

T
13
85

UNIVERSIDAD DE GRANADA. FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha 3 JUL 1990

ENTRADA NUM. 10421

SOBRE Acanthamoeba culbertsoni A-1

Tesis presentada para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

por el Licenciado

Javier Cifuentes Melchor

Dirigida por:

Profra. Dra. María del Carmen

Mascaró Lazcano

Prof. Dr. Antonio Osuna

Carrillo de Albornoz

Granada, 16 Junio de 1990.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

GRANADA

Nº Documento 619653037

Nº Copia 121197453

I N D I C E

	página
1.- INTRODUCCION	12
1.1.- <u>Acanthamoeba</u> como problema sanitario.	13
1.1.1.- Taxonomía.	14
1.1.2.- Morfología general a microscopía óptica.	15
1.1.3.- Microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET).	16
1.1.4.- Distribución geográfica	17
1.1.5.- Patogénesis	17
1.1.6.- Incidencia: morbilidad y mortalidad	18
1.1.7.- Manifestaciones clínicas y curso de la infección	18
1.1.8.- Diagnóstico de laboratorio	19
1.1.9.- Tratamiento	20
1.1.10.- Anatomopatología	20
1.1.11.- Medidas preventivas individuales	22
1.1.12.- Medidas de prevención colectivas	24
2.- ANTECEDENTES	27
2.1.- Sobre los factores citotóxicos producidos por <u>Naeqleria fowleri</u> y <u>Acanthamoeba spp.</u>	28
2.1.1.- <u>N. fowleri</u>	28
2.1.2.- <u>Acanthamoeba spp.</u>	33
2.2.- Sobre <u>Acanthamoeba culbertsoni</u> . Cepa A-1	39
2.2.1.- Descubrimiento. Datos morfológicos	39
2.2.2.- Caracterización isoenzimática	40
2.2.3.- Caracterización antigénica	41

2.2.4.- Estudio bioquímico en cultivo	42
2.2.5.- Afecciones humanas	44
3.- MATERIAL Y METODOS	46
3.1.- Material biológico	47
3.1.1 - <u>Acanthamoeba culbertsoni</u> , cepa A-1	47
3.1.1.1.- Cultivos amebianos	47
3.1.1.1.1.- Medio C.G.V.	48
3.1.1.1.1.a.- Composición	48
3.1.1.1.1.b.- Preparación	48
3.1.1.1.2.- Medio S.C.H.G.Y.E.M.	49
3.1.1.1.2.a.- Composición	50
3.1.1.1.2.b.- Preparación	50
3.1.1.1.3.- Medio TC 199 (GIBCO)	51
3.1.1.2.- Procedimiento de subcultivo	52
3.1.1.3.- Criopreservación	52
3.1.2.- Cultivos celulares	54
3.1.2.1.- Células Vero	54
3.1.2.1.1.- Mantenimiento en el laboratorio	55
3.1.2.1.2.- Cultivos "stock"	55
3.1.2.1.3.- Cultivos en placa de microtitulación	55
3.1.2.1.4.- Subcultivos: tripsinización	56
3.2.- Materiales	57
3.2.1.- Material de vidrio	57
3.2.2.- Frascos de un sólo uso	58
3.2.3.- Mezcla sulfocrómica	58
3.3.- Citopatogenicidad	59
3.3.1.- Cultivos sobre nitrocelulosa	60

3.3.1.1.- Microscopía electrónica de barrido	61
3.3.1.1.1.- Fijación	61
3.3.1.1.2.- Lavado	62
3.3.1.1.3.- Enjuagado	62
3.3.1.1.4.- Deshidratación previa	63
3.3.1.1.5.- Deshidratación	63
3.3.1.1.6.- Metalizado	64
3.3.1.2.- Microscopía electrónica de transmisión	65
3.3.1.2.1.- Fijación	65
3.3.1.2.2.- Lavado	65
3.3.1.2.3.- Segunda fijación	65
3.3.1.2.4.- Segundo lavado	66
3.3.1.2.5.- Deshidratación	66
3.3.1.2.6.- Inclusión en resina Spurr	66
3.3.1.2.7.- Corte y tinción	66
3.4.- Planificación y curso de las experiencias	67
3.4.1.- Cultivos amebianos en masa	67
3.4.2.- Recogida de las amebas	68
3.4.3.- Siembra sobre filtros de nitrocelulosa	69
3.4.4.- Incubación y lavado	70
3.4.5.- Concentración, purificación y estudio del factor proteico	71
3.4.5.1.- Solubilización de la muestra	71
3.4.5.2.- Medida de la concentración de proteínas	72
3.4.5.3.- Diálisis	74
3.4.5.4.- Liofilización	75
3.4.5.5.- Eliminación de los inhibidores de proteasa	76
3.4.6.- Determinación del peso molecular	77
3.4.6.1.- Preparación de los geles de poliacrilamida	77

3.4.6.2.- Preparación de la muestra	81
3.4.6.2.1.- Condiciones desnaturalizantes	83
3.4.6.2.2.- Condiciones semidesnaturalizantes y no desnaturalizantes	83
3.4.6.3.- Condiciones de corrido	84
3.4.6.4.- Tinción del gel	84
3.4.7.- Determinación del punto isoeléctrico	88
3.4.7.1.- Preparación del gel de agarosa	88
3.4.7.2.- Preparación y montaje de los electrodos	90
3.4.7.3.- Preparación de la muestra	90
3.4.7.4.- Condiciones de corrido	91
3.4.7.5.- Tinción del gel	92
3.4.8.- Ensayos de citopatogenicidad	94
3.4.8.1.- Actividad permeabilizante	95
4. RESULTADOS	
4.1.- Obtención del factor proteico	98
4.1.1.- Estudio al microscopio electrónico de barrido	98
4.1.2.- Estudio a microscopía electrónica de transmisión	115
4.1.3.- Medida de la cantidad de proteína	121
4.1.4.- Medida del peso molecular	121
4.1.5.- Medida del punto isoeléctrico	123
4.1.6.- Ensayos de citopatogenicidad	125
4.1.7.- Actividad permeabilizante	129
5.- DISCUSION	134
6.- CONCLUSIONES	156

INTRODUCCION

1.1.- Acanthamoeba como problema sanitario.

Durante la primera mitad de este siglo, las amebas hoy incluidas dentro del género Acanthamoeba fueron objeto de estudio para los protozoólogos dedicados al conocimiento de la compleja microfauna del suelo y de las aguas dulces (Cash, 1905; Alexeieff, 1912; Singh, 1950,1952,1955).

El típico aspecto de las formas quísticas, generalmente poligonales, las situó muy pronto en un encuadre taxonómico propio. Las descripciones detalladas, a veces de una sorprendente extensión, sobre su morfología, desplazamiento, modo de enquistarse y desenquistarse, llevaron a la aparición de nuevas especies descritas que fueron enriqueciendo la bibliografía sobre el género.

Este enfoque taxonómico y biológico en el estudio del género, cambió bruscamente al descubrirse su poder patógeno (Jahnes y col., 1957; Culbertson y col., 1958). El desarrollo histórico de este tema es un magnífico ejemplo de la inexistencia de fronteras entre la ciencia pura y la aplicada. Los trabajos previos sobre Acanthamoeba fueron la base que permitió el estudio de su virulencia, siguiendo las técnicas previamente desarrolladas para su aislamiento, identificación y mantenimiento en el laboratorio.

Desde estas fechas (finales de los 50 y principios de los 60) hasta nuestros días, se han desvelado muchas incógnitas y si bien es verdad que las más trascendentes permanecen veladas, ya podemos dar claramente las respuestas a las preguntas claves de

un cuestionario de parasitología clínica.

1.1.1.- Taxonomía

De acuerdo con F.C. Page (1988), la situación taxonómica del género que nos ocupa es la siguiente:

Phylum Rhizopoda.

Clase Lobosea

Subclase Gymnamoebia

Orden Acanthopodida

Familia Acanthamoebidae

Género Acanthamoeba

Especies descritas:

- A. astronoxis (Roy y Hayes, 1954).
- A. comandoni (Pussard, 1964).
- A. echinulata (Pussard y Pons, 1977).
- A. castellani (Douglas, 1930; Volkowski, 1931).
- A. mauritaniensis (Pussard y Pons, 1977).
- A. polyphaga (Puschkarev, 1913; Page, 1967).
- A. lugdunensis (Pussard y Pons, 1977).
- A. guina (Pussard y Pons, 1977).
- A. rhysodes (Singh, 1952).
- A. divionensis (Pussard y Pons, 1977).
- A. griffini (Sawyer, 1971).
- A. triangularis (Pussard y Pons, 1977).
- A. tubiashi (Lewis y Sawyer, 1979).
- A. hatchetti (Sawyer, Visvesvara y Harke, 1977).

- A. palestinesis (Reich, 1933).
- A. culbertsoni (Singh y Das, 1970).
- A. lenticulata (Molet y Eirmolieff-Braun, 1976).
- A. royreba (Willaert, Stevens y Tyndall, 1977).

Una descripción detallada de las características que permiten la inclusión en los distintos taxones puede hallarse en la publicación de 1987 de De Jonckheere, en la publicación de 1988 de Page, uno de los mejores especialistas actuales en taxonomía de Gymnamoebidos, o en trabajos anteriores del mismo autor (1974, 1976).

1.1.2.- Morfología general a microscopía óptica.

- Trofozoito.

En él se observa una clara diferencia entre ecto y endoplasma. El desplazamiento se produce mediante acantópodos. Subseudópodos. Núcleo único. Nucleolo central. Cromatina nuclear en forma de halo.

- Quistes uninucleados.

Su forma es cuadrangular, pentagonal, triangulares o redondeados. Con exo y endoquiste que en sus zonas de contacto presentan poros u ostiolos, provistos de un tapón mucoso y opérculos.

El estudio de la morfología quística, mediante tinciones

específicas, ha sido durante algún tiempo criterio básico para la identificación específica, en base a la metodología y taxones desarrollados por Pussard y Pons en 1977

- División nuclear.

Por metamitosis. Posee una centrosfera fundamentalmente céntrica, similar al centriolo durante la división celular, aunque no se parece a un centriolo a microscopía electrónica. Los trofozoitos "jóvenes" solo tienen una centrosfera, los más "viejos", dos o más (Pussard, 1972).

1.1.3.- Microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET).

Las amebasi se adhieren firmemente a la pared del tubo de cultivo. Forman una monocapa celular. La superficie muestra irregularidades y arrugas de la membrana celular. Los quistes muestran claramente los ostiolos u opérculos, la forma geométrica y otros detalles.

Al MET se observa la presencia de numerosas mitocondrias, vacuolas alimenticias y pulsátiles, abundante retículo endoplásmico rugoso, cariosoma central denso y nucleoplasma claro (Rondanelli y col. 1976,1987).

1.1.4.- Distribución geográfica.

Cosmopolitas. Ubicuas. Suelos, aguas dulces, aguas salobres y marinas.

1.1.5.- Patogénesis.

