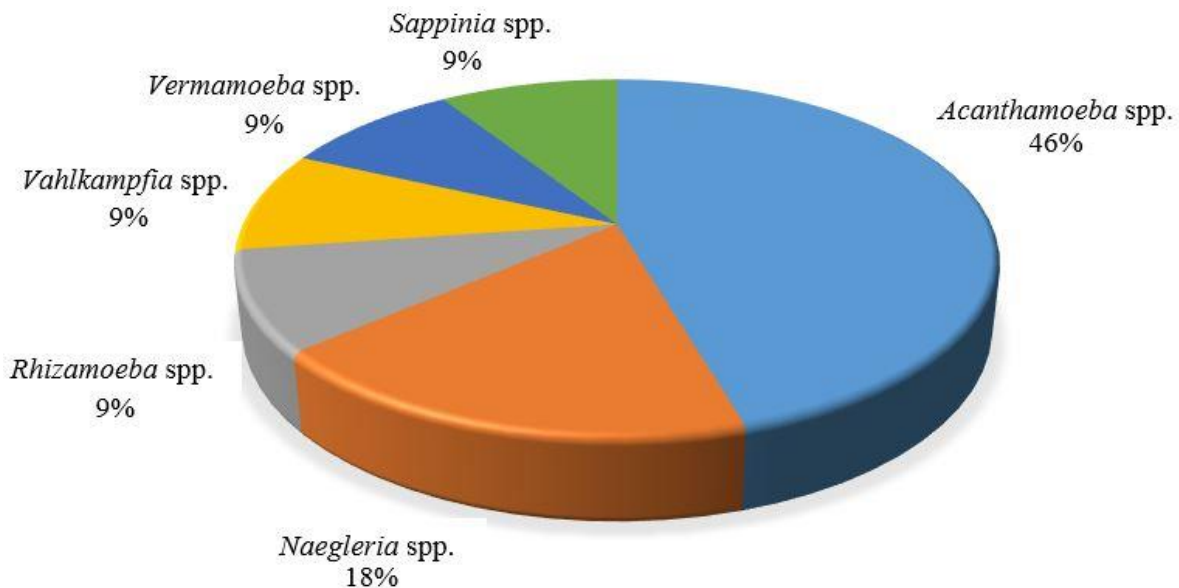


Figura 36. Proporción de AVL por géneros identificados en el sitio de “La Marmolera”.

#### 1.4.2.1 Especies de amibas de vida libre

Una característica importante del género *Acanthamoeba*, es la presencia de celulosa en la composición de su doble quiste el cual le otorga la posibilidad de colonizar muchos ambientes, así como la de resistir condiciones ambientales poco favorables (Astorga, 2016; Bonilla y Ramírez, 2014; Cabello-Vílchez, 2015; Castrillón y Orozco, 2013). Dentro de este género se obtuvo la mayor frecuencia de especies registradas durante los meses de abril y octubre concernientes a las temporadas de sequía y lluvias (Fig. 33), siendo *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *A. astronyxis* las AVL con mayor frecuencia. A su vez estas AVL tienen reportes de casos clínicos o de poseer potencial patogénico (Astorga, 2016; Bonilla y Ramírez, 2014; Cabello-Vílchez, 2015; Castrillón y Orozco, 2013). Del género *Naegleria* solamente se identificó a *N. gruberi* y *Naegleria* sp., la cual quedó solo a nivel de género debido a la falta de ensayos que complementen la identificación del organismo, aunque por el movimiento eruptivo muy activo que presentaba se sospecha que se trate de *Naegleria fowleri*, para ello de igual forma se requiere de ensayos complementarios de patogenicidad para identificar la especie. *Rhizamoeba*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba* quedaron registradas únicamente a nivel de género y de *Sappinia* solo fue ubicada una especie, *S. pedata*, la cual tiene reporte de caso de infección con recuperación satisfactoria en un paciente inmunocompetente en el año 2001 (Visvesvara, 2007). *Sappinia pedata* se le asocia con zonas que poseen restos de materia fecal, por lo que al principio esta amiba se le considero de naturaleza coprozoica al haberse reportado en muestras de estiércol (Brown *et al.*, 2007; Walochnik *et al.*, 2010; Wylezich *et al.*, 2015). En algunas orillas de “La Marmolera” se encontraban animales de granja deambulando libremente como caballos y aves de corral, este factor podría ser clave en la presencia de dicha amiba.

#### 1.5 Riqueza de amibas de vida libre por biotopo

Los biotopos muestreados fueron de dos tipos, uno fue muestra de agua y el otro se enfocó en las biopelículas. La mayor riqueza de AVL se registró en las biopelículas (Cuadro 3), las cuales son comunidades de microorganismos y en su mayoría consiste en muchas especies de bacterias y pueden incluir otros tipos de organismos, como arqueas, hongos y protozoos que se unen a superficies sólidas (Solomon *et al.*, 2013). Estas comunidades bacterianas son un sitio ideal para la alimentación de las AVL (Schuster y Visvesvara, 2004), de ahí que los registros obtenidos marcan una tendencia a mostrar una mayor frecuencia de especies de AVL registradas en este biotopo. Muchos tipos de bacterias que habitan ambientes acuosos forman densas películas llamadas biopelículas. Las bacterias segregan una sustancia pegajosa rica en polisacáridos y se bioincrusta en esta matriz que a su vez sirve como una cubierta protectora para otros microorganismos como las AVL las cuales quedan aisladas del medio exterior, dándoles tiempo para su óptimo desarrollo. En las muestras de agua, la presencia de AVL fue inferior en comparación con las biopelículas, el medio acuoso es usado como medio de transporte por las AVL, basados en la información obtenida por Gallegos y cols., en el 2017, Ramírez y cols, en el 2009; se asocia la presencia de bacterias con una mayor predominancia de AVL ya que son las bacterias una fuente de alimento de las AVL. Así como posiblemente otros protozoos no termotolerantes que depredan a las AVL suspendidas en el medio acuoso, lo que mantiene en niveles bajos o nulos la presencia de AVL, así como otros organismos en el agua, manteniendo así un equilibrio (Gallegos *et al.*, 2009).



Cuadro 3. Presencia de especies de AVL en muestras de agua y de biopelículas reportados en ambos cuerpos de agua.

	Laguna	Ojo de Agua		La Marmolera	
	Época del año	Agua	Biopelícula	Agua	Biopelícula
Especies reportadas	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	x	x		x
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	x	x	x	x
	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>		x		
	<i>Acanthamoeba griffini</i>	x	x		x
	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>				x
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	x	x		x
	<i>Acanthamoeba royreba</i>		x		
	<i>Leptomyxa</i> sp.		x		
	<i>Naegleria gruberi</i>	x		x	
	<i>Naegleria</i> sp.	x	x	x	
	<i>Penardia</i> sp.	x	x	x	
	<i>Rhizamoeba</i> sp.			x	
	<i>Sappinia diploidea</i>				x
	<i>Vahlkampfia</i> sp.	x			
	<i>Vannella platipoda</i>		x		
	<i>Vannella</i> sp.		x		
	<i>Vermamoeba</i> sp.				x

Presencia del organismo (x)

## 1.6 Parámetros físicos y químicos del agua

En ambos cuerpos de agua se realizó una medición y registro de los parámetros fisicoquímicos. La finalidad de estas mediciones fue para conocer el estado de las condiciones ambientales imperantes en dichos cuerpos de agua, además de poder comparar los valores obtenidos entre ambas épocas del año y así correlacionar con la presencia de AVL. “Ojo de Agua” es un parque acuático construido en una zona de origen natural por lo que la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las piscinas” deja exento este tipo de cuerpos de agua ya que es casi inviable algunos procesos de sanitización ya que representa un riesgo para las colonias microbianas y demás organismos que componen el ecosistema en el cuerpo de agua natural. “La Marmolera” y “Ojo de Agua” forman parte de una red de cuerpos de agua que afloran en varios lados de la región central de Veracruz, lo que podría ser de ayuda para futuros estudios a la diversidad de protistas de la zona, además de tener un potencial impacto en la población debido a que en la región es frecuente que la gente acuda a diferentes cuerpos de agua de libre acceso para uso recreativo y/o deportivo en especial durante el verano.

### 1.6.1 pH

Para “La Marmolera” los valores de pH oscilaban entre 9.3 a 9.5 en la época de sequía siendo un nivel de alcalinidad medianamente alto, esto se esperaba debido a que la zona está contaminada por descargas de hidróxido de calcio ( $\text{CaO}_2\text{H}_2$ ) la cual puede denominarse también como cal hidratada, cal apagada o simplemente “cal”, en la época de lluvias hubo una caída en la escala de pH, pero esto se puede entender debido a las constantes y abundantes descargas de agua provenientes de la ladera del cerro que esta junto a este cuerpo de agua, lo que trae consigo un arrastre de materia de la zona, causando una disminución de la alcalinidad (Hernández *et al.*, 2003), a diferencia de “Ojo de Agua” este ámbito rondaba de 8 a 8.8 para los muestreos en ambas épocas del año, lo que nos indica un medio con pH constante. Khan y cols. en el 2009 mencionan que las AVL tienen una tolerancia de pH que va de 3 a 10, por lo tanto, estos valores se encuentran dentro del ámbito de tolerancia para el desarrollo de AVL en ambas localidades (Cuadro 4).

Cuadro 4. pH registrado en ambos sitios de muestreo durante la época de secas y de lluvia.

"Ojo de Agua"			"La Marmolera"		
Sitio de muestreo	pH		Sitio de muestreo	pH	
	Lluvias	Secas		Lluvias	Secas
OAI	8.1	8.4	MA1	8.3	9.37
OA2	8.2	8.7	MA2	8	9.4
OABP1	8.4	8	MBP1	9.5	9.5
OABP2	8.6	8.8	MBP2	9.37	9.37
OABP3	8	8.1			
OABP4	8.3	8.5			

“Ojo de Agua”: OA) Muestras de agua, OBP) Muestras de biopelícula. “La Marmolera”: MA) Muestras de agua, MBP) Muestras de biopelícula.

## 1.6.2 Oxígeno disuelto

En el caso del parámetro de oxígeno disuelto, “La Marmolera” presentó valores inferiores a los registrados en “Ojo de Agua”, esto posiblemente debido al poco movimiento de sus aguas que se aprecian a simple vista y seguramente la cantidad de materia suspendida la cual en este caso es la cal hidratada, bloqueando la mayoría de la visión hacía el fondo de este cuerpo de agua, a diferencia de la laguna “Ojo de Agua” siendo está muy dinámica teniendo pequeñas cascadas; de esta forma se presenta un constante movimiento de agua, permitiendo una renovación periódica del cuerpo acuático y niveles bajos de materia suspendida lo que resulta en aguas claras que permiten el libre paso de la luz solar hasta la zona del fondo (Hernández *et al.*, 2003). Durante el segundo muestreo en “La Marmolera”, el oxígeno disuelto mostró una notable disminución, esto debido posiblemente a que se tomaron en temporada de lluvias donde el cuerpo de agua fue nutrido por materia orgánica proveniente del arrastre de sedimentos procedentes de las laderas del “Cerro del Borrego”, viendo así reducido sus niveles de oxígeno; en “Ojo de Agua” no hubo un cambio significativo debido quizá a la ya mencionada alta dinámica de sus aguas, las cuales están por poco tiempo retenidas para luego ser liberadas río abajo además de que en algunas partes del fondo existen comunidades de plantas que de forma regular producen oxígeno manteniendo los parámetros de OD constantes (Cuadro 5) (Gama *et al.*, 2010). A pesar de estas concentraciones, los rangos están entran dentro de los valores suficientes de oxigenación para la proliferación de formas de vida en cuerpos de agua (Gama *et al.*, 2010).