Además de en el hombre y en animales de laboratorio, se han descrito acantamebiasis en una amplia gama de animales, en el búfalo de agua (Dwivedi y Singh, 1964), en el toro (McConnel y col., 1968), en perros (Ayers y col., 1972), castores (Müller, 1973), reptiles (Frank y Bosch, 1972), peces (Taylor, 1977), etc.

En ellos, las lesiones y tejidos invadidos son sumamente diversos. En el hombre, la infección más grave es la Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA), con afección del sistema nervioso central. Las queratitis amebianas, generalmente facilitadas por heridas traumáticas (Nagington y col., 1974), picaduras (Hamburg, 1980) o por el uso de lentes de contacto (Baun y Albert, 1985), con unos 100 casos publicados, tienen una incidencia cada vez mayor.

La vía de invasión y penetración en el organismo es probablemente hematógena. Se sospecha un foco primario en piel o pulmón. Los cambios neuropatológicos son los de una encefalitis granulomatosa crónica, con células gigantes multinucleadas, sobre todo en las estructuras de la fosa posterior, base de los hemisferios cerebrales y cerebelo. En las lesiones se encuentran tanto trofozoitos como quistes (Martínez, 1987a).

1.1.6.- Incidencia: Morbilidad y Mortalidad.

Es muy baja. No todas las especies y/o cepas tienen capacidad patógena. Si bien forman parte de la flora nasal "normal" de individuos "sanos" (Cerva y col., 1973; Lawande y col., 1979), se precisan factores predisponentes para su establecimiento en el organismo y el desarrollo en tejidos.

Se describen unos tres o cuatro casos anuales de afección cerebral, la mayoría en Estados Unidos. Martínez, en su última revisión (comunicación personal), hace una relación de 48 casos bien descritos.

Si bien es un punto a discutir que Acanthamoeba sea un típico ejemplo de parásito oportunista, aparece claro que la mayoría de los pacientes reunían "factores de riesgo" tales como: úlceras cutáneas (Martínez, 1980; Ringsted y col., 1979), alcoholismo (Hoffman y col., 1978), Hodking (Jager y Stamm, 1972), neumonitis (Martínez y col., 1980), S.I.D.A. (Anail, 1989), etc.

1.1.7.- Manifestaciones clínicas y curso de la infección.

El periodo de incubación de la EGA es desconocido. Se supone que se precisan semanas o meses para que la enfermedad se establezca. El curso clínico puede ser prolongado.

El cuadro clínico es similar al de una o varias lesiones en el cerebro. Signos neurológicos de aparición temprana, hemiparesis, convulsiones, dependiendo de la zona invadida. Un

síntoma predominante es la alteración del estado mental. En la mitad de los casos se presentan cefaleas insidiosas, así como fiebre esporádica no elevada. En un 40% de los casos se produce rigidez nuchal. Otros síntomas no constantes son las náuseas, vómitos y letargia. Entre otros síntomas aparece diplopia, Babinski, alucinaciones, nistagmo, anisococia, afasia, etc.

El pronóstico es fatal y la muerte se atribuye a bronconeumonía, o fallo hepático o renal con o sin septicemia. Para una revisión sobre el tema puede consultarse A.J. Martínez (1987a).

Las queratitis por Acantamoeba se confinan solo a la córnea, en general no responden a la medicación usual, por lo que la solución más práctica, tras el diagnóstico, es realizar un trasplante. Son queratitis necrotizantes agudas o subagudas con focos de infiltración granulomatosa (Martínez, 1987a). Las amebas (trofozoitos y quistes) se localizan sobre todo en el estroma corneal, en la membrana de Descemet. En animales de experimentación se ha descrito una reacción inflamatoria en el nervio óptico (Schfaegel y Culbertson, 1972).

1.1.8.- Diagnóstico de laboratorio.

Se realiza por estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR), preferiblemente centrifugado a bajas revoluciones y examinado al microscopio con iluminación adecuada o contraste de fases. El cultivo del LCR es importante para un diagnóstico definitivo. El LCR puede mostrar linfocitosis.

Resulta indicada en ciertos casos la realización de una biopsia cerebral, a fin de excluir otras etiologías como la infección por Herpes simplex, que pueden tener tratamiento. Un corte de una muestra congelada y teñida con hematoxilina - eosina, puede facilitar un diagnóstico a los pocos minutos (Martínez, 1983).

En pacientes que han fallecido de EGA se han podido visualizar trofozoitos y quistes de Acanthamoeba, a partir de ulceraciones cutáneas.

En casos de queratitis amebianas, las amebas pueden aislarse de las lesiones corneales (Pernin y col., 1989).

1.1.9.- Tratamiento.

Solo dos o tres pacientes han sobrevivido a la EGA y la mayoría de los casos se han diagnosticado postmortem. Se han estudiado numerosos fármacos, tanto in vivo como in vitro, pero el enquistamiento de las amebas en los tejidos dificulta la terapia, y si bien algunos fármacos protegen a los animales de laboratorio frente a la infección experimental, no hay pruebas de que lo mismo suceda con los seres humanos.

1.1.10.- Anatomopatología.

La infección por Acanthamoeba puede conducir a distintos tipos de enfermedades. Por una parte, la EGA típica que se caracteriza por necrosis hemorrágica del SNC e inflamación

crónica con reacción celular de células gigantes multinucleadas. Por otra, la forma indolente, más rara, caracterizada por encefalitis necrotizante con una reacción inflamatoria mínima, subaguda y sin reacción granulomatosa.

En la EGA los hemisferios cerebrales y el cerebelo se caracterizan por presentar focos hemorrágicos. Las leptomeninges aparecen congestionadas, opacas y se adhieren a la capa molecular del cortex cerebral. El diencéfalo, el tálamo profundo y otros ganglios basales están afectados a menudo, mostrando numerosos focos de necrosis hemorrágica.

En general, las amebas progresan centrífugamente, de la materia gris profunda a la superficie o córtex cerebral. Tanto trofozoitos como quistes aparecen dispersos en las lesiones (Martínez, 1987b).

Las afecciones oculares por Acanthamoeba se caracterizan por dar lugar a queratitis agudas o subagudas, necrotizantes y con reacción inflamatoria granulomatosa (Samples y col., 1984). La conjuntiva puede mostrar un proceso congestivo y una inflamación aguda o subaguda. Las amebas (trofozoitos y quistes) pueden aislarse en una biopsia corneal.

Cuando Acanthamoeba se desarrolla en la piel o en superficies mucosas, puede apreciarse una reacción granulomatosa crónica, existiendo en las lesiones tanto trofozoitos como quistes (Martínez, 1982).

1.1.11.- Medidas preventivas individuales.

La ubicuidad de Acanthamoeba spp. y la relativa facilidad con que se aislan cepas patógenas del medio ambiente, contrastan con la escasa incidencia de afecciones en el hombre. Todo lleva a pensar en la existencia de una cierta inmunidad natural en el hombre y los animales. Distintos autores (Elridge y Tobin, 1967; Cursons y col., 1980; M.R.C. Symposium, 1977) han estudiado la presencia de anticuerpos frente a Acanthamoeba en el suero de individuos normales.

Parece claro que por distintas vías se desarrolla un cierto grado de inmunidad en el hombre debido, sin duda, al contacto con amebas, a lo largo de su vida. En animales de experimentación, ya Culbertson (1971) demostró que los ratones inoculados intraperitonealmente con Acanthamoeba, estaban bastante protegidos frente a la inoculación intranasal con Acanthamoeba culbertsoni.

El estudio de los factores de predisposición a la EGA, lleva a concluir que en la mayoría de los casos, suele ser la presencia de otras enfermedades o la inmunodepresión yatrogénica o adquirida, por lo que este tipo de pacientes (irradiados, transplantados, SIDA, quimioterapia prolongada con antibióticos, etc.), constituyen la población de más alto riesgo, que debería permanecer alejada de las posibles fuentes de acantamebiasis.

Muy probablemente, el diagnóstico previo de una amebiasis cutánea o pulmonar podría evitar, caso de existir un tratamiento

efectivo, la difusión de las amebas al SNC.

Para las queratitis amebianas si existen recomendaciones profilácticas claras. En primer lugar, el conocimiento del riesgo que implica el lavado con agua, que puede contener acantamebas, de un ojo lesionado, pues esta ha sido la vía de infección en muchos de los casos descritos.

Otro aspecto es el relativo a las queratitis relacionadas con el empleo de lentes de contacto blandas, que empezaron a diagnosticarse en 1984 y continúan apareciendo a ritmo creciente. Un 64% de los afectados en Estados Unidos, mantenían las lentillas durante la noche, en una solución salina preparada disolviendo tabletas en agua destilada (Stehor-Green y col., 1989), concluyéndose que estas soluciones "caseras" son un factor de riesgo importante. Aún más arriesgado es enjuagar las lentillas en agua del grifo, de la que se aíslan acantamebas con relativa frecuencia (Larkin y Kilvington, 1989)

Este problema ha llevado al desarrollo de una serie de estudios que tratan fundamentalmente de determinar:

- A qué materiales se adhieren las amebas con mayor facilidad.
- Qué productos pueden emplearse para el lavado o desinfección de las lentillas, con fuerte acción amebicida.

Al ser la incidencia de las queratitis amebianas superior a la de la EGA, la mayoría de los trabajos científicos se ha encaminado en esa dirección, donde la población de alto riesgo es cada vez más numerosa. Así se recomienda:

- No usar las lentillas si se produce una lesión ocular, por pequeña que sea y mientras ésta persista.

- Utilizar para el lavado de las lentillas soluciones comerciales estériles y cuidando evitar que se contaminen.

- No usar las lentillas en la ducha o durante los baños en piscinas, ríos, etc.

- Desinfectar las lentillas con la frecuencia recomendada.

1.1.12.- Medidas de prevención colectivas.

Encaminadas a la eliminación de las amebas de las aguas destinadas al baño o al consumo. Su acumulación en ellas puede tener graves consecuencias, sobre todo en el caso de Naeqleria.

Por otra parte, los requerimientos de Naeqleria son más estrictos, solo se desarrolla en aguas dulces y las cepas patógenas suelen ser termófilas, no tolerando las bajas temperaturas.

Acanthamoeba, sin embargo, vive en aguas dulces, salobres y marinas, hay cepas que viven hasta a 56 °C, y otras que se han aislado de agua mde deshielo y pueden sobrevivir a -10 °C. No es sorprendente pues que el establecimiento de medidas preventivas plantee problemas a menudo difíciles de solventar.

El estudio llevado a cabo por Brown y Cursons (1987) sobre la

influencia de concentraciones crecientes de NaCl, en las poblaciones de Acanthamoeba castellani y Acanthamoeba culbertsoni, demuestra claramente que estas amebas sobreviven incluso a concentraciones del 1.5%, lo que representa unos 10 000 mg/l de iones Cl y unos 6400 mg/l de Na+.

Las medidas profilácticas aplicables a las piscinas se han centrado sobre todo en el control de Naegleria fowleri. No obstante, diversos autores han evaluado comparativamente la resistencia de Acanthamoeba. Los factores a tener en cuenta al aplicar estas medidas son los siguientes:

- La existencia de fases quísticas, "de reposo" altamente resistentes a agentes físicos y químicos.
- La influencia que pueden tener sobre ciertos desinfectantes, y en especial el cloro algunos factores medio-ambientales (tales como cantidad de materia orgánica en el agua, temperatura y horas de insolación).
- Los materiales de que está construida la piscina, objetos sumergidos, escaleras, tierra próxima, etc.
- Las medidas higiénicas que han de imponerse a los usuarios.