Cuadro 5. Oxígeno disuelto registrado en ambos sitios de muestreo durante la época de secas y de lluvia.

"Ojo de Agua"			"La Marmolera"		
Sitio de muestreo	mg/l		Sitio de muestreo	mg/l	
	Lluvias	Secas		Lluvias	Secas
OA1	6.6	8.1	MA1	3.85	6.4
OA2	8	7.5	MA2	5	8.5
OABP1	5.8	8.1	MBP1	4.1	4.1
OABP2	5.5	7.9	MBP2	8	9.6
OABP3	6.8	8.6			
OABP4	8	8.5			

“Ojo de Agua”: OA) Muestras de agua, OBP) Muestras de biopelícula. “La Marmolera”: MA) Muestras de agua, MBP) Muestras de biopelícula.

### 1.6.3 Conductividad

La conductividad es la capacidad que tiene el agua para poder transportar un flujo eléctrico directamente proporcional a la cantidad de iones disueltos en ella (Gama *et al.*, 2010; Rodríguez, 2009). La determinación de conductividad es de gran importancia pues da una idea del grado de mineralización del agua natural, potable, residual, residual tratada, de proceso o bien del agua para ser usada en el laboratorio en análisis de rutina o para trabajos de investigación, esto con base en la NOM NMX-AA-093-SCFI-2000 que habla sobre el análisis de agua, determinación de la conductividad electrolítica, métodos de prueba. Los niveles de conductividad en el mes de abril (época de secas) para “La Marmolera” tuvieron una media de 970  $\mu\text{S}/\text{cm}$  siendo niveles que permitían la proliferación de varias formas de vida acuática como peces y algunos anfibios e inclusive el crecimiento de flora en sus orillas (Gama *et al.*, 2010) para el mes de octubre los niveles descendieron considerablemente situándose en los 238  $\mu\text{S}/\text{cm}$  esto probablemente relacionado con el aumento de sedimentos y materia orgánica que pudiesen haber contribuido a la captación de iones disueltos y su deposición en el fondo del cuerpo de agua. Para la misma medición en la zona de “Ojo de Agua” los ámbitos se mantuvieron en 280  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para el mes de abril (época de secas) y de 284 a 285  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en el mes de octubre (época de lluvias) de esta forma hay una variación poco significativa en la zona. Esta baja concentración podría deberse a la constante circulación de agua que presenta el manantial (Cuadro 6). Las AVL toleran amplios rangos de conductividad en el medio, el agua que supere un valor de 3000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  es considerada salina e influiría sobre las especies que ahí viven (Suárez, 2004). Con base en esto y en los datos obtenidos en el presente estudio, los niveles de conductividad no representan un factor que influya sobre las AVL en estos cuerpos de agua dulce.

Cuadro 6. Conductividad registrada en ambos sitios de muestreo durante la época de secas y de lluvia.

"Ojo de Agua"			"La Marmolera"		
Sitio de muestreo	$\mu\text{S}/\text{cm}$		Sitio de muestreo	$\mu\text{S}/\text{cm}$	
	Lluvias	Secas		Lluvias	Secas
OAI	284.3	280	MA1	239.3	970
OA2	285	280	MA2	239.3	970.3
OABP1	284	280	MBP1	238	972
OABP2	284	280	MBP2	238	970
OABP3	284	280			
OABP4	284	280			

“Ojo de Agua”: OA) Muestras de agua, OBP) Muestras de biopelícula. “La Marmolera”: MA) Muestras de agua, MBP) Muestras de biopelícula.

### 1.6.4 Temperatura del agua

Los valores registrados para la temperatura del medio acuático en ambos sitios no mostraron una variabilidad significativa durante las dos épocas (secas y lluvia) siendo constantes en cada cuerpo de agua (Cuadro 7). Las AVL tienen una amplia gama de tolerancia a las condiciones ambientales imperantes, especialmente por las características estructurales de sus quistes lo que les otorga un alto grado de permanencia en muchas zonas (Rivera *et al.*, 1994; Rodríguez, 1994). En el caso de la temperatura, en ambos cuerpos de agua hubo una tendencia de estabilidad y valores tolerables para las AVL, así como para varios microorganismos. Cabral en el 2000 menciona que el ámbito óptimo de crecimiento de AVL oscila entre los 20 a los 35 °C, siendo 30 °C el ámbito idóneo para su proliferación, pero también Gianinazzi y cols. en 2009 dicen que los valores de crecimiento para AVL con potencial patógeno van entre los 13 y 45 °C ampliando así el espectro de condiciones de temperatura para la presencia de estos microorganismos y que coincide con las temperaturas registradas en ambos cuerpos de agua. En 2015 Andrade y cols. registraron la presencia de AVL patógenas en la Cuenca de México, al sur de la Altiplanicie Mexicana cuyas aguas oscilaban de los 6.6 a los 16.7 °C, ampliando más aún el ámbito de proliferación de estos organismos en el medio. En el caso de la temperatura ambiental, los valores fueron regulares con una media de 30 a 31 °C en la época de sequía y de 28 a 30 °C en la época de lluvia.

Cuadro 7. Temperatura registrada en ambos sitios de muestreo durante la época de secas y de lluvia.

"Ojo de Agua"			"La Marmolera"		
Sitio de muestreo	°C		Sitio de muestreo	°C	
	Lluvias	Secas		Lluvias	Secas
OAI	15	17	MAI	18.5	18
OA2	16	17.5	MA2	18	19
OABP1	15	17	MBP1	20	18.5
OABP2	15	17	MBP2	19	19
OABP3	15	17			
OABP4	15	17			

“Ojo de Agua”: OA) Muestras de agua, OBP) Muestras de biopelícula. “La Marmolera”: MA) Muestras de agua, MBP) Muestras de biopelícula.

## 1.7 Análisis estadístico

### 1.7.1 Índice de Jaccard

Se realizó un dendrograma de clasificación jerárquica mediante el uso del programa libre de análisis científicos Past®, utilizando el índice de Jaccard para determinar la similitud entre la riqueza de especies de AVL de las diferentes zonas muestreadas para las dos épocas del año (secas y lluvias), donde el valor 1 se considera como una similitud del 100% entre las muestras obtenidas. Las muestras amibianas fueron agrupadas por época del año (secas y lluvias), con la finalidad de determinar la similitud de la riqueza reportada entre las diferentes muestras obtenidas. En la época de sequía se encontró una similitud superior al 75% entre las zonas OABP2 y OABP3, las cuales poseían entre ellas cuatro especies de AVL (*Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *Naegleria* sp.), que han sido reportadas por ser patógenas en humanos. Estas muestras pertenecen a biopelículas las cuales, según Solomon y cols. en 2013, son un sitio de interacción bacteriana y de otros microorganismos como protozoos, grupo donde se ubican las AVL. Dentro de las biopelículas se mantiene un microambiente ideal que aísla de los cambios bruscos ambientales a las AVL lo que les permite tener una presencia constante a lo largo del tiempo (Gallegos *et al.*, 2019). El resto de las zonas tuvieron una oscilación de similitud inferiores al 60% (Fig. 37), esto se interpreta como una distribución totalmente aleatoria en las poblaciones de AVL obtenidas.

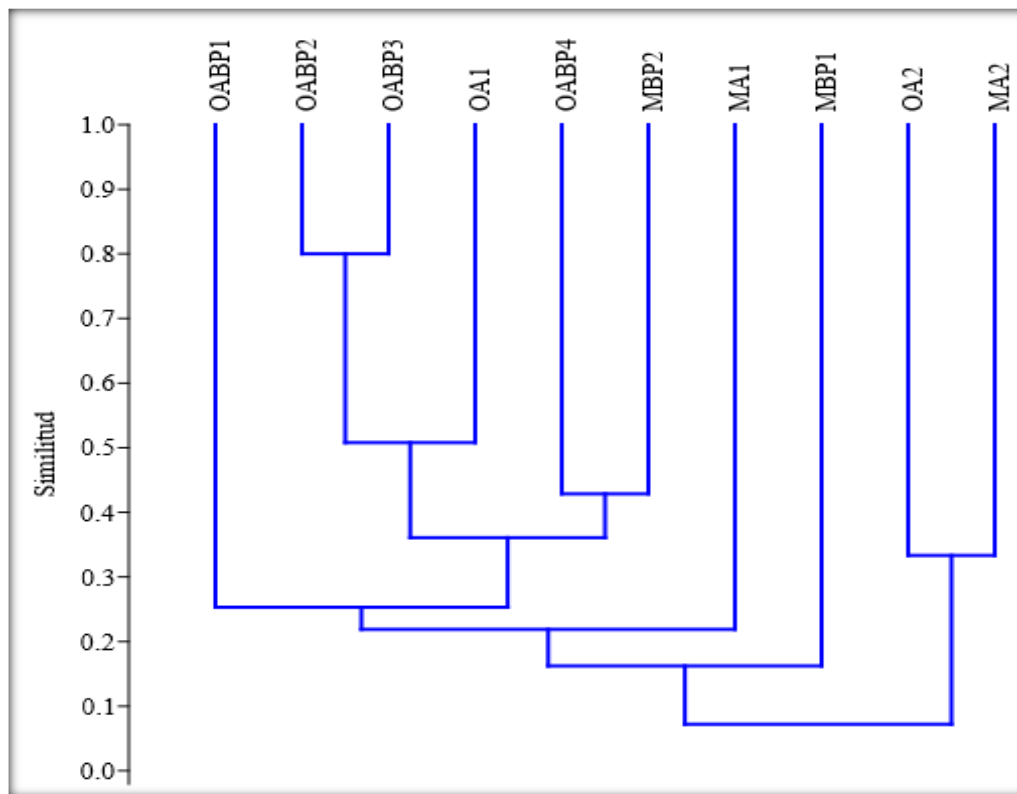


Figura 37. Dendrograma que expone el índice de Jaccard de las zonas de muestreo en temporada de secas en “Ojo de Agua”: Muestras de agua (OA) y biopelículas (OABP) y en “La Marmolera”: Muestras de agua (MA) y biopelícula (MBP). Método de agrupamiento UPGMA, coeficiente de correlación de .93.

Durante el muestreo en la época de lluvias (Fig. 38), hubo un nivel de similitud entre todas las zonas de muestreo inferior al 60%, indicando así una mayor dispersión de los organismos, lo cual está influenciado posiblemente por factores como el aumento de las precipitaciones pluviales, descarga de escurrimientos hacia estos cuerpos de agua y la regularidad de los factores físicos y químicos que fomentan una dispersión generalizada de las AVL. El factor humano se aplicaría únicamente a las muestras de “Ojo de Agua” ya que en “La Marmolera” las actividades recreativas son inexistentes. Se formaron dos grupos de dos sitios de muestreo de cuerpos de agua superficial diferentes que compartieron un índice de similitud idénticos, superior al 45%, en el primer grupo están las muestras de los sitios OABP4\* y MBP2\* en cuyas muestras se encontraron *Acanthamoeba castellanii*, *A. griffinii* y *A. polyphaga*. En el segundo grupo formado estaban las muestras de los sitios OA2\* y MA2\* con un índice de similitud superior al 45%, el organismo compartido fue *Vahlkampfia* sp. y pertenecía a muestras de agua. Como se muestra en el dendrograma, hay una tendencia a acumular muestras de agua y de biopelículas por separado a pesar del bajo nivel de similitud. Factores como una posible baja profundidad del cuerpo de agua superficial, corrientes de aire, logran que las biopelículas interactúen en casi toda la columna de agua dando por resultado un alcance mayor en la presencia de AVL registradas.

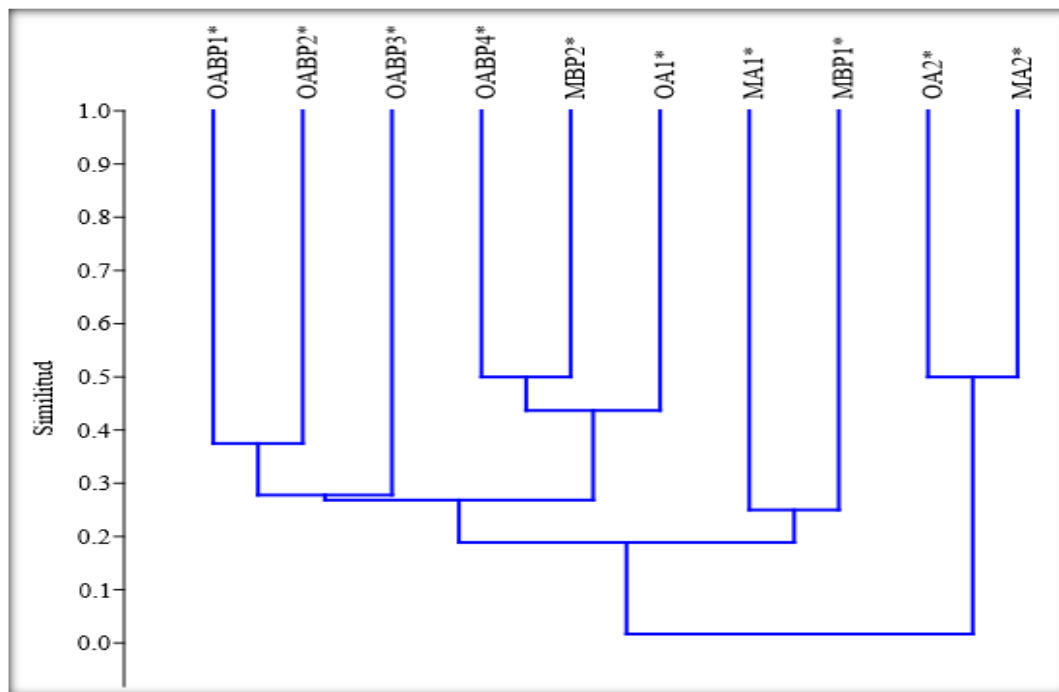


Figura 38. Dendrograma que expone el índice de Jaccard de similitud de las zonas de muestreo en temporada de lluvia (\*) en “Ojo de Agua”: Muestras de agua (OA) y biopelículas (OABP) y en “La Marmolera”: Muestras de agua (MA) y biopelícula (MBP). Método de agrupamiento UPGMA, coeficiente de correlación de .93.

Para el caso de “La Marmolera”, sus aguas quietas y turbias por los sólidos disueltos en ella, pudieran haber favorecido que las AVL se hayan mantenido en las biopelículas y zonas de agua cercanas a las orillas de este cuerpo de agua. Para poder analizar si había algún tipo de tendencia entre las poblaciones de AVL registradas en ambas épocas del año, se realizó una comparativa mediante el análisis de Jaccard. El análisis arrojó cuatro grupos los cuales mostraron una tendencia de unión con respecto a la temporada del año. Cuatro zonas de muestreo (Fig. 39), tuvieron una similitud del 100% (MA1, MA1\*, OA1, OA1\*, MBP2, MBP2\*, OABP1 y OABP1\*). Las especies encontradas aquí no tuvieron ninguna variación entre el paso de una estación a otra lo que nos indica una estabilidad en las condiciones físicas y químicas del cuerpo de agua superficial, lo que puede estar fomentando la regularidad poblacional de AVL. Algunas zonas donde se analizó biopelículas tuvieron un porcentaje de similitud por arriba del 75% lo que nos indica que la presencia de dicha biopelícula es una zona la cual los microorganismos como las AVL pueden estar protegidas de los cambios ambientales y proliferar dentro de una cadena trófica establecida con base mayoritariamente por bacterias.

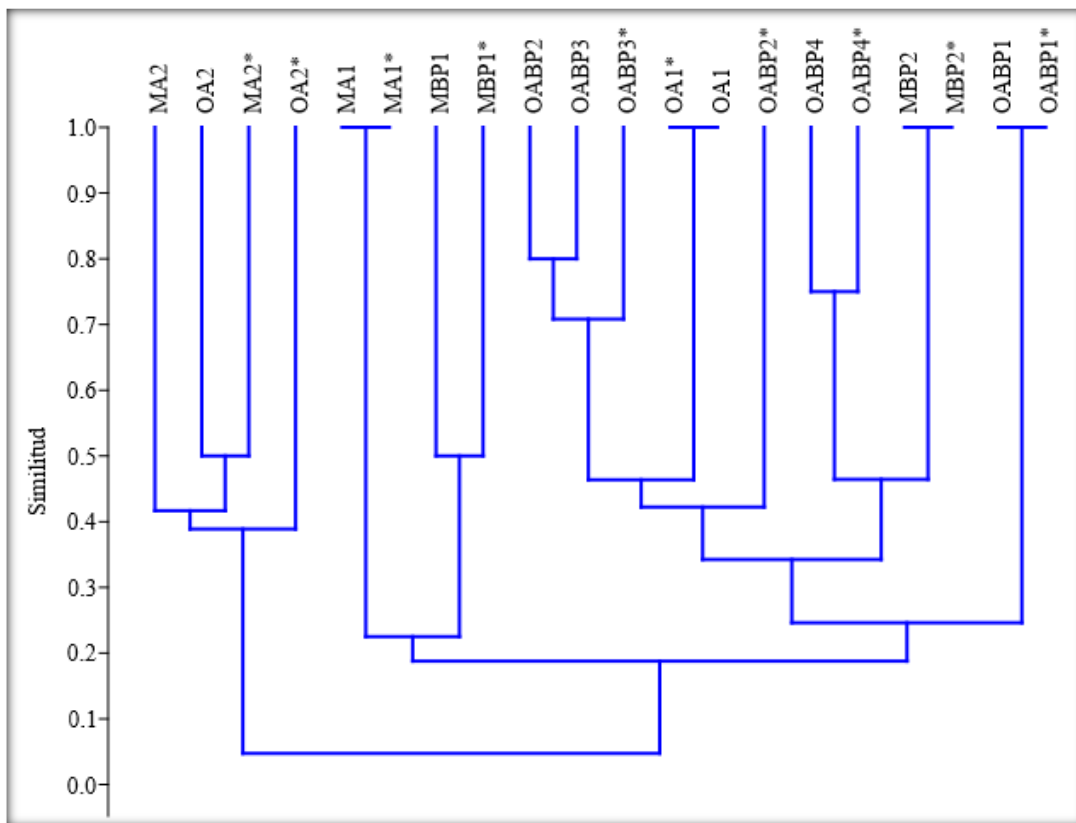


Figura 39. Dendrograma que expone el índice de Jaccard de similitud entre zonas de muestreo entre la temporada de sequía y de lluvias (\*) en “Ojo de Agua”: Muestras de agua (OA) y biopelículas (OABP) y en “La Marmolera”: Muestras de agua (MA) y biopelícula (MBP). Método de agrupamiento UPGMA, coeficiente de correlación de .93.



## IX CONCLUSIONES

1. Se identificó un total de 17 especies de AVL las cuales fueron distribuidas en nueve géneros.
2. El género *Acanthamoeba* fue el más frecuentemente aislado, siendo la especie *A. castellanii* la de mayor frecuencia en ambas lagunas durante los muestreos en los meses de mayo y octubre. La cual tiene reporte de causar encefalitis y queratitis en humanos.
3. Se aislaron e identificaron morfológicamente siete especies de AVL de importancia médica: *Acanthamoeba astronyxis*, *A. royreba*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. polyphaga* y *Sappinia pedata*, esta última se encontró exclusivamente en “La Marmolera”. El género *Vahlkampfia* contó también con reportes de presencia en ambos cuerpos de agua y se tiene un caso registrado de coinfección junto con *Vermamoeba* sp.
4. La temporada con mayor registro de riqueza de AVL fue la de secas, registrada para ambos cuerpos de agua.
5. El biotopo con mayor riqueza de AVL fueron las biopelículas, sitio en el cual coexisten comunidades variadas de bacterias y otros microorganismos. Asumiendo entonces que en las biopelículas siempre existirá una alta tendencia de encontrar AVL.
6. Las mediciones de los parámetros físicos y químicos en ambos sitios no mostraron diferencia significativa durante las épocas de lluvia y secas, mostrando una constante. Estos valores entran dentro de la amplia gama de tolerancia que le permiten a las AVL desarrollarse.
7. El porcentaje de similitud en el índice de Jaccard fue de un 60% lo que se traduce como una distribución aleatoria de las AVL en las muestras obtenidas en ambos cuerpos de agua.
8. Se concluye que, hasta el momento de haber medido los parámetros físicos y químicos del agua, así como la toma de muestras de biopelícula y agua, no existe un riesgo aparente por infección causada por AVL.
9. Este es el primer trabajo realizado en esta zona del estado de Veracruz, la información obtenida puede ser de mucha utilidad para investigaciones posteriores que ayuden a resolver casos de infecciones del sistema nervioso central, cutáneas, oculares y dérmicas, las cuales se sospechen sean atribuidas a amibas de vida libre. Así como el de aportar información al censo de organismos protistas del país.

## X RECOMENDACIONES

En México no hay una norma que estipule un límite permisible en cuanto a la presencia de AVL potencialmente patógenas en cuerpos de agua superficial de tipo natural como “Ojo de Agua” y “La Marmolera”, mientras que en otros países como Australia se estableció un límite máximo de cinco organismos termotolerantes (*Naegleria fowleri*) por cada litro de agua. Siendo esto relevante para ser considerado para futuras revisiones en materia de riesgos potenciales en cuerpos de agua naturales para uso humano en el país.

El uso de equipo protector como narigueras, gafas de natación y el uso de calzado acuático sería el ideal para poder minimizar las probabilidades de exposición a las AVL. También se hace sugerencia de evitar realizar natación en zonas donde haya presencia de biopelículas en abundancia, lo que sería ideal que se colocara señalizaciones para los usuarios.

Algunos organismos se identificaron a nivel de género debido a que se requieren estudios de tipo molecular para evaluar su patogenicidad, como en el caso de *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba*.

El cambio climático se está acentuando más conforme pasa el tiempo y nuestro país ya está siendo afectado por este fenómeno, lo que eventualmente traerá cambios en todos los niveles de organización de la materia viva. Ambos cuerpos de agua forman parte de esta ya mencionada red de manantiales y ríos, lo que remarca la importancia de un monitoreo regular de estos cuerpos acuáticos para poder garantizar la seguridad en el uso de estas aguas y tomar medidas preventivas ante posibles alteraciones en el número de amibas de vida libre.