En este contexto se ha determinado que:

- Los quistes de A. culbertsoni no se inactivan a concentraciones de cloro de 40 mg/l (De Jonckheere y Van De

Voorde, 1976).

- El dióxido de cloro es más efectivo como desinfectante frente a Acanthamoeba spp. (Cursons y col., 1980), forma un residuo estable que es activo a pH básico. Desafortunadamente es poco estable en solución y explosivo en estado gaseoso.

- Los compuestos de amonio cuaternario, como el Deciquan 2229 (QAC), son amebicidas unas 20 veces más potentes que el cloro. Su alta actividad amebicida se cree es debida a la sensibilidad de la membrana plasmática amebiana frente a los agentes tensoactivos. El QAC no reacciona con el agua y se inactiva en aguas duras (Cursons y col., 1980).

- El Baquacil (PHMB) es un potente amebicida frente a Acanthamoeba, en condiciones similares a las que se dan en una piscina (demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de unos 1.2 mg/l), pero no en condiciones de mayor polución (DBO = 4.7 mg/l). Se precisan, de todos modos, concentraciones de unos 50 mg/l y no es tóxico para las formas quísticas. Por otra parte, parece claro que con el tiempo, se va desarrollando resistencia en las amebas, que lleva a pensar que estas cepas resistentes aparecerían fácilmente en la naturaleza.

ANTECEDENTES

2.1.- Sobre los factores citotóxicos producidos por *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* spp.

En el estudio de las sustancias citotóxicas producidas por amebas anfizoicas, se aprecian dos enfoques bien distintos, uno encaminado al análisis de aquellos factores que son liberados al medio, y otro el de los agentes que se obtienen a partir de extractos amebianos.

En ambos aspectos se ha trabajado tanto con *Naegleria* como con *Acanthamoeba*, por lo que trataremos de describir brevemente las investigaciones realizadas y los resultados más importantes que se han obtenido.

De la revisión bibliográfica realizada se desprende que la mayor parte de los trabajos se encaminan al estudio de factores hemolíticos y fosfolipasa A, estando la mayoría de basados en el estudio de la interacción ameba-célula, o en el de la acción sobre células de homogenados o extractos amebianos.

2.1.1.- *N. fowleri*

De todas las especies del género, *N. fowleri* ha sido la más empleada en estudios experimentales. Existen muchas cepas patógenas y es un organismo fácil de mantener en medios axénicos.

Los primeros trabajos sobre su patogenicidad, muy probablemente basados en estudios similares con E. histolítica, comenzaron a publicarse a principios de los 80, y a partir de ellos se constató la existencia de una potente capacidad citolítica "in vitro" (Marciano Cabral y col., 1982; Marciano Cabral y John, 1983).

Con el pensamiento de que los mecanismos que conducen a la lisis celular "in vitro", serán los mismos que dan lugar a la destrucción masiva de tejidos observada en las infecciones humanas y animales, una serie de autores (Brown, T., 1978; Marciano Cabral y col., 1982; Marciano Cabral y John, 1983), mantienen la hipótesis de que la citopatogenicidad de Naegleria es un fenómeno exclusivamente dependiente del contacto con la célula "blanco", especulándose ya en estos años sobre la existencia de una estructura especializada que se encargase de la succión.

Lowrey y McLaughlin (1984), caracterizan parcialmente la actividad hemolítica asociada a lisados de trofozoitos amebianos. Lo más notable de este trabajo es el descubrimiento de la existencia de tres actividades hemolíticas diferentes, dos de las cuales al menos, actúan "in vitro" de forma sinérgica, siendo una de ellas debida a una proteína básica.

En 1985 profundizan en este estudio, planteando la hipótesis de que está asociada a membrana y lo confirman mediante el empleo de técnicas de centrifugación isopícnica, de modo que identifican la superficie de membrana como el principal lugar de la actividad

citolítica. Este hallazgo presenta el interés de indicar que la superficie de membrana de esta ameba juega un papel crucial en la lisis celular.

Los estudios morfológicos de la interacción entre las amebas y varias líneas celulares de mamíferos, indican que es necesario el contacto para que se produzca la muerte celular (Brown, T., 1978; John y col., 1984; Marciano Cabral y col., 1982). Sin embargo, si antes de realizar las pruebas de citotoxicidad se tratan los trofozoitos con medicamentos antiamebianos, se evita la muerte de las células a pesar del estrecho contacto entre amebas y células (Brown, T., 1978).

Aunque no es esencial para que se produzca la citolisis inducida por la superficie de la membrana, la adición de una fracción de medio que contenga liposomas incrementa la actividad citotóxica de forma proporcional a su concentración. Esta observación sugiere que la citolisina de la superficie de la membrana puede activarse durante la acción citopatógena de N. fowleri. Ello da pie a la hipótesis de la interacción entre los componentes hemolíticos de la superficie de la membrana y los de localizaciones intracelulares. Esto puede deberse a una alteración específica de la superficie membranal o a la inactivación de un inhibidor de la citolisina.

El incremento de la actividad citotóxica obtenido tras la tripsinización de las amebas, sugiere que la actividad proteolítica de la citotoxina o su precursor (protoxina), puede ser responsable del aumento de la actividad de los homogenados.

Otros autores han abordado el estudio de la producción de fosfolipasa A (Chang, S.L., 1979; Cursons, Brown y Keys, 1978) y de esfingomielinasas (Hysmith y Franson, 1982a y 1982b) no correlacionándose en este último caso con la citopatogenicidad. Las fosfolipasas A, poseen actividad citolítica (Sheir, T.W., 1982), por su capacidad de producir dos agentes desestabilizadores de la membrana; ácidos grasos libres y lisolecitina.

Fulford y Marciano Cabral (1986), apoyándose en los trabajos de Hysmith y Franson (1982a y 1982b) que demuestran que una de las actividades de fosfolipasa A es Ca^{++} dependiente, determinaron que la adición de EDTA, reduce la actividad citolítica de la fracción soluble, postulando que la fosfolipasa A puede actuar dañando la célula blanco, de forma que permita la actuación posterior de otros factores citotóxicos. Detectan también actividad de fosfolipasa C en la fracción soluble, actividad que tras el tratamiento con calor disminuye, a la vez que la acción citotóxica, mientras que la actividad de la fosfolipasa A no se altera a 50 °C.

Si se reduce la actividad de ambas fosfolipasas (A y C), lo hace a su vez la actividad citotóxica, pero no desaparece por completo. Tras todas estas investigaciones, permanece aún la incógnita del papel jugado por los factores citolíticos antes citados, en la patogenicidad de Naeqleria "in vivo".

Al tratar este tema, es preciso hacer referencia al material citopatógeno presente en los lisados de Naeqleria fowleri y

Naeqleria gruberi, capaz de autorreplicarse, que fue detectado por Schuster (1969), al cual se han dedicado una serie de estudios. Este material biológicamente activo, al que denominaron NACM, se encontró en el curso de unos trabajos sobre un agente viral presente en los cultivos amebianos.

Las alteraciones morfológicas producidas en las células por el NACM (Dunnebacker & Schuster, 1971; Schuster & Dunnebacker, 1974 a,b), difieren claramente de las que se derivan de la acción fagocítica o de las debidas a los agentes citopatogénicos mencionados anteriormente. Esta citopatología, fácilmente observable "in vivo" a microscopía óptica, sirve de base para la identificación y cuantificación del NACM (Dunnebacke & Schuster, 1974, 1977, 1985).

La respuesta citopatogénica al NACM es lenta, apareciendo a los 4-7 días, transcurridos los cuales, las células se redondean y lisan en unas 12 a 24 horas. Lo más sorprendente es que los estudios previos le atribuían propiedades de agente infeccioso, ya que el paso de fracciones del sobrenadante de cultivos dañados a otros cultivos, iniciaba en ellos el mismo proceso, incrementándolo incluso (Dunnebacke & Schuster, 1971, 1974, 1977, 1985; Schuster & Dunnebacke, 1974 b).

Todo parece indicar que la acción del NACM se inicia en las células y se difunde en ellas por multiplicación, actuando en realidad sobre la progenie de las células originales, entre 4 y 7 días más tarde.

Su naturaleza proteica fue determinada en 1977 (Dunnebacke & Schuster, 1977), confirmándose la ausencia de ácidos nucleicos (Dunnebacke & Schuster, 1985).

En el último estudio sobre este tema (Dunnebacke & Dixon, 1989), se aportan nuevos datos para la caracterización del NACM, indicando que se trata de una proteína ácida, de un peso molecular próximo a los 36 Kd. Empleando anticuerpos monoclonales se observa su localización en los extremos de los pseudópodos y en los márgenes del citoplasma amebiano, y formando grandes masas en el citoplasma perinuclear de las células blanco.

Parece por ello que el NACM es una proteína sin precedentes, siendo amebiana en su origen, a la vez que da lugar a la destrucción celular, induce en las células la síntesis de un producto citoplasmático que es reconocido inmunológicamente como el material amebiano (NACM) que se ha inoculado.

2.1.2.- Acanthamoeba spp.

Precisamente, el descubrimiento de la patogenicidad de las amebas de vida libre, está ligado a la citopatogenicidad de Acanthamoeba. En 1957, Johnes, Fullner y Li, observaron daños en cultivos de células de riñón de mono, que tras una serie de investigaciones, se descubrieron debidos a la contaminación de los cultivos con Acanthamoeba.

A pesar de ello, los estudios realizados en este campo son menos extensivos y profundos que los llevados a cabo con

Naeqleria.

Asi, Schuster y Dunnebacke (1974, 1976) en sus estudios sobre factores líticos presentes en extractos amebianos, desechan pronto al género Acanthamoeba y se centran en el trabajo con Naeqleria fowleri.

Cursons y col. (1978) comienzan también con ambos géneros y determinan la citopatogenicidad de cepas de A. culbertsoni, A. castellani y A. polyphaga, tras esto centran su atención en Naeqleria (Brown, 1980).

De Jonckheere (1978, 1980) estudia la acción citopatogénica de distintas estirpes de Acanthamoeba frente a células Vero, haciendo hincapié en el efecto de la temperatura de cultivo. Evalúa un total de 36 cepas pertenecientes a 19 especies de Acanthamoeba, concluyendo que el estudio de la citopatogenicidad sobre cultivos celulares es el criterio más fiable para determinar la posible patogenicidad "in vivo" de la cepa, no sucediendo así en el caso de las cepas de N. fowleri, donde cepas apatógenas pueden, sin embargo, destruir por completo una monocapa de células Vero.

Grillot y Ambroise-Thomas (1981) estudian el efecto citopatogénico de 12 cepas de Acanthamoeba, tanto patógenas como apatógenas sobre células MRCS y Vero.