## XI LITERATURA CITADA

1. Adl, A. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Helss, A., Hopperanth, M., Lara, E., leGall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C., Smirnov, A. y Spiegel, F. W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal Eukaryotic Microbiology*, 59 (5), 429-493.
2. Aitken, D. H. J., Kinnear, F. B., Kirkness, C. M., Lee, W. R. y Seal, D. V. 1996. Amebic and Vermamoeba infection. *Ophthalmology*. 103 (3): 485 – 494.
3. Andrade, M. A., Carrasco, Ma. M., Ortiz, R., Ibarra, Ma. R., Carmona, J. y Bonilla, P. 2015. Amibas de vida libre y potencialmente patógenas de ríos de la Cuenca de México. *Tendencias de Investigación en Limnología Tropical*. Sección 2: Calidad del agua: métodos, indicadores y fuentes potenciales de contaminación. p115-122.
4. Astorga, L. B. 2016. *Ecología de Acanthamoeba spp. en Chile: Identificación Fenotípica y Genotípica en Agua, Suelos y Vegetales* (Tesis Doctoral). Universidad de Zaragoza, Facultad de Medicina, Chile.
5. Ávila, I., Rodríguez, M., Infante, D., Llovera, V., Álvarez, O. y Briceño, M. 2006. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”, Maracay, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 58 (1), 19 – 24.
6. Bennett, W. M., Nespral, J. F., Rosson, M. W. y McEvoy, K. M. 2008. Use of organs for transplantation from a donor with primary meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *American Journal of Trasplantation*, 8: 1334-1335.
7. Betanzos, A., Bañuelos, C. y Orozco, E. 2019. Host Invasion by Pathogenic Amoebae: Epithelial Disruption by Parasite Proteins. *Genes*, 10 (618): 1-32.
8. Bonilla, L. P. y Ramírez, F. E. 2014. Amibas de vida libre patógenas y oportunistas. *En: Becerril, F. M. (ed.). Parasitología Médica*. Mc Graw Hill Education, Distrito Federal, México. 37-50.
9. Brown, M., W., Spiegel, F., W. y Silberman, J., D. 2007. Amoeba at attention, phylogenetic affinity of *Sappinia pedata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 54: 511-519.
10. Brown, S. y De Jonckheere, J.F. 1999. A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSU rDNA sequences. *European Journal of Protistology*, 35 (1): 49-54.

11. Cabanes, P. A., Wallet, F., Pringuez, E., y Pernin, P. 2001. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2927-2937.
12. Cabello-Vílchez, A. M. 2015. *Acanthamoeba* spp. un agente oportunista en infecciones humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener*. (4): 11-32.
13. Cabello-Vílchez, A. M. 2016. *Balamuthia mandrillaris* en el Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. *Infectio: Asociación Colombiana de Infectología*. (20) 2: 107-119.
14. Cabrero M. O. A., Palma N. J. P., Martínez V. A. V., Rivera S. G., y Bocanegra G. V. 2018. Detección por cultivo de amibas de vida libre en fuentes de agua superficiales de la Cd. de Reynosa, Tamaulipas. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(2), 16-22.
15. Carbal, R. L., T. y Foen, A. L. 2014. *Amebas de Vida Libre en Fuentes de Agua Natural del Municipio de Turbaco* (Tesis Licenciatura en Biología). Universidad de San Buenaventura. Colombia. pp. 63
16. Castillo de Mena, M. E., Santos Herrera, R. G., Cerna de López, M. M., Portillo de Juárez, A. M., Torres de Castillo, E. G., y Rosales Quintanilla, R. I., 2011. Amibas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de El Salvador. *Revista Crea Ciencia*, 7 (11): 6-10.
17. Castrillón, C. J., y Orozco, P. L. 2013. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista Chilena de Infectología*, 30 (2): 147-155.
18. Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J. J., Tapia-Malagón, J. L., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Tsutsumi, V. y Shibayama, M. 2008. Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico. *Revista de Investigación Clínica*, 59 (5): 342-347.
19. Chao, A., Chazdon, R., Colwell, R. y Shen, T. 2004. Un Nuevo método estadístico para la evaluación de la similitud en la composición de especies con datos de incidencia y abundancia. *Ecol. Letters*. 8 148-159.
20. Chertorivski-Woldenberg, S., Kuri-Morales, P., Fajardo-Dolci, G., Rosette-Valencia y González-Roldán, J. 2012. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (Amibas de Vida Libre)*. Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud. México, Distrito Federal. 1-49.
21. Comisión Nacional del Agua. 2020. Calidad del agua en México: Gobierno de México. Recuperado de <https://www.gob.mx/conagua/articulos/calidad-del-agua>

22. De Jonckheere, J. F. 2002. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica*, 41: 309-342.
23. De Jonckheere, J. F. y De Voorde, H, V. 1976. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Applied And Environmental Microbiology*, 31 (2): 294-297.
24. De Jonckheere, J. F., 2011. The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiology*. 7 (1): 5-7.
25. Durán, D. A., Vargas, V. A. y Cisneros, C. E. A. 2010. Técnicas no Paramétricas. En: Bioestadística. Editor Ávila, V. J. J. UNAM FES Iztacala. México. 199-202.
26. Echandi, L., Gonzáles, L. D., y Marín, R. R. 1994. Aislamiento de amibas de vida libre capaces de producir meningoencefalitis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, LXI (526): 11-14.
27. Espinoza G. L. N., Lares J. L. F., Rodríguez A. L. Z., González G. J. R., González P. F., y Lares V. F., 2018. *Naegleria lovaniensis*: la especie termofílica más abundante del género *Naegleria* en el noroeste de México. *Recursos Naturales*, 14 (2): 61-65.
28. Fernández, R., M., T. 2014. *Caracterización Molecular de Amebas de Vida Libre e Identificación de Otros Parásitos en Aguas de Red de la Provincia de Zaragoza: Asociación con Otros Microorganismos y Riesgos para la Salud Pública* (Tesis Doctoral). Universidad de Zaragoza. España. pp. 274.
29. Fields. B. S., Benson, R. F. y Besser, R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (3): 506-526.
30. Flores, E. R., Valderrama, E. R., Patiño, R. A., y Rodríguez, B. M. 2012. Calidad amebológica del agua de pozos utilizados para suministro de agua potable en el estado de Hidalgo. *Ingeniería*, 16 (3): 219-228.
31. Gallegos, N. E. M., Barrientos, J. L. Á., Estrada, R. M., Arzola, J. V., Romero, M. J. M., y Arzola, A. D. C. 2019. Primer registro de amibas de vida libre en el balneario natural "Hierve el Agua" en el municipio de San Lorenzo Albarradas, estado de Oaxaca. *Revista de Zoología*, 30: 1-11.
32. Gallegos, N. E. M., Becerra, C. J. M., Figueroa, M. M. G., Fuentes, Z. S. A., Hernández, Z. A. R., Mendoza, R. M. J., Corona, A. A. D., Avier, V. D. I. y Villa, D. G. S., 2017. Amibas de vida libre en playas de Tuxpan y Arrecife Ingeniero, Veracruz, México. *Revista de Zoología*, 29: 1-5.
33. Gallegos, N., E. M., Vázquez-Lugo, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. R. y Mayén-Estrada, R., 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: 10-25.

34. Gallegos N. E. M., 2009a. Amebas de vida libre. Aspectos clínicos de las amebas de vida libre. *Bioquímica*, 34(1): p-47.
35. Gallegos N. E. M., Sánchez R. Ma. R., Calderón V. A. y Lugo V. A. 2009b. Diversidad de Protozoos. En: Gobierno del Estado de México, *La Diversidad Biológica del Estado de México. Estudios de Estado*. México 1ra Ed: CONABIO. pp. 83-88.
36. Gallegos, N., E., M. 2009c. Medios de cultivos para amebas: *Naegleria* y *Entamoeba histolytica*. En: Aladro M. A. (ed.), *Manual de Prácticas de Laboratorio de Protozoos*. Ciudad Universitaria, México: Las Prensas de Ciencias, UNAM. pp. 31-35.
37. Gallegos, N., E., M. 1997. *Amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luis de Potosí. México D.F.* (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 132p.
38. Gama, F. J. L., Pavón, M. E. L., Ramírez, P. T. y Angeles, L. O. 2010. Factores bióticos y abióticos del ambiente acuático. En: Valdivieso, A. J. J. (ed.), *Análisis de Calidad del Agua: Relación entre factores bióticos y abióticos*. UNAM FES Iztacala, México. 56-60.
39. Garstecki, T., Brown, S. y De Jonckheere. 2005. Description of *Vahlkampfia signyensis* n. sp. (Heterolobosea), based on morphological, ultrastructural and molecular characteristics. *European Journal of Protistology*, 41: 119-127.
40. Gelman, B.B., Rauf, S. J., Vselevod, P., Chaljub, G., Nader, R., Shariq, J. R., Haring, W. N., Nauta, W. y Visvesvara, G. S. 2003. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62 (10): 990-998.
41. Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Nouir, N. B., Füchslin, H. P., Schürch, N. y Müller, N. 2009. Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Research in Microbiology*, 160(6): 367-374.
42. González-Robles, A., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M. y Martínez-Palomo, A. 2009. *Acanthamoeba castellanii*: Endocytic structures involved in the ingestion of diverse target elements. *Acta Protozoologica*, 48 (4): 327-332.
43. Guzmán-Fierros, E., De Jonckheere, J. F. y Lares-Villa, F. 2008. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79: 1-5.
44. Han, K., L., Lee, H., J., Shin, M., H., Shin, H., J., Im, K., I. y Park, S., J. 2004. The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol Research*. 94: 53-60.

45. Hernández, J. C., Orihuela, D. L., Pérez-Mohedano, S., Marijuan, L. y Furet, N. R. 2003. Efecto de la modificación del pH sobre la lixiviación de cationes en columnas de suelos calizos. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo*. 7: 99-104.
46. Jarolim, K., L., McCosh, J., K., Howard, M., J. y John, D., T. 2000. A light microscopy study of the migration of *N. fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amoebic meningoencephalitis in mice. *Journal of Parasitology*. 86: 50-55.
47. Jercic, L. M. 2007. Amibas de vida libre género *Acanthamoeba*. *Revista Chilena de Infectología*, 24 (6): 491-492.
48. Kemble, S. H., Lynfield, R., DeVries, A. S., Drehner, D. M., Pomputius III, W. F., Beach, M. J., Visvesvara, G. S., da Silva, A. J., Hill, V. R., Yoder, J. S., Xiao, L., Smith, K. E. y Danila, R. 2012. Fatal *Naegleria fowleri* infection acquired in Minnesota: possible expanded range of a deadly thermophilic organism. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (6): 805-809.
49. Khan, N., 2008. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 1051-1057.
50. Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J. R., Frazer, D. G. y Matheson, M. 2004. *Acanthamoeba* Keratitis: The role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45 (1): 165-169.
51. Kobayashi, S., Tsukadaira, A., Kobayashi, S., Izumiyama, S. y Yoon, H. 2015. Amoebic encephalitis in a farmer. *Royal College of Pathologist of Australasia*. 47 (7): 720-722.
52. Lares-Jiménez, L. F., Gámez-Gutiérrez, R. A. y Lares-Villa, F. 2015. Novel culture médium for the axenic growth of *Balamuthia mandrillaris*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82: 286-288.
53. Lares-Jiménez, L. F. y Lares-Villa, F. 2009. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5 (2): 161-167.
54. Lares-Villa, F. 2001. Free living amoebic infections in Mexico. *En: Proceeding of IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae*. Paris, France. John Libbey Eurotext.
55. Lares-Villa, F., De Jonckheere, J., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreria-Guerrero, E., Fernández-Quintanilla, G., Ruíz-Matus, C. y Visvesvara, G. 1993. Five Cases of Primary Amoebic Meningoencephalitis in Mexicali: Study of the Isolates. *J. Clinical of Microbiology*. 31 (3): 685-688

56. Madrigal-Sesma, M. J., Contreras-Ferrandiz, M. y Martínez-Grueiro, M. 1983. Aislamiento, identificación y patogenia de amebas de vida libre en aguas de consumo de Madrid. *Revista Ibérica de Parasitología*, 46 (3): 219-221.
57. Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (2): 273-307.
58. Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. A. 2007. The immune response to *Naegleria fowleri* amoebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunology Medical of Microbiology*, 51: 243-259.
59. Marciano-Cabral, F., MacLean, R., Mensah A. y LaPat-Polasko, L. 2003. Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Applied And Environmental Microbiology*, 69 (10): 5864-5869.
60. Marciano-Cabral, F., Patterson, M., John, D. T. y Bradley, S. G. 1982. Cytopathogenic of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *Journal Parasitology*, 68 (6): 1110-1116.
61. Maritschnegg, P., Sovinz, P., Lackner, H., Benesch, M., Nebl, A., Schwinger, W., Walochnik, J. y Urban, C., 2011. Case reports: granulomatous amebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal Antimicrobial Therapy and Hyperbaric Oxygen. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (1): 446-448.
62. Maciver, S., 2003. *Vermamoeba*. University of Edinburgh. United Kingdom. Recuperado de: <https://maciverlab.bms.ed.ac.uk/Vermamoeba.htm>
63. Martínez, C. M., Cárdenas, Z. R., Coronado, V. D., Debnath, A., Serrano, L. J. y Shibayama, M. 2016. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *Journal of Medical Microbiology*, 65: 885- 896.
64. Martínez, D., Y., Seas, C., Bravo, F., Legua, P., Ramos, C. y Cabello, A., M. 2010. Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. *Clinical Infectology*. 51: 7-11.
65. Matin, A., Siddiqui, R., Jayasekera, S. y Khan, N. A. 2008. Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Journal of Medical Microbiology*, 21 (3): 435-448.
66. Newsome, A. L., Scott T. M., Benson, R. F. 1998. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. *Applied and Enviromental Microbiology*, 64 (5): 1688-1693.
67. Norma Oficial Mexicana NOM-AA-14-1980, cuerpos receptores. - muestreo. Diario Oficial de la Federación [Disponible en línea]: <https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2011/01/nmx-aa-014-1980.pdf>. Consultado en: marzo del 2015.



68. Oddó, B. D. 2006. Infecciones por amibas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*, 23 (3): 200-214.
69. Omaña-Molina, M., Vanzzini-Zago, V., Hernandez-Martinez, D., Gonzalez-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Ramirez-Flores, E., Oregon-Miranda, E., Lorenzo-Morales, J. y Martinez-Palomo, A. 2015. *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. *Parasitology of Research*. 115 (2): 873-878.
70. Ortiz, R., Bonilla. P., Monsalvo. R., A., y Eslava C. C. 2012. Detección de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* por PCR en cuerpos de agua recreativos en el Estado de San Luis Potosí, México. *Biología, Ciencia y Tecnología (BioCyT)*, 5 (19): 358-365.
71. Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture*. Freshwater biological association scientific publication, Londres. 122p
72. Page, F. C. 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of new species and a key to genera. *Archiv für Protistenkunde*. 116: 149-184.
73. Page, F. C. 1976. Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with Descriptions of Three Species. *Journal of the Protozoology*. 14 (4): 724-726.
74. Page, F. C. 1967. Taxonomic Criteria for Limax Amoebae, with Descriptions of 3 New Species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *Journal of the Protozoology*. 14 (3): 499-521.
75. Peralta, M., Yahara, M., y Lima Garcia, R. H., 2017. *Amebas de Vida Libre en las Pozas de los Baños Termales de Churín* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Privada Norbert Wiener. 57p.
76. Pereira, A., y Pérez, M. 2003. Amibas de vida libre. *OFFARM*, 22 (6): 114-117.
77. Pérez, I., J., Isasa, P., Barrón, J. y Martínez, I. 2005. Queratitis por *Acanthamoeba*. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. pp. 1-9.
78. Pierre-André, C., Wallet, F., Pringuez, E. y Pernin, P. 2001. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Applied And Environmental Microbiology*, 67 (7): 2927-2931.
79. Qvarnstrom, Y., da Silva, A., J., Schuster, F. L., Gelman, B., B., y Visvesvara, G. S. 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 199: 1139-1142.

80. Ramírez, E., Robles, E., Sainz, Ma. G., Ayala, R. y Campoy, E. 2009. Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25 (4): 247-255.
81. Reilly, M. F., Marciano-Cabral, F., Bradley, D. W. y Bradley, S. G. 1983. Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 17 (4): 576-581.
82. Riestra, J., Riestra, R., Gonzáles, A., Moreno, P., Martínez, J., Visvesvara, G., Careaga, F., Oropeza de Alba, J., y Cornejo, S. 1997. Granulomatous amebic encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris* (leptomyxiidae): report of four cases from México. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 56 (6): 603-607.
83. Rivera, F., P. Ramírez, G. Vilaclara, E. Robles y F. Medina. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming-pool waters in Mexico City. *Journal of Environmental Research*. 32, 205-211.
84. Rivera, A. F., Paz, M. M., Ortega, R. A., y López, O. E. 1978. Estudio biológico de amibas del grupo "Limax"; géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*. "Las amibas, orden dentro del caos". *Archivos Mexicanos de Anatomía*, 15 (3): 45-58.
85. Rivera, F., Bonilla, P. R., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández and Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air, Soils Pollution*. 74: 65-87.
86. Rodríguez, Z. J. 2009. Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto, (ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre. *Pensamiento Actual*. 9 12-13: 125-134.
87. Rodríguez, Z., S. 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. *Critical Reviews in Micrology*. 20 (3): 225-241.
88. Rojas-Hernandez S, Jarillo-Luna A, Rodriguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R. 2004. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitology Research*. 94:31-36.
89. Roy, S. L., Metzger, R., Chen, J. G., Laham, F. R., Martin, M., Kipper, S. W., Smith, L. E., Lyon, G. M., Haffner, J., Ross, J. E., Rye, A. K., Johnson, W., Bodager, D., Friedman, M., Walsh, D. J., Collins, C., Inman, B., Davis, B. J., Robinson, T., Paddock, C., Zaki, S. R., Kuehnert, M., DaSilva, A., Qvarnstrom, Y., Sriram y Visvesvara, G. S. 2014. Risk for transmission of *Naegleria fowleri* from solid organ transplantation. *American Journal of Trasplantation*, 14 (1): 163-171.

90. Seas, C., R., y Bravo, F., P. 2006. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuentemente en América Latina. *Revista Chilena de Infectología*. 23 (3): 197 – 199.
91. Siddiqui R y Khan N. 2014. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: An old Enemy presenting new challenges. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 8(8): 1-8.
92. Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004. Free-living Amoeba as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34: 1001-1027.
93. Secretaría de finanzas y planeación, gobierno del estado de Veracruz. 2017a. Sistema de información municipal, cuadernillos municipales, Orizaba. [Disponible en línea]: <http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2017/05/Orizaba.pdf>. Consultado en: agosto del 2017.
94. Secretaría de finanzas y planeación, gobierno del estado de Veracruz. 2017b. Sistema de información municipal, cuadernillos municipales, Ixhuatlancillo. (Disponible en línea): <http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2017/05/Ixhuatlancillo.pdf>. Consultado en: agosto del 2017.
95. Shakoor, S., Beg, M. A., Mahmood, S. F., Bandea, R., Sriram, R., Noman, F., All, F., Visvesvara, G. S. y Zafar, A. 2011. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (2): 258-261.
96. Sheehan, K. B., Fagg, J. A., Ferris, M. J. y Henson, J. M. 2003. PCR Detection and Analysis of the Free-Living Amoeba *Naegleria* in hot springs in yellowstone and Grand Teton National Parks. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10): 5914-5918.
97. Siemensma, F. J., *Microworld, world of amoeboid organisms*. Publicación electrónica, Kortenhoef, the Netherlands. Consultado en Noviembre 11, 2017. Disponible en: <https://www.arcella.nl/what-is-microworld/>
98. Smirnov, A. y A. Goodkov. 1999. An illustrate list of basic morphotypes of Gymnamoeba (*Rhizopoda, Lobosea*). *Journal of Protistology*. 1: 20-29.
99. Solomon, E. P., Linda R. B. y Diana W. M. 2013. Impacto sobre ecología, tecnología y comercio. En: Cervantes, G. S. R. y Eliosa, G. T (ed.), *Biología*. Cengage Learning Editores, Distrito Federal, México. 530-531.

100. Sissons, J., Kim, K. S., Stins, M., Jayasekera, S., Alsam, S. y Khan, N. A. 2005. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism. *Infection and Immunity* 73 (5): 2704-2708.
101. Suárez, H. G. 2004. *Presencia y distribución de amibas potencialmente patógenas en el Valle de Mexicali Baja California, México*. (Tesis de Maestría). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 64p.
102. Suárez, R., Espinoza, Y., Villanueva, C., Ramos J., Huapaya, P., y Marquina, R. 2002. Aislamiento de amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* a partir de fuentes de agua en la ciudad de Ica. *Anales de la Facultad de Medicina*, 63 (2): 101-105.
103. Tello, B. N., Molina, S., Esposto, S., Magistrello, P., Bustamante, J. y D'Agustini, M. 2020. Encefalitis amebiana granulomatosa por amebas de vida libre en un paciente pediátrico. *Suplemento pediatría*, 01 (1): S47-S51.
104. Tysl, T. y Dyková, I. 2018. *Sappinia* sp. (Amoebozoa: Thecamoebida) and *Rosculus* sp. (SAR: Cercozoa) isolated from king penguin guano collected in the subantarctic (South Georgia, Salisbury Plain) and their coexistence in culture. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65 (4): 544-555.
105. Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*, 60 (2012): 399-405.
106. Vélez, M. C., Zapata, A. L., Ostiz, D. C., Trujillo, M., Restrepo, A. y Garcés, C. 2013. Reporte de caso y revisión de la literatura de caso de paciente con meningoencefalitis por amebas de vida libre. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*, 17 (3): 153-159
107. Vieira A., Seddon, A. y Karlyshev, A., 2015. *Campylobacter-Acanthamoeba* interactions. *Microbiology*, 161: 933-947
108. Visvesvara, G. S. 2010. Free-Living amoebae as opportunistic agents of human disease. *Journal of Neuroparasitology*, 1. 1-13
109. Visvesvara, G. S., Moura, H. y Schuster, F. L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology Medical Microbiology*. 50: 1-26.

110. Walochnik, J., Wylezich, C., y Michel, R. 2009. The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. *Experimental Parasitology*, 126: 4-13.
111. Wylezich, C. W. 2015. Electron Microscopical Investigations of a new species of the genus *Sappinia* (Thecamoebidae, Amoebozoa), *Sappinia platani* sp. nov., reveal a dictyosome in this genus. *Acta Protozoologica*, 54: 45-51.
112. Wylezich, C., Walochnik J. y Michel, R. 2009. High genetic diversity of *Sappinia*-like strains (Amoebozoa, Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations. *Parasitology Research*. 105:869–873.
113. Yoder, J. S., Straif-Bourgeois, S., Roy, S. L., Moore, T. A., Visvesvara, G. S., Ratard, R. C., Hill, V. R., Wilson, J. D., Linscott, A. J., Crager, R., Kozak, N. A., Sriram, R., Narayanan, J., Mull, B., Kahler, A. M., Schneeberger, C., da Silva, A. J., Poudel, M., Baumgarten, K. L., Xiao, L. y Beach, M. J. 2012. Primary amebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clinical Infectious Diseases*. 55 (9): pp. e79-e85.
114. Zúñiga, C. I. y Lozano, J. C. 2011. *Balamuthia mandrillaris*: una ameba de vida libre altamente letal. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 96: 134 – 135.