En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, (comunicaciones de M.I. Perez, 1988), empleando células Vero y

diversas cepas de Acanthamoeba, se determinó la existencia de factores citopatogénicos liberados al medio de cultivo, en cepas de A. lugdunensis, A. griffini y A. culbertsoni, pero no en el resto de las cepas ensayadas. Se constató al mismo tiempo que estos factores no producen la lisis celular, aunque sí profundas alteraciones estructurales y ultraestructurales, previas a la acción fagocítica amebiana.

Casi desde el comienzo, algunos autores seleccionaron la cepa A-1 de A. culbertsoni, (Singh y Das, 1970), pudiéndose afirmar que los estudios más intensivos se han llevado a cabo con ella. Así, estos investigadores del Central Drug Research de Lucknow, publicaron en 1979 (Singh y Das, 1979) los resultados obtenidos, en cuanto a los niveles de fosfolipasa A, en ratones normales y en animales afectados de encefalitis por A. culbertsoni. En el mismo año, Lal y Garg hacen públicos sus resultados relativos a la producción de sustancias tóxicas, que alteran la función mitocondrial, en el cerebro de ratones infectados por A. culbertsoni.

Se llega a demostrar la elaboración de fosfolipasa A en el cerebro de animales infectados, a la vez que este hecho se relaciona con lo indicado por otros autores, los niveles de este enzima son superiores en cepas patógenas de N. fowleri (Hysmith, 1982b) y Acanthamoeba spp. (Cursons, 1978). Todo esto les lleva al estudio de la fosfolipasa A producida por Acanthamoeba (Mishra y Garg, 1982; Mishra y col. 1983), pero al encontrarse con grandes variaciones en las condiciones óptimas de este enzima (pH, activación por iones Ca^{++} e inhibición por EDTA), deciden

purificar sólo la fosfolipasa A producida por A. culbertsoni, cepa A-1, debido a su elevada patogenicidad.

Mishra y col., en 1985, llegan a concluir que el extracto homogeneizado total de los trofozoitos no tiene actividad enzimática frente a la lisofosfatidilcolina (LPC) ni la lisofosfatidiletanolamina (LPE), pero que la presenta claramente frente a la fosfatidiletanolamina (PC) y fosfatidilcolina (PC), produciendo LPC y LPE respectivamente, como productos de degradación.

La actividad fosfolipasa A de los trofozoitos, durante 24-96 horas de crecimiento exponencial, permanece prácticamente constante, tras lo cual desciende ligeramente. La actividad fosfolipasa A en el medio de cultivo libre de células, aumenta a las 96 horas de crecimiento, tras lo que declina rápidamente, mientras que el contenido en proteínas del medio libre de células permanece estacionario durante el periodo de crecimiento de 24 a 144 horas, lo que indica que durante la fase de máxima multiplicación (hasta las 96 horas), la secreción de fosfolipasa A al medio, por parte de los trofozoitos, aumenta específicamente sin afectar al contenido total de proteínas del medio.

Si los trofozoitos se homogenizan por congelación-descongelación y se tratan con Triton X-100, la actividad del enzima alcanza las 0.025 unidades de fosfolipasa A por mg. de proteína. Al ser un enzima termoestable, puede incrementarse su actividad hasta las 0.058 unidades, desnaturalizando y eliminando otras proteínas por calor (60 °C durante 30 min.).

Tras precipitar con sulfato amónico y purificar en columna con Sephadex G-200, aparece en uno de los picos obtenidos el 85% de la actividad enzimática, que a su vez, al ser sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida, se separa en dos bandas proteicas con actividad fosfolipasa A, cada una con diferente temperatura óptima (40 °C y 35 °C), distinto pH óptimo (8.4 y 4.2 respectivamente), y otras propiedades.

El tratamiento con Triton X-100, desoxicolato y tripsina, capaz de solubilizar las proteínas de membrana, incrementa la actividad fosfolipasa A de los trofozoitos, lo que induce a pensar que en la membrana se localiza gran cantidad de este enzima.

El método de congelación-descongelación y sonicación rompe además los lisosomas; ya Mishra y Garg (1982) indicaban que más del 62% de la actividad fosfolipasa estaba ligada a la fracción mitocondrial y microsomal. Los pH óptimos obtenidos (4.2 y 8.4) se adaptan al hecho de que la fosfolipasa A lisosómica es activa a pH ácido, mientras que la mitocondrial y microsomal tiene un pH óptimo entre 8.0 y 9.5. Parece ser, por tanto que el enzima está presente en mitocondrias, lisosomas y retículo.

En 1986, Gaur, Mehdi y Garg publican los nuevos resultados obtenidos, tanto en el homogenado de los trofozoitos de A. culbertsoni como en el sobrenadante de los medios. Tras 96 horas de cultivo, identifican actividad fosfolipasa A que causa la lisis de los eritrocitos de conejo. La fosfolipasa A de la cepa A-1 de A. culbertsoni, se estimula con iones Ca⁺⁺ y es débilmente

estable a 60 °C, durante 30 min. (Mishra y Garg, 1982; Mishra y col., 1985), lo que no sucede con el factor aislado por Gaur y col., cuya actividad lítica no es estimulada por el Ca⁺⁺, no se afecta por la presencia de EDTA, y desaparece por completo tras 30 minutos a 60 °C.

La mayor actividad, se encuentra en los precipitados obtenidos al añadir de un 50 a un 70% de sulfato amónico al medio de cultivo o al citosol de las células de los cerebros infectados, fracción de la que se obtienen 4 picos en cromatografía con Sephadex G-200.

Los resultados demuestran que existe una proteína, capaz de producir la lisis de los eritrocitos de conejo a pH 6.0 y la hinchazón de las mitocondrias, y que se elabora en el cerebro del ratón durante la infección amebiana. Resultó ser una glicoproteína termolábil, de peso molecular 28 Kd y sin actividad fosfolipasa A, fosfatasa ácida, ni RNasa, aunque con alguna actividad proteasa neutra. Es una glicoproteína inmunogénica, cuyo antígeno neutraliza la lisis de los eritrocitos.

No se conoce el mecanismo exacto por el que esta proteína causa la lisis de los eritrocitos, se ha propuesto que sea debido a su actividad proteasa, o a algún mecanismo no enzimático que implique la unión entre la glicoproteína y una proteína de la membrana de los glóbulos rojos.

2.2.- Sobre Acanthamoeba culbertsoni, Cepa A-1

2.2.1.- Descubrimiento. Datos morfológicos.

La cepa A-1 de A. culbertsoni tiene una interesante historia. Tras el hallazgo por Johnes, Fullmer y Li (1957) de una ameba que contaminaba sus cultivos celulares, fue el Doctor Culbertson, protozoólogo, quien identificó el organismo y estableció su adscripción al género Acanthamoeba, realizando inoculaciones en monos y ratones que en lugar de permitirle el aislamiento de un supuesto agente vírico asociado, le descubrieron la capacidad de multiplicación del organismo, en el sistema nervioso central de los animales inoculados (1961).

Los estudios morfológicos a microscopía óptica de trofozoitos y quistes, con la aplicación de distintos métodos de tinción, pronto atribuyen a A. culbertsoni características propias y diferenciales (Pagge, F.L., 1967). Cuando en 1977, Pussard y Pons publican su estudio de la reclasificación de las especies del género e inclusión de ocho nuevas, lo dividen en tres grupos morfológicos principales, lo que resultó ser muy acertado, pues más tarde ha sido confirmado serológicamente. Con arreglo a ello, A. culbertsoni se incluye en el denominado grupo III, junto con A. palestinensis, A. lenticulata y A. royreba.

La designación específica de A. culbertsoni no ha sido cuestionada nunca, puesto que presentaba unas características propias muy claras desde su descripción.

En el último libro publicado por Page sobre taxonomía amebiana, en 1988, atribuye a esta especie los siguientes caracteres, siguiendo una clave dicotómica:

- Endoquiste no estrellado, casi redondeado.- Ectoquiste delgado.- Diámetro medio del quiste inferior a 19 μm (Grupo III de Pussard y Pons).- Crecen en agar con bacterias a 40 °C y en cultivo axénico a 37 °C; se precisan estudios isoenzimáticos o serológicos para distinguir claramente la especie; patógena para el ratón. Número medio de poros por quiste, entre 5 y 6.

2.2.2.- Caracterización isoenzimática

Debido a la variabilidad en la morfología quística, pronto se empezaron a ensayar otras técnicas de identificación específica, (Griffiths y col., 1978; Willaert, 1976; Willaert y Stevens, 1977) que comentaremos más adelante y entre ellas, las determinaciones isoenzimáticas, siendo Tyndall y col. (1979) los primeros en detectar diferencias en cuanto a la fosfatasa alcalina y la esterasa, entre las distintas especies de Acanthamoeba.

Los resultados obtenidos por De Jonckheere (1983), muestran idénticos isoenzimas para las tres cepas de A. culbertsoni que él utiliza (A-1, HA y KA), siendo esta especie la única entre las 15 que ensaya, que carece de bandas para la ADH. De modo que debido a ello, A. culbertsoni es perfectamente distinguible de las otras especies, como ya indicaban los estudios morfológicos (Adam, 1964; Daggett, 1982).

2.2.3.- Caracterización antigénica

Las afinidades inmunolectroforéticas de las especies de un mismo género pueden reflejar, y de hecho lo hacen, las relaciones taxonómicas entre especies.

En los trabajos iniciales llevados a cabo por Willaert (1976), se estudian las reacciones cruzadas en inmunolectroforesis de distintas cepas de Acanthamoeba, incluida la cepa A-1 de A. culbertsoni. La afinidad antigénica entre las especies resulta ser bastante marcada, destacando por su especificidad A. culbertsoni y A. castellanii.

De todas las especies estudiadas, la que más se diferencia es A. culbertsoni cepa A-1, sus afinidades antigénicas, del orden de 9 a 16 de sus componentes, son importantes, pero su especificidad, en contraposición con lo que sucede en otras especies, permanece en un nivel aproximado de la mitad de sus antígenos. Afirmaba Willaert (1976), que A. culbertsoni es la especie antigénicamente más independiente dentro del género Acanthamoeba.

Los ensayos realizados con otras cepas de la misma especie (Willaert, 1976), estudiando las reacciones homólogas por inmunofluorescencia indirecta, no muestran diferencias significativas entre cepas, lo que permite establecer la existencia de una homogeneidad serológica en el seno de esta especie. Igual ocurre al enfrentar el antisuero de A-1 con las otras especies, no observándose reacción cruzada a 1/64.

Tras el aislamiento inicial por Culbertson y col. (1958), Sing y Das (1972) aislaron 5 cepas más del género, todas ellas patógenas para el ratón. No se produjeron más aislamientos hasta 1978 (Willaert y col. 1978), aunque se supone que muchos de los casos relativos a contaminación accidental de cultivos de tejidos, eran debidas a esta especie.

Willaert y col. (1978), estudian dos cepas aisladas de cultivos de sarcoma Kinstan y de hepatoma de rata, sus resultados confirmaron lo ya indicado anteriormente, no se producían reacciones cruzadas con otras especies y se da una gran homogeneidad antigénica entre las cepas. Ambas estirpes eran muy virulentas para el ratón por inoculación intranasal, representando hasta esas fechas las cepas más virulentas del género (junto con las aisladas por Sing y Das en 1972), siendo la capacidad patógena de esta especie muy superior a la descrita en otras (Kasprzak y Hazun, 1972; Proca y Ciplea, 1973; Willaert, 1976 y Sawyer y col., 1977).