# **ANEXO I**

Medios de cultivo para amibas de vida libre

Medio de cultivo agar no nutritivo con *Escherichia coli* (Medio NNE) para AVL

Los componentes del medio NNE se mezclan en seco y posteriormente se agrega el agua destilada previamente calentada, se sigue mezclando hasta la ebullición. En autoclave se esteriliza el medio a 121 °C durante 15 minutos. Al estar a una temperatura ambiente soportable para el usuario, se vierte de 15 a 20 mililitros de medio en cajas de Petri (cuadro 8).

Cuadro 8. Medio de cultivo NNE monoxénico para AVL.

Compuesto	Concentración
Cloruro de sodio (NaCl)	0.120 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.004 g
Cloruro de calcio dihidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	0.004 g
Fosfato de sodio dibásico ( $Na_2HPO_4$ )	0.146 g
Fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ )	0.136 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

## **ANEXO II**

Morfología de las amibas de vida libre



## 1.1 Morfología de las amibas de vida libre

### 1.1.1 *Acanthamoeba* spp.

Para lograr clasificar las variadas especies de *Acanthamoeba*, se usaron criterios morfológicos (Astorga, 2016; Castrillón y Orozco, 2013), identificándose 24 especies dentro de este género. De éstas solamente las siguientes especies se ha comprobado su potencial patógeno: *Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. lenticulata*, *A. lugdunensis*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. royreba* y *A. triangularis*. *Acanthamoeba polyphaga* y *A. castellanii* han sido organismos aislados frecuentemente en el ambiente (Bonilla y Ramírez, 2014).

#### a) Trofozoíto y quiste

*Acanthamoeba* tiene una medida que oscila entre 12 a 56  $\mu\text{m}$  de diámetro (Bonilla y Ramírez, 2014; Castrillón y Orozco, 2013), se caracteriza por la presencia de pseudópodos finos de tipo filópodo ó acantópodo (de ahí el nombre del género y característica diacrítica del mismo). El citoplasma (Fig. 40) contiene múltiples mitocondrias, lisosomas y vacuolas; el núcleo suele ser esférico con un nucléolo bien definido y esférico. Se reproducen por fisión binaria (Cabello-Vílchez, 2015) y la división del núcleo se realiza por mitosis, proceso en el cual la membrana nuclear y el núcleo desaparecen. Los centriolos nunca se han visto durante la interfase o división nuclear (Page, 1976). El quiste le otorga a *Acanthamoeba* una elevada probabilidad de sobrevivir en condiciones extremas inclusive por años y suele tener un diámetro de 8 a 29  $\mu\text{m}$  (Bonilla y Ramírez, 2014; Castrillón y Orozco, 2013) (Fig. 40). Una de las características del quiste es la presencia de una doble pared, la estructura está compuesta por un ectoquiste en el exterior y una interna que recibe el nombre de endoquiste, la cual contiene celulosa mayoritariamente (Cabello-Vílchez, 2015). La pared externa del quiste presenta ondulaciones mientras que la pared interna presenta un acomodo estrellado, poligonal, esférico u oval, pero siempre se observan canales que desembocan en poros al exterior los cuales están recubiertos por opérculos. El enquistamiento se da como respuesta a un entorno poco favorable y de manera artificial ocurre cuando se usan agentes desinfectantes ya sea químicos o físicos en concentraciones bajas o en periodos cortos de tiempo. También pueden resistir a bajas temperaturas (0 a 2 °C), los biocidas, cloraciones precarias y antibióticos (Marciano, 2003). Pero se ha reportado que un tratamiento con freón u óxido de metileno, además del uso de la autoclave es una forma efectiva para lograr destruir los quistes (Marciano, 2003). Aunque se haya actualizado la clasificación, para fines taxonómicos se ha mantenido el criterio empleado por Pussard y Pons, dividiendo a *Acanthamoeba* en tres grupos con base en el tamaño y diferencias en los quistes (Castrillón y Orozco, 2013).

El grupo I consiste en especies caracterizadas por quistes grandes, con endoquistes en forma estrellada y ectoquistes que pueden ser lisos o rugosos, con un diámetro promedio del quiste  $\geq 18 \mu\text{m}$ . El grupo II es el más grande, debido a que incluye a las amibas con una mayor distribución y las que han sido comúnmente aisladas. Este grupo contiene amibas con quistes  $< 18 \mu\text{m}$ , donde el ectoquiste es rugoso, mientras que el endoquiste puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado. En el último grupo, el diámetro promedio de los quistes es  $< 18 \mu\text{m}$  y el ectoquiste es delgado y ondulado mientras que el endoquiste es generalmente redondeado (Castrillón y Orozco, 2013) (Figs. 41 y 42).

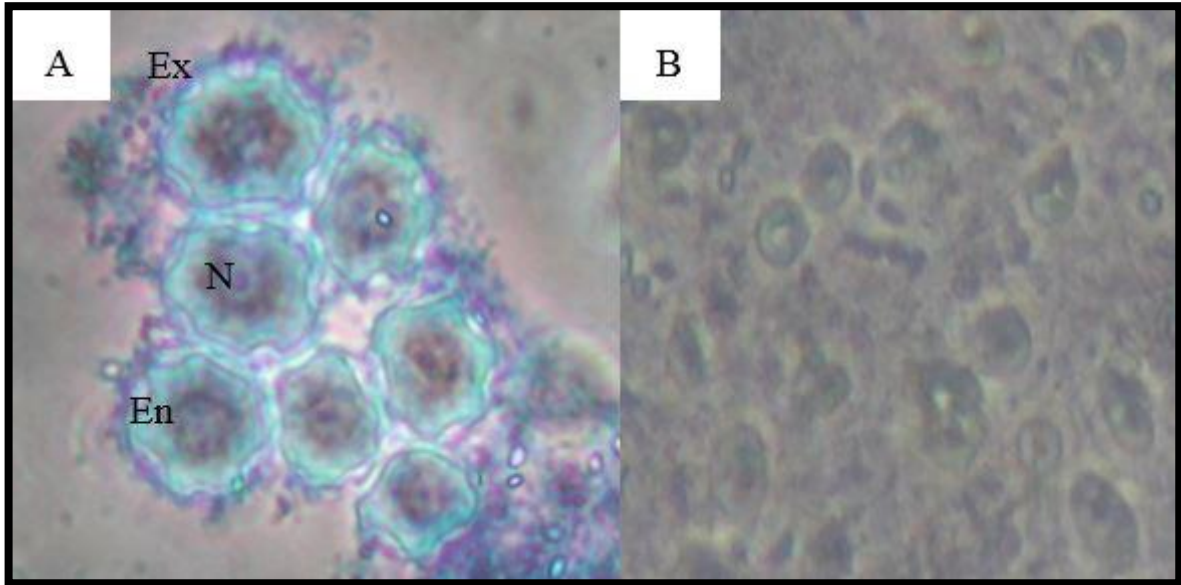


Figura 40. Micrografía de luz en contraste de fases de *Acanthamoeba castellanii* a 40X en sus dos estadios del ciclo vital. A) Quiste, se aprecia el exoquiste (Ex) y endoquiste (En), núcleo (N), preparación fresca con tinción de azul de metileno. B) Trofozoíto observada en medio NNE sin teñir (Fotografías tomadas por Chávez, 2015).

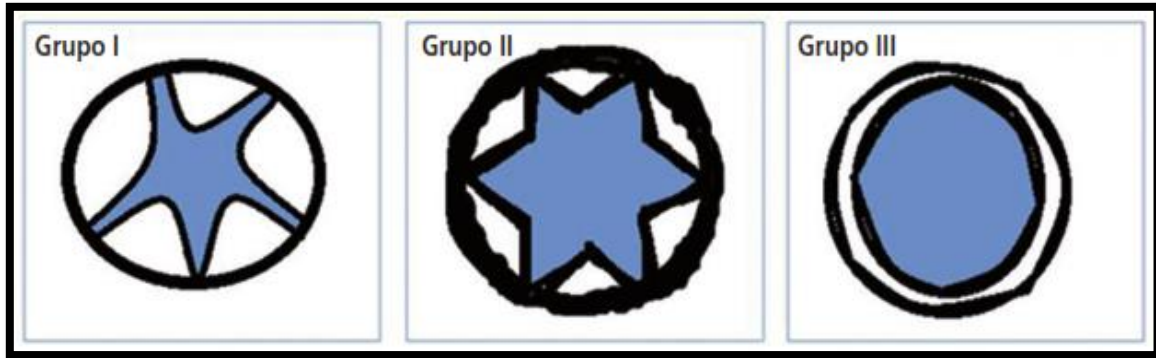


Figura 41. Esquematación de quistes de *Acanthamoeba*, con base en los criterios de Pussard y Pons (Castrillón y Orozco, 2013).

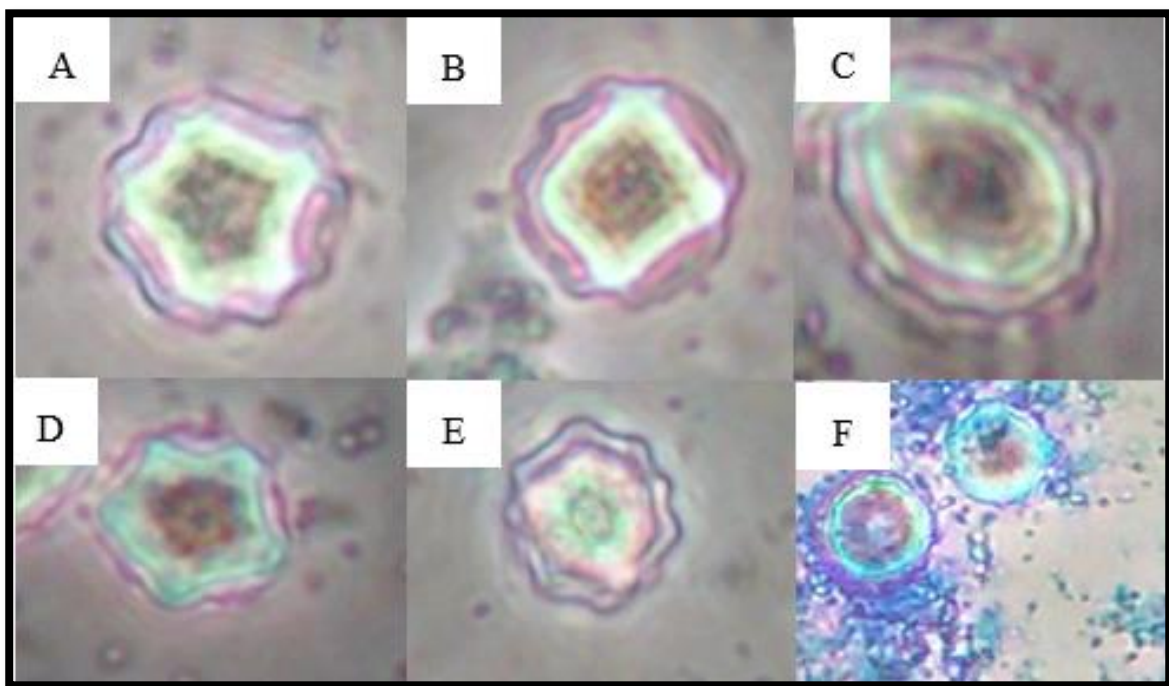


Figura 42. Clasificación de los quistes de *Acanthamoeba* bajo el esquema taxonómico de Pussard y Pons. Micrografías a 40X: A) *A. astronyxis*, B) *A. polyphaga*, C) *A. culbertsoni*, D) *A. castellanii*, E) *A. griffini* F) *Acanthamoeba* sp. (Fotografías tomadas por Chávez, 2015).