En 1979, Tyndall y col. confirman los resultados anteriores, al tiempo que estudian con detalle la patogenicidad de ambas cepas de A. culbertsoni y sus características isoenzimáticas.

2.2.4.- Estudio bioquímico en cultivo

Desde su descripción y cultivo en medio axénico, A. culbertsoni ha sido empleada como modelo biológico para diferentes estudios.

Raizada y Krishna Murti (1971) iniciaron una serie de estudios bioquímicos en el Central Drug Research Institute de Lucknow, que se han continuado en éste y otros centros de investigación. En 1971, estos autores comprueban que la transformación hacia formas quísticas, de los cultivos, se desencadenaba al trasladar los trofozoitos a un medio no nutritivo, rico en taurina e iones magnesio (esta dependencia de los iones magnesio ya había sido descrita por Griffiths y Hughes para A. castellanii). Los mismos autores comprueban en 1972 que la adición al medio de AMPc, favorece el enquistamiento, mientras que la actinomicina D y la cicloheximida lo inhiben.

Por otra parte, las amebas expuestas a un medio en el que abundan los iones magnesio y la taurina, sintetizan una cantidad de AMPc tres o cuatro veces superior al que sintetizan en medios carentes de estas sustancias y sugieren que la alteración de los niveles de AMPc intracelular, puede regular el catabolismo de los polisacáridos de reserva en A. culbertsoni, y dirigir el metabolismo hacia la síntesis de los polímeros necesarios en la construcción de la pared quística.

En 1974, Kadlec induce el enquistamiento de A. culbertsoni adicionando al medio Cl Ca, en 1975 Kaushal y Shukla desarrollan un medio de cultivo para esta ameba, ensayando distintos componentes, lo que permitió conocer los requerimientos básicos, al tiempo que comprobaron la necesidad de determinados niveles de taurina, cloruro magnésico y NaCl, en el medio, para que fuese posible el enquistamiento.

Estos mismos autores realizan en 1977 un estudio de los factores necesarios para el desenquistamiento de la misma cepa. Comprueban que es necesaria la presencia de peptonas, hidrolasas y extractos de distintas bacterias Gram-positivas y negativas. Es preciso que este "factor" o "factores" estén constantemente presentes en el medio, ya que si se eliminan, el proceso revierte.

2.2.5.- Afecciones humanas

Willaert (1977), empleando antígenos específicos e inmunofluorescencia, identifica a A. culbertsoni como el agente infeccioso en dos casos humanos de meningoencefalitis amebiana, descritos por Willaert y Stevens en 1976.

La importancia médica de Acanthamoeba se ha incrementado con el descubrimiento de la queratitis amebiana y su asociación, en la mayoría de los casos, al empleo de lentes de contacto.

Pocas veces se ha identificado la especie de Acanthamoeba responsable, pues el diagnóstico ha sido retrospectivo, pero el estudio de la bibliografía revela que A. culbertsoni, A. castellanii y A. polyphaga, pueden ser los agentes etiológicos más frecuentes.

El primer caso se describió en 1973 (Govinda y Visvesvara), en los siguientes diez años se describieron 10 casos más, pero a partir de 1984 el número se fue incrementando progresivamente, y se detectó su asociación al uso de lentillas. Este interés

creciente ha llevado a la celebración de un primer Symposium Internacional sobre el tema, en Abril de 1989.

El incremento de este tipo de afecciones y la ausencia de una terapia efectiva, ha llevado a profundizar más en las investigaciones sobre Acanthamoeba, sobre todo en lo relativo al empleo de compuestos amebicidas que las eliminen de las soluciones para lavado de las lentes de contacto, (Feldman y col., 1989; Meisler, 1989; Freitas y col., 1989) y a estudios bioquímicos sobre el metabolismo amebiano que puedan conducir en un futuro a una terapia dirigida.

Así, Shukla y col. (1989), centran sus estudios en la caracterización de A. culbertsoni utilizando el HPLC, con el que determinan que la poliamina mayoritaria en esta especie es el diaminopropano (DAP), y que se producen cambios en su concentración a lo largo de su crecimiento, con valores máximos al final de la fase logarítmica, que decrecen al envejecer los cultivos. Así se descubre que el desarrollo de la ameba se inhibe por completo al tratarlas con metilglioxal, producto que disminuye los niveles de DAP y que puede tener interés quimioproláctico y quimioterápico, al demostrarse que este organismo es incapaz de incorporar poliaminas del medio.

MATERIAL Y METODOS

3.1.- Material biológico

3.1.1 - Acanthamoeba culbertsoni, cepa A-1

La cepa A-1 de A. culbertsoni fue aislada originalmente en 1958 por Culbertson, siendo después estudiada por K.G.M. Adam en 1964, quien la envió en cultivo axénico a E. Willaert en 1971. A nuestro laboratorio llegó en 1985, cedida por el profesor J. F. de Jonckheere, del "Instituut voor Hygiëne en Epidemiologie" de Bruselas.

3.1.1.1.- Cultivos amebianos

La cepa se mantiene en medios axénicos tras su aislamiento original, cultivándose en estufa a 28 °C. En estas condiciones, las amebas se multiplican en forma trofozoica de modo indefinido, no produciéndose enquistamiento; debido a ello, el agotamiento del medio de cultivo lleva a la muerte de los trofozoitos, por lo que es preciso realizar resiembras continuas en medio fresco. Las amebas crecen adheridas al sustrato, del que se desprenden para dividirse.

Se han empleado dos tipos de medios para el mantenimiento de la cepa en el laboratorio, el C.G.V. (Willaert, E. 1976) y el S.C.H.G.Y.E.M., modificación desarrollada en nuestro laboratorio del medio S.C.G.Y.E.M. (Willaert, E. 1975), cuyas composiciones se detallan en este apartado.

3.1.1.1.1.- Medio C.G.V.

Es un medio útil, según nuestra experiencia, para el cultivo de todas las especies y cepas de Acanthamoeba capaces de desarrollarse en medio axénico. No permite, sin embargo, el desarrollo de Naegleria fowleri. Es fácil de preparar y adecuado para el mantenimiento rutinario de las cepas en el laboratorio.

3.1.1.1.1.a.- Composición

Su composición es la siguiente:

Bacto Casitone (Difco)	20 g.
NaCl	5 g.
Glucosa	1 g.
Acido fólico	2 mg.
Biotina	20 mg.
Penicilina	500 000 u.i.
Estreptomina	50 mg.
Agua bidestilada	100 ml.

Ajustar a pH 7

3.1.1.1.1.b.- Preparación

Una vez preparado, se esteriliza por filtración a través de filtros Millipore (SM 16510) de 0.45 μ m de poro, previamente esterilizados a 120 °C durante 30 min., aplicando una presión positiva de 1.2 kg./cm², suministrada por una bomba Millipore.

Una vez esterilizado, el medio se pasa a frascos Roux estériles pipeteando en condiciones de esterilidad, en el interior de una cámara de flujo laminar, en ellos se conserva a 4 °C hasta su uso. Antes de utilizarlo se comprueba su esterilidad incubando, durante 24 horas, una parte de éste en estufa a 37 °C, si desarrolla turbidez, se desecha, pues es señal de contaminación. Antes de inocular las amebas en los tubos de cultivo, se enriquece el medio con la adición de un 5 a un 10 % de suero bovino fetal (Gibco), previamente inactivado por calentamiento a 56 °C durante 30 min.

3.1.1.1.2.- Medio S.C.H.G.Y.E.M.

Lo hemos empleado para el cultivo en masa de Acanthamoeba. Difiere del S.C.G.Y.E.M., descrito por E. Willaert (1975), en el empleo de hidrolizado de caseína (Bacto CASITONE, DIFCO), en lugar de la caseína isoeléctrica empleada en la fórmula original.

Es útil para el cultivo de todas las especies y cepas del género, además de Naeqleria fowleri, capaces de un desarrollo axénico, pudiendo mantener los trofozoítos en buenas condiciones de viabilidad, sin necesidad de realizar subcultivos o renovar el medio, hasta un máximo de 100 días, en un tubo de cultivo con 3 ml. de medio, que se conserve a 28 °C con 15° de inclinación sobre la horizontal.

3.1.1.1.2.a.- Composición

Hidrolizado de caseína (DIFCO)	10 g.
Na PO H 4	1.325 g.
Glucosa	2.5 g.
KPO H 4 2	0.8 g.
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g.
Estreptomina	400 mg.
Penicilina	400 000 u.i.
Suero bovino fetal	100 ml.
Agua bidestilada	920 ml.

3.1.1.1.2.b.- Preparación

El medio S.C.H.G.Y.E.M. se prepara esterilizando al autoclave, a 120 °C durante 30 min., una disolución de hidrolizado de caseína y fosfato bisódico (Na PO H) en 820 ml. de agua bidestilada, preparada en un matraz con un litro de capacidad y otra de de glucosa y fosfato monopotásico (KPO H) en 4 2 80 ml. de agua bidestilada, en un matraz de 100 ml., estas soluciones se mezclan una vez esterilizadas y frías.

Sobre la disolución, una vez fría, se añade una solución en 40 ml. de agua destilada de 5 g. de extracto de levadura (Gibco), siendo conveniente la adición de antibióticos para prevenir contaminaciones posteriores. Hemos empleado para ello las siguientes cantidades de antibiótico:

Sulfato de estreptomicina.....400 mg.

Penicilina G sódica.....400 000 u.i.

Una vez disueltos los tres solutos, se procede a su esterilización, filtrando a través de filtros Millipore de 0.45 μ m de poro. Una vez finalizado el proceso, se añaden 100 ml. de suero bovino fetal (Gibco) igualmente inactivado y en condiciones de esterilidad.

Al igual que en el caso del medio C.G.V., el S.C.H.G.Y.E.M. se conserva en nevera a 4 °C, si no va a utilizarse inmediatamente, y el suero no debe adicionarse hasta su uso. Se realizan, igualmente, controles de seguridad por incubación, y se lleva el medio a los frascos de cultivo, mediante pipeteo estéril, en cámara de flujo laminar.

3.1.1.1.3.- Medio TC 199 (GIBCO)

Durante la fase de extracción de proteínas, se empleó el medio 199 (GIBCO), conteniendo sales de Hank y L- glutamina, en el que las amebas pueden mantenerse durante algún tiempo sin perder su viabilidad y que al carecer de proteínas, no dificulta la purificación posterior de aquellas liberadas por la cepa amebiana.

Es un medio para cultivos celulares que puede adquirirse ya preparado. Su composición se detalla en los catálogos comerciales de la empresa que lo suministra, y su esterilización se lleva a cabo por filtración.

3.1.1.2.- Procedimiento de subcultivo

Las amebas se desarrollan adheridas al sustrato, en este caso fondo y/o paredes de los frascos o tubos utilizados. Su adhesión al plástico o vidrio no es, sin embargo, muy firme y por ello bastan procedimientos físicos para desprenderlas, tales como la agitación o el descenso brusco de la temperatura.

Si se cultiva en frascos Costar, lo habitual es llevarlos a 4 °C, con lo que la mayoría de los trofozoitos se desprenden y flotan en el medio al cabo de 30 o 40 minutos.

Tras constatarlo, por examen del cultivo al microscopio invertido, se recoge el medio en frascos Steriline y se concentran las amebas por centrifugación a 1500 r.p.m., durante 15 minutos, tras lo que se recuentan en cámara de Neubauer y se inoculan los nuevos cultivos.

Si se trata de amebas mantenidas en tubos de cultivo Greiner, el procedimiento habitual es subcultivar, una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, desprendiendo por agitación durante un minuto, en un agitador de tubos, las amebas adheridas a las paredes, tras lo cual, siguiendo un protocolo rutinario, se siembran tres gotas de la suspensión en tubos de cultivo que contengan 3 ml. de medio S.H.C.G.Y.E.M. fresco.

3.1.1.3.- Criopreservación

Periódicamente, se procede a la conservación de parte de las amebas por criopreservación. Ello tiene dos objetivos: disponer

de un seguro permanente en el caso de posibles contaminaciones y conservar parte de un determinado subcultivo, para posteriores estudios sobre variaciones bioquímicas o metabólicas de la cepa, debidas a su cultivo axénico prolongado.

Se parte para ello de cultivos en fase exponencial de crecimiento (aproximadamente una semana después de la resiembra), que se agitan como antes se ha indicado y se concentran centrifugando a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. El botón obtenido se resuspende en medio S.C.H.G.Y.E.M. con un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), procurando que la concentración final sea de un millón de amebas por mililitro.

La suspensión amebiana se pasa a viales de plástico estériles, para congelación (Nalgene, Cryoware, 500-0020) de 2 ml., que se someten a un enfriamiento progresivo; dos horas a 4 °C; dos horas a -20 °C y finalmente a -80 °C en un arcón congelador, donde pueden permanecer varios meses o bien transferirse a nitrógeno líquido, en el que se conservan indefinidamente, sin apenas menoscabo de su viabilidad.

La descongelación debe ser brusca, para ello los viales se sumergen en un baño de María, regulado a 37 °C. Una vez descongelado el medio, se añade un volumen doble o triple de medio fresco a la suspensión amebiana, que se centrifuga en tubos de cultivo a 1500 r.p.m durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha, y el sedimento se resuspende en tres mililitros de medio fresco, con el que se lleva a incubar a la estufa.

3.1.2.- Cultivos celulares

Se han utilizado, para realizar experiencias de citopatogenicidad, cultivos de células Vero, que se mantienen en la estufa a 37 °C y en atmósfera que contiene un 5 % de CO₂.

2

3.1.2.1.- Células Vero

La línea celular Vero, se estableció a partir de riñón normal de mono verde africano (Cercopithecus aethiops), en Marzo de 1962, por Y. Yasumura y Y. Kawakita, en la Universidad japonesa de Chiba. El medio de cultivo recomendado por la ATCC, es el TC 199, suplementado con un 5% de suero bovino fetal, aunque también se mantiene en medio Eagle con aminoácidos esenciales y sales de Earle, suplementado con un 5% de suero bovino fetal.

Esta línea celular ha sido muy empleada en estudios de replicación de los virus SV-40, SV-5, el del sarampión, arbovirus, reovirus, el de la rubeola, adenovirus de monos y polivirus.

Se recomienda emplear como medio de congelación, un medio Eagle, con aminoácidos no esenciales y sales de Earle, que contenga un 5% de suero bovino fetal y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO).

Las células utilizadas en nuestras experiencias, provienen de una cepa mantenida en los laboratorios Flow y cedida a nuestro grupo, por el departamento de Microbiología de la Facultad de

Medicina de esta Universidad, en el año 1982. Desde entonces se mantienen por subcultivos sucesivos y por congelación.

3.1.2.1.1.- Mantenimiento en el laboratorio

Los cultivos se han mantenido en medio MEM (Gibco), suplementado con un 10 a un 20% de suero bovino fetal inactivado. Este medio posee una composición compleja, se adquiere ya preparado y se esteriliza por filtración.

3.1.2.1.2.- Cultivos "stock"

Las células se mantienen en frascos Falcon, con medio MEM, en una atmósfera termostatzada a 37 °C y enriquecida con un 5% de CO₂. Cuando las células ocupan todo el fondo de la placa y entran en contacto, el crecimiento se detiene y debe procederse a la resiembra en nuevos frascos con medio fresco, tras la tripsinización de la monocapa celular.

3.1.2.1.3.- Cultivos en placa de microtitulación

Su principal utilidad son los estudios con pequeñas cantidades de células, o los ensayos simultáneos de diferentes condiciones de cultivo. Permiten una buena visualización y seguimiento a microscopía óptica.

Hemos empleado placas de microtitulación (Microwell, Nunclon, Nunc), con 96 pocillos de fondo plano. Si se pretende la tinción de los pocillos, para estudios posteriores, se cubre su fondo con

un cristal circular, en el que se desarrolle la mayor parte del cultivo celular.

El cultivo se interrumpe eliminando el medio y depositando en su lugar un fijador adecuado al tipo de tinción; tras ello se extraen los los cristales y se someten al procedimiento de tinción elegido.

3.1.2.1.4.- Subcultivos: tripsinización

La monocapa celular se separa del sustrato y se disgrega mediante tratamiento enzimático. Para ello se prepara una solución compuesta por:

Tripsina (Difco).....	250 mg.
PBS.....	100 ml.

Tras disolver el enzima, se filtra a través de papel de filtro y el pH se ajusta a 7.2, esterilizándose seguidamente por filtración. Seguidamente se traslada a frascos de 5 ml. de capacidad y tras incubarlos hasta comprobar su esterilidad, se almacena a -20 °C.

Para tripsinizar se procede del siguiente modo:

Una vez retirado el medio de cultivo celular, se añaden 5 ml. de la solución previamente descrita y se deja en contacto con las células, a temperatura ambiente, durante un minuto. Trascurrido este tiempo, se retira la solución y los frascos se llevan a

incubar a 37 °C durante 10 minutos.

La pequeña cantidad de solución retenida por la monocapa celular, actúa sobre ésta durante el tiempo de incubación. Al final de este periodo, se comprueba por observación al microscopio invertido, si las células se han despegado de la superficie del frasco en que estaban adheridas. Si éste es el caso, se añaden 5 ml. de medio de cultivo y se agita bien la suspensión para que la capa de células quede completamente disgregada.

A continuación se calcula el porcentaje de viabilidad mediante tinción con azul tripán y el volumen se ajusta hasta 10 células/ml. En los frascos donde se van a realizar los subcultivos, se añade 1 ml. de esta suspensión y 4 ml. del medio de cultivo fresco, tras lo que son llevados a incubar a una estufa termostatzada a 37 °C y con un 5% de CO₂. 2

3.2.- Materiales

Incluimos en este apartado tanto el material fungible empleado, como la composición de la mezcla sulfocrómica con que se limpia de restos orgánicos del material de vidrio.

3.2.1.- Material de vidrio

El material de vidrio para los cultivos debe ser químicamente neutro, y fácil de lavar y esterilizar.

Hemos empleado frascos Roux de 500 ml. para el almacenamiento

de los medios de cultivo.

Las pipetas Pasteur se limpian con mezcla sulfocrómica y se enjuagan primero con abundante agua del grifo y después con agua destilada, se dejan secar y se les coloca su algodón en el extremo posterior, esterilizándose y almacenándose en pipeteros metálicos o de vidrio.

3.2.2.- Frascos de un sólo uso

Para los cultivos hemos empleado frascos de plástico (Costar 3050, de 50 ml. de capacidad y 25 cm. de superficie y también Costar 3075, de 250 ml. y 75 cm.) y tubos de ensayo de plástico (GREINER, tapón a rosca y 16 mm. de diámetro, por 100 mm. de longitud).

3.2.3.- Mezcla sulfocrómica

La eliminación de la materia orgánica que pudiese ir adherida al material de vidrio, se lleva a cabo sumergiéndolo en mezcla sulfocrómica durante 24 horas. La composición de ésta es la siguiente:

Agua destilada.....	800 ml
H ₂ SO ₄	200 ml

Añádase K₂Cr₂O₇, hasta obtener un color anaranjado intenso.

3.3.- Citopatogenicidad

La acción citopatogénica de Acanthamoeba culbertsoni A-1 frente a células Vero, fue estudiada previamente en nuestro laboratorio por M.I. Pérez (1987), empleando distintas proporciones amebas/células Vero (10/1, 1/1 y 1/10), en un estudio comparativo con otras especies y cepas.

Los resultados obtenidos indican que la cepa produce una acción citopatogénica de grado 4 (desaparición del tapiz celular) a las 18 horas de cultivo conjunto en proporción 10/1, aunque este grado no se alcanza hasta las 72 horas si la proporción de la que se parte es 1/1. Esto la caracteriza como de una citopatogenicidad intermedia, al compararla con otras cepas de acción más rápida, como la cepa 76/14/S de NaeqLeria fowleri o la Gr-1 de Acanthamoeba spp., y con otras, menos activas, en las que el grado 4 no se alcanza ni tras 72 horas de cultivo conjunto, en proporción 10/1.

En experiencias posteriores, se demuestra como sólo cuatro de las cepas estudiadas producen, en presencia de las células Vero, un "factor" o "factores" citopatogénicos que difunden al medio de cultivo y causan daños a nuevos cultivos celulares, cuando éste factor se les adiciona. Concretamente la adición del sobrenadante de cultivos conjuntos Acanthamoeba culbertsoni/células Vero, tras 5 horas de interacción, a nuevos cultivos de células Vero, les ocasiona en ellos alteraciones que comienzan a observarse a las 48 horas.

M.I. Pérez estudia en el trabajo antes citado, el efecto de la temperatura en este proceso. Precisamente en la especie que nos ocupa, la acción sigue produciéndose tras someter los sobrenadantes a 44 °C, durante una hora, a 56 °C durante 30 minutos, a 4 °C durante 4 horas o a -20 °C durante 4 horas, siendo el efecto citopatogénico observable a las 24 horas de adicionar los sobrenadantes al cultivo de células Vero. El calentamiento a 100 °C durante 1 minuto, inactivaba el factor presente en los sobrenadantes.

Del estudio llevado a cabo por la autora antes citada, se deduce que el factor citopatogénico, por ella detectado en Acanthamoeba culbertsoni A-1, precisa para su liberación del contacto previo de las amebas con las células, dado que la adición de los sobrenadantes de los cultivos amebianos axénicos, no ejerce una acción citopatógena sobre las células Vero.

Basándonos en los resultados previos y en lo reseñado en los antecedentes de esta Memoria, tratamos de diseñar un procedimiento (extrapolable a otros protozoos) que permitiera la detección de factores proteicos excretados y/o segregados en ausencia de células y que por los procedimientos habituales no resultasen detectables.

3.3.1.- Cultivos sobre nitrocelulosa

Tras diversas pruebas sobre distintos sustratos, se escogió la nitrocelulosa para nuestro estudio.