### b) Endosimbiosis con bacterias

En el caso del género *Acanthamoeba* posee la capacidad de establecer una relación de tipo simbiótica, las bacterias patógenas pueden estar dentro de la amiba sin riesgo a ser fagocitadas en su totalidad y mantenerse con vida en su interior. Algunas de las bacterias que se han encontrado dentro de estos organismos son: *Legionella* sp., *Vibrio cholerae*, *Burkholderia cepacia*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, entre otras (Trabelsi *et al.*, 2012).

### 1.1.2 *Naegleria* spp.

El género es ubicuo siendo sus hábitats el suelo y cuerpos de agua en zonas cercanas a la superficie y sustrato cercano a zonas someras, pero las especies patógenas suelen proliferar especialmente en zonas donde el ambiente ha sido perturbado. Son termófilas sobreviviendo a temperaturas incluso arriba de 45 °C (Yoder *et al.*, 2012). Dentro de las 30 especies que conforman el género, sólo una especie *N. fowleri* tiene registros de ser un patógeno que ocasiona enfermedad en el humano (Trabelsi *et al.*, 2012), pero más recientemente se ha detectado caso de infección en un lactante e individuos con quemaduras y rinitis por parte de *N. lovaniensis*, así como *N. gruberi* especie patógena en roedores (Bonilla y Ramírez, 2014; Visvesvara *et al.*, 2007).

#### a) Trofozoíto, quiste y ameboflagelado

Las dimensiones del trofozoíto van de 10 a 25 µm, este es el estado infeccioso (Fig. 43); siendo muy activo y algo tardado para ser capturado, su rápido movimiento es una característica de este organismo que ayuda a saber a qué género pertenece. La locomoción es mantenida por pseudópodos redondeados los cuales reciben la denominación de lobópodos. El citoplasma es granular con un núcleo establecido en la zona central con presencia de gránulos de cromatina y un nucléolo esférico. Su reproducción se ejecuta por fisión nuclear y el núcleo se divide por promitosis (Marciano- Cabral, 1988). El quiste presenta un diámetro de 7 a 15 µm. Los quistes son en su mayoría esféricos y algunas veces ovoides, tienen pared lisa constituida por una capa interna gruesa y otra externa más delgada, poseen de uno a tres tapones a nivel de los poros (Rivera *et al.*, 1978). A diferencia de los quistes de *Acanthamoeba*, en los quistes de *Naegleria* no resultan tan visibles las zonas de desenquistamientos (poros) (Fig. 43). El ameboflagelado es un estadio que se le considera como una respuesta para poder transportarse a través del agua, en dicha forma no se alimenta y no representa un riesgo de infección. Presenta generalmente dos flagelos, pero puede presentar hasta diez flagelos (Fig. 43) (Cuadro 9).

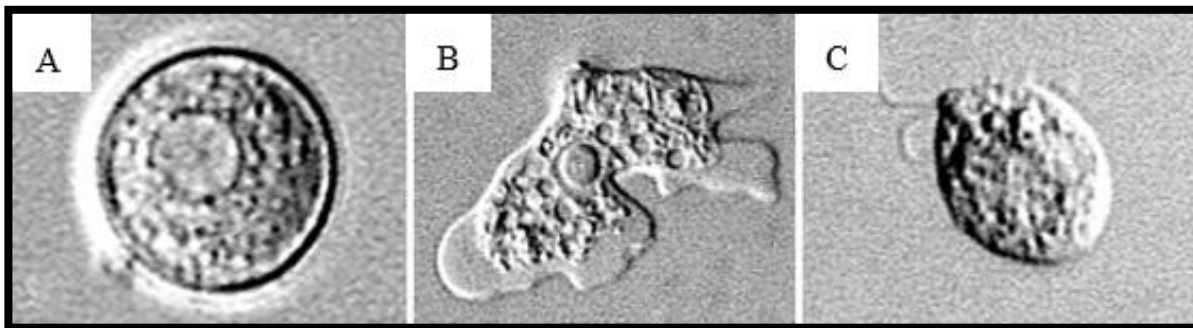


Figura 43. Fases de *Naegleria fowleri*: A) Quiste, B) trofozoíto (fase infecciosa) y C) Ameboflagelado (de transporte) (CDC, 2015).

Cuadro 9. Algunas especies del género *Naegleria* y temperaturas del medio en las cuales se han encontrado (De Jonckheere, 2002).

Especie	Autor y año	Max. °C	Estado flagelar
<i>N. gruberi</i>	Schardinger, 1899, emed. De Jonckheere.	39	Presente
<i>N. fowleri</i>	Carter, 1970	45	Presente
<i>N. jadini</i>	Willaert y Le Ray, 1973	35	Presente
<i>N. lovaniensis</i>	Stevens, De Jonckheere y Willaert, 1980	45	Presente
<i>N. australiensis</i>	De Jonckheere, 1981	42	Presente
<i>N. italica</i>	De Jonckheere, Permin, Scaglia y Michel, 1984	42	Presente
<i>N. andersoni</i>	De Jonckheere, 1988	40	Presente
<i>N. jamiesoni</i>	De Jonckheere, 1988	42	Presente
<i>N. clarki</i>	De Jonckheere, 1994	37	Presente
<i>N. galeacystis</i>	De Jonckheere, 1994	35	Presente
<i>N. minor</i>	De Jonckheere y Brown, 1995	38	Parcial
<i>N. pussardi</i>	Permin y De Jonckheere, 1996	41	Presente
<i>N. carteri</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly, 1997	45	Presente
<i>N. morganensis</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly, 1997	44	Presente
<i>N. niuginensis</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly, 1997	45	Presente
<i>N. sturti</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly, 1997	44	Presente
<i>N. robinsoni</i>	De Jonckheere and Brown, 1999	38	Sin datos
<i>N. fultoni</i>	De Jonckheere, Brown, Dobson, Robinson and Pernin, 2001	35	Presente
<i>N. chilensis</i>	De Jonckheere, Brown, Dobson, Robinson y Pernin, 2001	30	No presenta
<i>N. indonesiensis</i>	De Jonckheere, Brown, Dobson, Robinson y Pernin, 2001	38	No presenta
<i>N. tihangensis</i>	De Jonckheere, 2002	42	Presente
<i>N. pringsheimi</i>	De Jonckheere, 2002	37	Presente
<i>N. pagei</i>	De Jonckheere, 2002	37	Presente
<i>N. philippinensis</i>	En preparación, 2002	40	Presente
<i>N. lovaniensis</i> (Variante)	En preparación, 2002	45	Presente
NG597	En preparación, 2002	42	Presente
<i>Naegleria</i> sp. (antártica)	En preparación, 2002	<30	Presente

### 1.1.3 *Sappinia* spp.

Está integrado por dos especies oficialmente: *S. pedata* (Fig. 44), *S. diploidea* y varias cepas agrupadas filogenéticamente (Brown *et al.*, 2007; Walochnik y Wylezich, 2009; Wylezich y Walochnik, 2009), se tiene propuesta una tercera especie basándose en microscopía electrónica de su ultraestructura la cual recibió el nombre de *Sappinia platani* sp. nov. (Walochnik *et al.*, 2009; Wylezich *et al.*, 2015). Originalmente cuando se descubrió, fue en medios de cultivo donde se había agregado excretas de caballos, dichos medios estuvieron sometidos a parámetros medioambientales no favorables, como desecación prolongada, así como niveles altos de humedad bajo condiciones anaeróbicas (Walochnik *et al.*, 2009). Como siempre se ha aislado esta amiba de muestras de heces de animales, materia vegetal en descomposición y suelo, se creía que era coprozóica con tendencia a ser ubicua (Brown *et al.*, 2007; Walochnik *et al.*, 2009; Wylezich *et al.*, 2015). *Sappinia pedata* recibe este nombre debido a un estadio en su ciclo vital, el cual forma una especie de pedicelo que se ancla sobre el medio donde crece, proyectando el resto de su cuerpo a modo de una especie de cuerpo fructífero y antiguamente se creía que era una especie perteneciente al grupo de los hongos (Brown *et al.*, 2007) (Fig. 44).

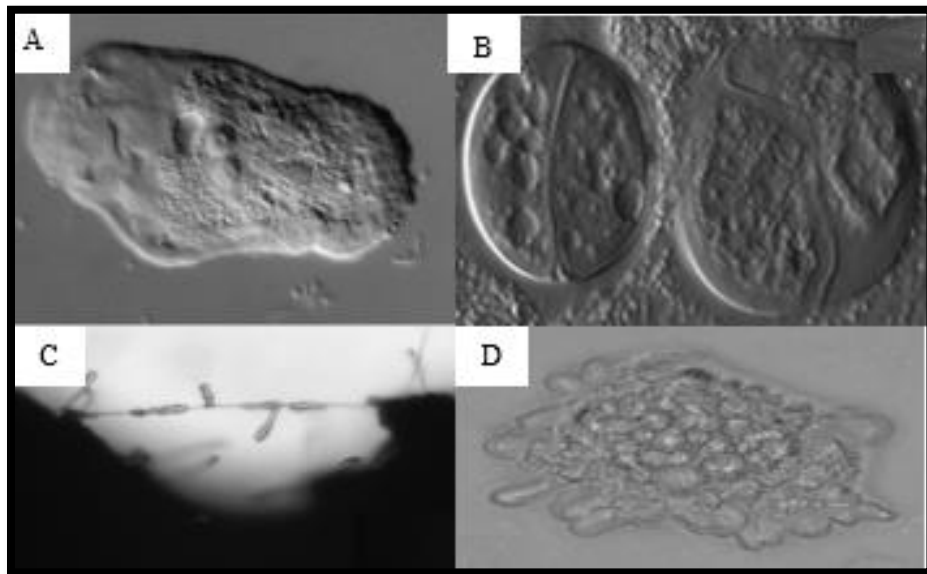


Figura 44. *Sappinia pedata*: (A) Trofozoíto binucleado, (B) Quistes con dos trofozoítos en su interior, una membrana en la zona media delimita ambos trofozoítos enquistados, (C) Trofozoítos mostrando proyecciones a modo de pedicelos, similares a algunos hongos en fase móvil, (D) Conglomerado de amibas sobre una muestra de cultivo (Brown *et al.*, 2007).

### a) Trofozoíto y quiste

Los trofozoítos miden entre 50-60  $\mu\text{m}$  de largo y de ancho oscilan de 20-30  $\mu\text{m}$ . Presentan una locomoción monopodial (Fig. 45) con un largo hialoplasma en la parte anterior de la célula y en su superficie no presentan ninguna proyección pseudopodial (Wylezich *et al.*, 2015; Walochnik *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2007). Una característica del género es la presencia de dos núcleos bien delimitados y fuertemente unidos entre sí esto gracias a la interacción de microtúbulos en la zona de contacto entre ambos núcleos (Wylezich *et al.*, 2015) (Fig. 45).