Empleamos filtros de nitrocelulosa, tipo MF, de 0.22 μ m de poro (Ref. GSWP 025 00. MILLIPORE), capaces de absorber hasta 100 μ g. de proteína por cm., recortados a un tamaño de 85 mm. de diámetro, para constatar la adherencia de las amebas y su desplazamiento por este tipo de sustrato.

Los filtros se esterilizaban antes de su empleo en autoclave de oxiacetileno, pues la nitrocelulosa se altera por calor húmedo, imposibilitando su autoclavado normal.

La suspensión amebiana se coloca sobre la cara más brillante del filtro, que se recubre con medio de cultivo TC 199, (10 ml. por placa) y se lleva a incubar a 28 °C.

El desarrollo del cultivo se interrumpía a intervalos determinados para su estudio detallado a microscopía electrónica.

3.3.1.1.- Microscopía electrónica de barrido

Los cultivos sobre nitrocelulosa se procesaban para "scanning" de acuerdo con la siguiente metodología:

3.3.1.1.1.- Fijación:

Se lleva a cabo con glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato/HCl 0.1 M con sacarosa 0.1 M, ajustándose el pH a 7.2, tal como recomiendan Brunk y col. (1981). Se prescindió, sin embargo, de una fijación secundaria con tetróxido de Osmio, ya que sólo se iba a trabajar con un rango de magnificación medio,

no siendo preciso en este caso.

Los filtros se sumergen en la solución fijadora de glutaraldehido, que se tiene preparada a la misma temperatura del cultivo, durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se adiciona la misma solución fijadora con la muestra a temperatura ambiente, durante 45 minutos, con lo que se evita una excesiva precipitación de proteínas.

Tras la fijación, el transporte de las muestras se vuelve delicado, ya que los cambios bruscos de temperatura, así como los golpes, pueden en algunos casos destruir estructuras finas tales como son los pseudópodos del género Acanthamoeba (Bone y Ryan, 1972; Saunders y col., 1975; Arborgh y col., 1976; Collins y col., 1977; Boyde y Maconnachle, 1979; Brunk y col., 1981).

3.3.1.1.2.- Lavado:

Este se lleva a cabo con objeto de arrastrar los posibles cristales de glutaraldehido, formados durante la fijación anterior. Se realiza con nueva solución fijadora de glutaraldehido, a temperatura ambiente, y consiste simplemente en sumergir el filtro en esta solución y escurrirlo antes de proceder con el paso siguiente.

3.3.1.1.3.- Enjuagado:

Con alcohol de 50 grados, para arrastrar los restos de la

solución de glutaraldehído que se emplea en el paso anterior. Se efectúa de forma similar a lo indicado en el paso anterior.

3.3.1.1.4.- Deshidratación previa:

Para este proceso se emplean una serie de alcoholes de gradación creciente (de 10 en 10 grados), entre 50 y 100 grados. Se mantienen los filtros sumergidos en ellos durante, aproximadamente 10 minutos. El alcohol absoluto ha de ser de una pureza garantizada y fiable, esto es, que el frasco ha de estar lleno en mas de 2/3 de su capacidad, ya que es higroscópico y puede tomar agua del ambiente, impidiendo de esta forma completar la deshidratación previa.

3.3.1.1.5.- Deshidratación:

Para efectuar la deshidratación, (Polliack y col., 1973; Brunk y col., 1981), de los dos métodos recomendados por Brunk y col. : Método del Punto Crítico y Método de Liofilización, fue este último el que decidimos llevar a cabo. Para ello, previamente se congelaban los filtros a -80°C , con objeto de evitar alteraciones en las amebas al efectuarles el vacío, en el proceso de liofilización.

Se introducían seguidamente en la cámara del liofilizador durante 12 horas, al término de las cuales los filtros se montaban sobre los portaobjetos metálicos del MEB, prefiriendo para ello plata coloidal frente a otras técnicas como pueden ser los "punts", ya que se favorece la conductividad en el

metalizado, desapareciendo gran cantidad de ruidos en la observación. Teniendo en cuenta que se trabaja con material liofilizado, la técnica antes descrita se ha de llevar a cabo en el menor tiempo posible, para evitar la hidratación de las muestras.

3.3.1.1.6.- Metalizado:

Consiste en recubrir la preparación de una finísima capa de oro de aproximadamente 10 nm, que resalta los contornos de la muestra al bombardear con el haz de electrones. Este recubrimiento se puede conseguir por evaporación térmica o bombardeo iónico (Echlin, 1975; Brunk y col., 1981).

Se prefirió el bombardeo iónico con un metalizador Nanotech Semprep 2, y un tiempo de 45 a 50 segundos, en dos fases: una más larga, de 35 segundos de bombardeo vertical y otra más corta, de 10 segundos de bombardeo oblicuo.

Para visualizar las muestras se empleó un Microscopio electrónico de barrido Hitachi S-510 y otro Zeiss DSM 950, a una distancia del haz electrónico de 5 mm. y entre unos márgenes de magnificación de 1000 a 30 000 aumentos.

En cuanto a la fotografía, (Echlin, 1975), se utilizó película Negra-Pan (100 Asa. 21 din. iso 100/21 grados).

3.3.1.2.- Microscopía electrónica de transmisión.

Para observar las posibles alteraciones sufridas por las amebas en su interacción con los filtros de nitrocelulosa, se procesaron, a diferentes intervalos de tiempo (1, 12 y 24 horas), muestras de éstos con sus amebas adheridas, para la microscopía electrónica de transmisión (MET). El protocolo seguido fue el siguiente:

3.1.2.1.- Fijación:

Se realiza, del mismo modo que en la microscopía electrónica de barrido (MEB), sumergiendo los filtros en la solución tamponada de glutaraldehído al 2.5%, ya descrita en el apartado 3.1.1.1, previamente calentada hasta la temperatura del cultivo, y se mantienen en ella durante 15 minutos, transcurridos los cuales, se mantendrá la muestra durante 6 a 12 horas en una nueva solución de glutaraldehído, ésta a temperatura ambiente.

3.1.2.2.- Lavado:

Los filtros se lavan tres veces, durante unos 15 minutos, en solución tamponada de Milloning a temperatura ambiente.

3.1.2.3.- Segunda fijación:

Esta se realiza con tetróxido de Osmio al 1% en PBS; se lleva a cabo a temperatura ambiente y se mantiene durante media hora.

3.1.2.4.- Segundo lavado:

Al igual que el anterior, se realizan tres veces, pero en esta ocasión con agua destilada, también a temperatura ambiente, y se mantiene durante el mismo tiempo que el primero.

3.1.2.5.- Deshidratación:

Siguiendo un protocolo similar al de la MEB, comenzamos con la inmersión en un alcohol de 70° , continuándose con tres baños en alcohol absoluto, cada uno de 15 minutos.

3.1.2.6.- Inclusión en resina Spurr:

Inicialmente, la muestra ha de permanecer en una mezcla a partes iguales de alcohol absoluto y resina Spurr, durante hora y media. A continuación se deja en resina Spurr pura durante toda la noche, polimerizando a 60 °C, en el interior de moldes de silicio.

3.1.2.7.- Corte y tinción:

Una vez obtenido el bloque, se procede al corte del mismo en un ultramicrotomo "Ultratomo 8000", de la casa LKB.

Se comienza por realizar cortes semifinos, que nos servirán de orientación sobre las zonas más interesantes en las que centrar la observación. Estos cortes se tiñen con azul de toluidina al 1% en solución de borax al 1% .

Cuando la zona está escogida, se realizan en ella los cortes ultrafinos y se montan en rejillas de cobre de 200 mesh. El corte ultrafino se contrasta con metales pesados, manteniéndose durante 30 minutos en acetato de uranilo al 8% y después en citrato de plomo durante 5 minutos, siguiendo la técnica descrita por Reynolds en 1963.

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico tipo Jerol 100 B. Para la fotografía fueron empleadas placas Kodak, "Electron Microscope Film 4489 Estar Thick Base".

3.4.- Planificación y curso de las experiencias.

Una vez analizados los resultados previos, procedimos a la puesta en marcha de una metodología que permitiera la detección, aislamiento y purificación, en su caso, de las sustancias que Acanthamoeba culbertsoni, cepa A-1, pudiera liberar sobre el soporte inerte de nitrocelulosa. Así, tras diversas pruebas, variaciones y modificaciones, se llegó al siguiente esquema de trabajo:

3.4.1.- Cultivos amebianos en masa.

Todas las operaciones se llevaron a cabo en el interior de una cámara de flujo laminar vertical (Glatt) y con todo el material estéril. Para el cultivo en masa, seleccionamos como más adecuados los tubos de cultivo de tejidos, de un sólo uso, (Greiner) de tapón a rosca. Partiendo de cultivos normalizados en este tipo de tubos (3 ml. de medio S.C.H.G.Y.E.M. a 28 °C,

durante 7 días), en fase exponencial de crecimiento, se comienza por agitar durante un minuto, con la ayuda de un agitador de tubos (Selecta, tipo Reax-1), el tubo en el que el cultivo se haya en fase exponencial de crecimiento y se siembran tres gotas de la suspensión de amebas así obtenida, con una pipeta Pasteur, en un tubo de ensayo que contenga 3 ml. de medio fresco.

Los tubos de cultivo se incuban en ambiente húmedo, a 28 °C, dispuestos en bateas apilables que los mantienen inclinados 15° sobre la horizontal y ocupan poco espacio en la estufa. Se observan a diario, en el microscopio invertido, a 200 aumentos, para comprobar la ausencia de contaminantes y la evolución de los cultivos.

En estas condiciones, la fase exponencial de crecimiento se alcanza aproximadamente siete días después de la siembra inicial.

Dada la necesidad de obtener grandes cantidades de amebas en la misma fase de crecimiento, desarrollamos el método rápido de cultivo antes descrito y un método rápido de recogida que pasamos a describir.

3.4.2.- Recogida de las amebas. (Esquematisado en la Fig. 1)

El proceso de recogida de amebas comienza con la agitación de los tubos en el agitador durante un minuto, como se describió en el procedimiento de subcultivo y tiene como objetivo el lavado y la concentración de las amebas, eliminando el medio de cultivo y las proteínas u otros componentes que éste pueda llevar.

La suspensión amebiana se recoge y concentra por centrifugación a 1500 r.p.m., durante 10 minutos, en una centrífuga que se adapte al tipo de tubos empleado y con capacidad para doce tubos al menos.