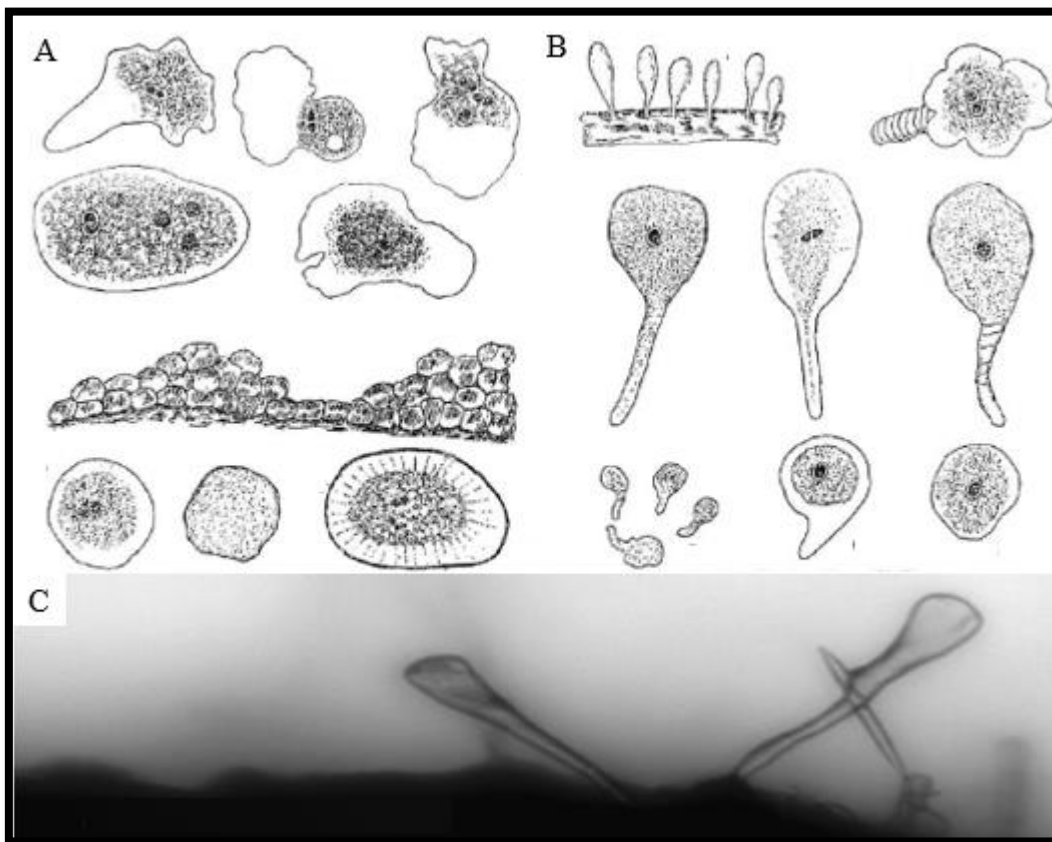


Figura 45. *Sappinia pedata*: (A) Grabado de Dangeard de 1896, locomoción del trofozoíto y disposición de los quistes en forma de conglomerados; (B) Formación del pedicelo, característica de la especie; (C) Micrografía de las formas pediceladas (Brown *et al.*, 2007; Walochnik *et al.*, 2009).

El quiste puede tener un diámetro de 18-25  $\mu\text{m}$ , otros autores mencionan que la media puede ir de 13-37 y generalmente puede tener la presencia de cuatro núcleos, esto como resultado del enquistamiento por parte de dos organismos dentro de una misma estructura de resistencia. Esta estructura además de protegerlos del entorno en condiciones no favorables, también sirve como un medio en donde pueden intercambiar material genético antes de salir del quiste (Brown *et al.*, 2007; Walochnik *et al.*, 2009; Wylezich *et al.*, 2015) (Fig. 45).

## b) Reproducción sexual

*Sappinia* es un género que posee una interesante cualidad que no manifiestan las demás amibas de vida libre hasta ahora reportadas y es la capacidad de recombinar el material genético de dos individuos entre sí para posteriormente dividirse, obteniendo por esta vía individuos con cargas genéticas diferentes (Walochnik *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2007). El proceso inicia cuando dos individuos se acoplan entre sí a forma de “copulación” y se enquistan en un solo quiste (Fig. 46).

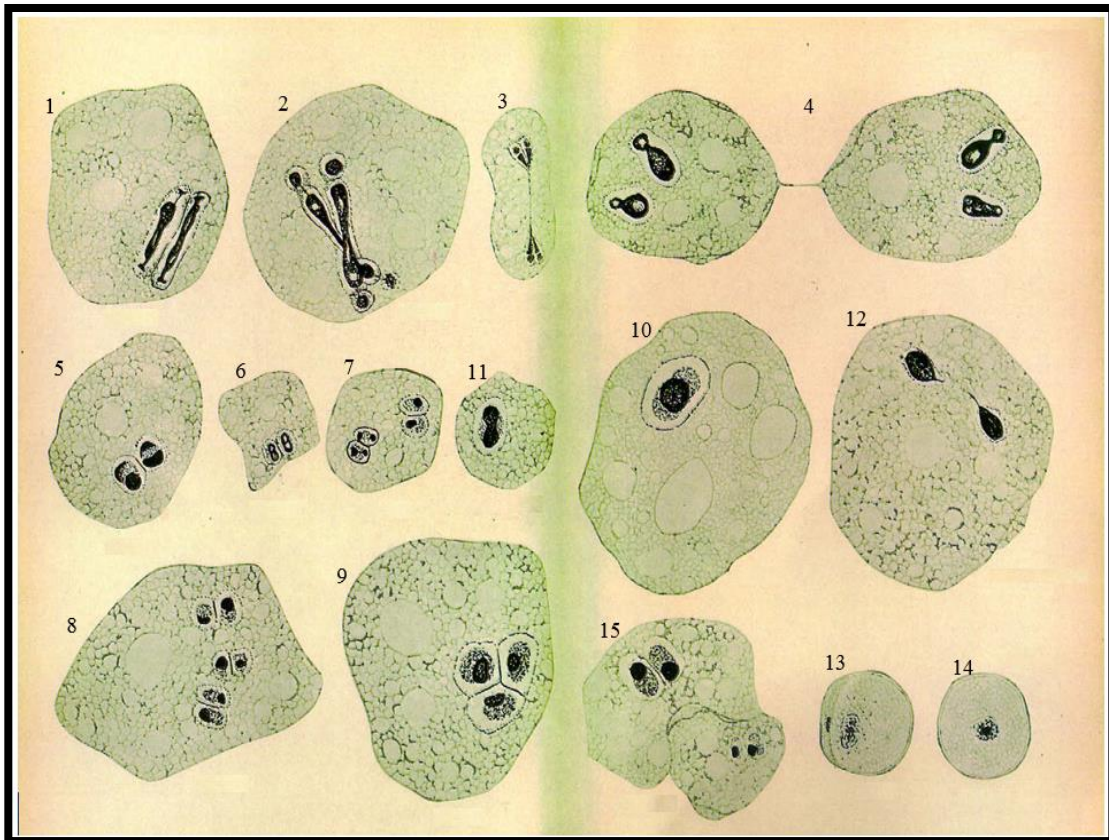


Figura 46. División celular en *Sappinia diploidea* (Nägler, 1909). División nuclear (1 al 6) estiramiento de los cariosomas (1), figura quiasmática con cromatina externa contraída (2), separación de la masa nuclear (3), división celular (4), disolución de la cromatina exterior una vez que ha finalizado la división celular (5), formación de un anillo alrededor del cariosoma (6), células multinucleadas como resultado de la división nuclear sin una posterior división celular (7 y 8), la célula trinucleada es el resultado de una división asincrónica (9), individuo uninucleado (10), célula uninucleada en división (11 a 12), quiste anormal con presencia de un gameto degenerado (13), quiste uninucleado como resultado de una fusión (14), acoplamiento copulativo entre dos trofozoítos antes de formar un quiste (15) (Walochnik *et al.*, 2009).



### 1.1.4 *Vahlkampfia* spp.

El género *Vahlkampfia* nace de las observaciones realizadas por Chatton y LaLung-Bonnaire en 1912, hechas en amibas limax que no presentaban una fase flagelada (Bonilla y Ramírez, 2014) (Fig. 47). Son un grupo de amibas ubicuas aisladas sobre plantas acuáticas, restos vegetales en estanques o lagos.

#### a) Trofozoíto y quiste

El diámetro de los trofozoítos puede ser desde 18 - 37  $\mu\text{m}$  cuando se está trasladando, el diámetro del núcleo va de 3.4 – 4.5  $\mu\text{m}$  (Page, 1967). El quiste puede o no tener una capa gelatinosa a su alrededor (Siemensma, 2016) y no presentan poros visibles (Brown y De Jonckheere, 1999) (Fig. 47). Presenta una forma circular con una línea que remarca pequeñas irregularidades en la circunferencia, a veces tiende a tomar una forma ovoide y está conformada de una sola pared, usualmente son uninucleados, pero puede presentarse una binucleación; el diámetro del quiste aproximadamente es de 8.5 – 13.5  $\mu\text{m}$  (Page, 1967).

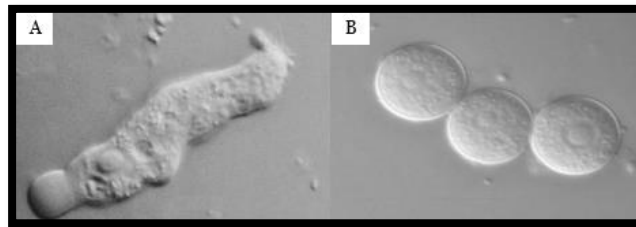


Figura 47. *Vahlkampfia signyensis*, A) Trofozoíto, B) Quistes. Imagen tomada de Garstecki *et al.*, 2005.

### 1.1.5 *Vermamoeba* spp.

Esta AVL presenta una locomoción monopodial la cual consiste en la proyección de un prominente halo hialino en dirección opuesta al movimiento del organismo, no presenta un movimiento eruptivo. El citoplasma tiene formación de varios cristales pequeños (Fig. 48).

#### a) Trofozoíto y quiste

Tiene un diámetro promedio de 12.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 48). El núcleo tiene una media de 2.5 a 4.5  $\mu\text{m}$  y en ocasiones llega a tener un diámetro de 1  $\mu\text{m}$  (Page, 1976). El quiste (Fig. 48) presenta un acomodo bilaminar de aspecto liso, redondo o ligeramente ovalado con un diámetro ligeramente inferior al trofozoíto (Astorga, 2016).

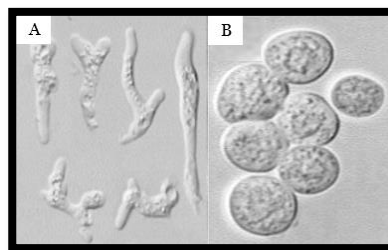


Figura 48. *Vermamoeba* spp., A) Trofozoíto, B) Quiste (Astorga, 2016).

## **ANEXO III**

Características del líquido cefalorraquídeo en infecciones por  
amibas de vida libre

Cuadro 10. Características del líquido cefalorraquídeo en condiciones normales y en infección por diferentes agentes (Chertorivski-Woldenberg *et al.*, 2012).

Cultivo	No	Bacterias	Virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	-	Amibas
Observación directa	No	-	-	-	-	-	0
Presión mg /H <sub>2</sub> O	50-200	>200	>200	>90	>200	0	>200
Proteínas	15-45	>100	60-150	>100	Normal 50-100	100-300	Aumentada
Glucosa	40-50	Baja o ausente	Normal o alta	Baja, muy baja	40-80	40-80	Baja
Tipo	Monocitos	Polimorfonucleares (PMN)	Monocitos	Monocitos PMN	Monocitos PMN	Monocitos PMN	Monocitos PMN
Células	0-10	30-50 500-1000 Incontables	100-500	>100	100-500	50-100 incontables	Aumentadas
Aspecto	Transparente	Opalino, Turbio, Purulento	Transparente, Opalino, Claro	Opalino Xantocromico	Claro, Opalino, Xantocromico	Claro, Xantocromico, Turbio, Purulento	Opalino, Turbio, Purulento
Condición	Normal	Bacteriana	Viral	Tuberculosa	Tumoral	Hygroma	Meningitis por Amibas de Vida Libre