Tras la centrifugación, el sobrenadante es desechado y el sedimento de cada tubo se resuspende en 5 ml. de P.B.S. que se esteriliza por filtración y cuya composición es la siguiente:

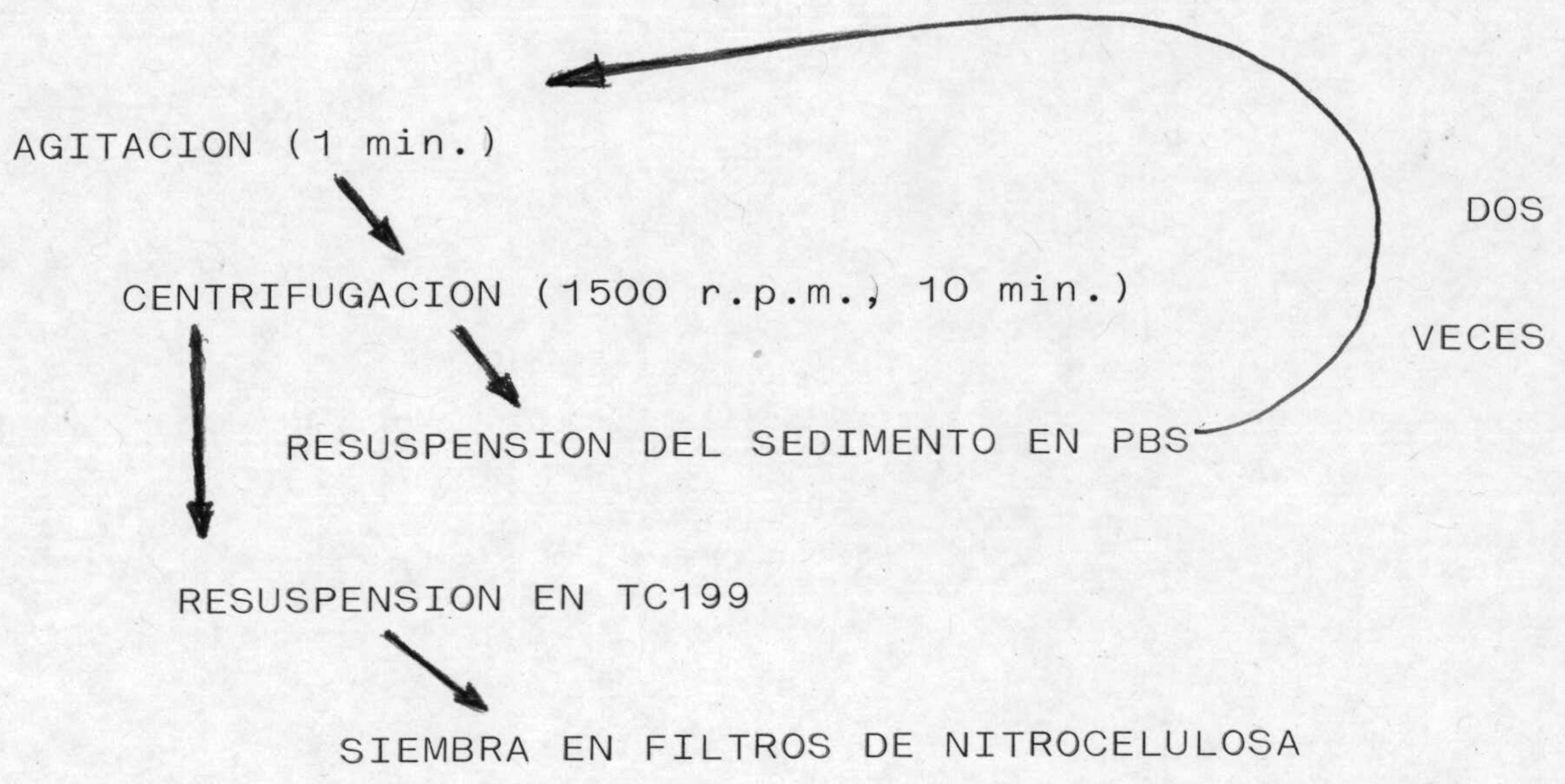
NaCl.....	8.50 g
KCl.....	0.20 g
Na PO H 2 (aAhidro)..	1.16 g
KPO H ...4.2.....	0.16 g

Seguidamente se agitan de nuevo los tubos en el agitador y se repite el proceso completo de lavado y centrifugado. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento de uno de los tubos se resuspende en 3 ml. de medio TC 199, empleando una pipeta Pasteur estéril, a la que se adapta una propipeta de goma (Votac, U.K.). La suspensión de amebas se pasa a otro tubo del que se ha retirado el P.B.S. sobrenadante, resuspendiéndose el sedimento del mismo modo con la pipeta Pasteur. El proceso se repite hasta concentrar el sedimento de cuatro tubos en estos tres mililitros de medio.

3.4.3.- Siembra sobre filtros de nitrocelulosa.

Los filtros de nitrocelulosa de 0.22 μ m de poro y 8.5 cm. de diámetro, se depositan en el fondo de una placa de Petri de

FIGURA 1



plástico (STERILIN, 8.5 cm. de diámetro y 1.5 cm. de altura), con su superficie más brillante hacia arriba y esterilizan en un autoclave de oxiacetileno.

Los tres mililitros de suspensión amebiana puede entonces depositarse en el centro del filtro de nitrocelulosa, a ellos se añadirán otros tres mililitros de medio fresco, que habremos empleado en enjuagar los restos de suspensión amebiana de los cuatro tubos. Sobre el mismo filtro, y siguiendo los pasos antes descritos, irán a parar los otros dos lotes de cuatro tubos que se habían centrifugado a la vez.

La placa se deja reposar, evitando cualquier movimiento brusco, en la cámara de flujo laminar durante unos 15 minutos, permitiendo que las amebas se adhieran al sustrato y después se lleva con cuidado a incubar a una estufa a 28 °C.

3.4.4.- Incubación y lavado

Tras 24 horas de incubación a esta temperatura y ambiente húmedo, los filtros se extraen de las placas de Petri, procediéndose a la eliminación de las amebas.

Después de haber ensayado distintos procedimientos, se eligió someterlos durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C y seguidamente, pipetear con fuerza unos 15 ml. de PBS estéril, a esta misma temperatura, sobre cada una de sus dos caras.

La ausencia de trofozoitos adheridos al filtro se comprueba

cortando un trozo de éste, de un centímetro cuadrado, y sembrándolo en una placa de petri con una capa de Bacto-Agar no nutritivo al 2 % más un 0.05% de NaCl. Estas placas se llevarán a incubar durante 24 horas, transcurridas las cuales la nitrocelulosa se retira, aunque la incubación se mantiene durante 6 ó 7 días más, revisándose en días sucesivos al microscopio invertido, con el fin de comprobar que no se produce crecimiento amebiano.

3.4.5.- Concentración, purificación y estudio del factor proteico

Los filtros de nitrocelulosa que habrían servido de sustrato a los trofozoitos amebianos, se trocean e introducen en frascos de fondo cónico de 25 ml. (STERILINE), a razón de dos filtros por frasco.

3.4.5.1.- Solubilización de la muestra.

Este proceso comienza al añadir a cada frasco, 20 ml. de una solución de Octil-D-glucopiranosido (FLUKA), al 0.8 % (la concentración micelar crítica es del 0.73 %, y se recomienda emplear concentraciones superiores).

Una vez tengamos los frascos con sus trozos de filtro y detergente, se procede a la sonicación. Empleamos para ello un sonicador de ultrasonidos (Virsonic 50) ajustado al 80% de su potencia, durante dos minutos.

Tras ellos, los Sterilines se colocan bien cerrados y

sellados con PARAFILM "M" en un agitador orbicular de 10 cm. de radio, marca SELECTA, que girará a 10 - 15 r.p.m. en el interior de un frigorífico a 4 °C, durante 6 horas.

Pasado este tiempo, se vuelve a sonicar el detergente y se pasa a tubos de polietileno de 50 ml. con tapón a rosca, adaptables al rotor JS- 13.1 de una ultracentrífuga BECKMAN J2-21 M, en la que se centrifugan a 10 000 g durante 15 minutos, a 4 °C.

3.4.5.2.- Medida de la concentración de proteínas.

Tras la centrifugación, se tomarán alícuotas del sobrenadante para medir la concentración de proteína presente en la muestra, conforme a la siguiente técnica de Microlowry (Findlay, J.B.C. 1986), específica para pequeñas cantidades de proteína disueltas en soluciones de detergente:

1º.- Preparar las siguientes soluciones:

Solución A:

NaOH.....0.2 g.

Na CO .2..3.....1 g.

Disueltos en 50 ml. de agua bidestilada.

Solución B:

CuSOA.....50 mg.

Tartrato de sodio y potasio....100 mg.

Disolver primero el tartrato en 10 ml. de agua bidestilada y seguidamente el sulfato de cobre, después filtrar por papel de filtro, ya que se forma un precipitado.

Solución C:

50 partes de solución A mas una parte de solución B.

2º.- Técnica:

Mezclar 200 µl de la muestra con 1 ml de solución C en las cubetas de espectrofotometría (HALBBIKRO, plástico desechable).

Agitar e incubar a 30 °C durante 15 minutos.

Añadir 0.1 ml de Dodecil sulfato sódico (SDS) al 10 %.

Añadir 0.1 ml de reactivo de Folin- Ciocalteu diluido 1:1 en agua.

Incubar a 30 °C durante 20 minutos y medir la absorbancia a 660 nm.

Para comprobar la cantidad de proteína a la que corresponde

la absorbancia obtenida, se prepara simultáneamente una escala de concentraciones conocidas de albúmina, disuelta en la misma solución de detergente empleada para solubilizar la proteína amebiana, de modo que la absorbancia que se presume obtener, se encuentre entre dos de las correspondientes a los patrones de albúmina utilizados.

Una vez medidas las absorbancias, se determina la posición de la obtenida para la cubeta que contiene la muestra problema, entre dos de las correspondientes a la escala patrón de albúmina.

Se considera que esta técnica es fiable hasta concentraciones de 0.1 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.5.3.- Diálisis.

El resto de la muestra se pasa a tubos de diálisis de 2.5 cm. de diámetro y tamaño de exclusión a partir de 8000 d., que se han de esterilizar previamente al autoclave durante 30 min., a 121 °C.

La diálisis se lleva a cabo a 4 °C, frente a un volumen 100 veces superior al de la muestra, de una solución de inhibidores de proteasas cuya composición será la siguiente:

1,10 - phenantroline.....1 mM
 Benzamidine.....1 nM
 Phenylmethane-sulfonyl fluoride....50 μ M
 Leupeptin.....20 μ g/ml.
 Inhibidor de la tripsina de soja..50 μ g/ml
 Aprotinin.....50 μ g/ml.
 E.D.T.A.....1 mM

Estos 100 volúmenes de solución de inhibidores de proteasas, en agua bidestilada, se cambian cada 12 horas aproximadamente, repitiendo esta operación seis veces, de modo que la concentración final de detergente resulte inapreciable.

3.4.5.4.- Liofilización.

El siguiente paso es la liofilización de la muestra, para lo cual se extrae de la tripa de diálisis, y se transfiere a frascos STERILINE, procediéndose a una congelación lenta. Se pasan después a un arcón congelador (KOSKA) a -80 °C. donde se mantienen durante una hora.

La liofilización se lleva acabo en un liofilizador TELSTAR, Modelo "CRYODOS", cuya unidad de refrigeración se habrá encendido previamente, para que su temperatura haya descendido al máximo en el momento en que va a utilizarse. Se introduce la muestra congelada y se conecta la bomba de vacío, asegurándose de que el contenedor queda herméticamente cerrado.

Hay que tener siempre la precaución de dejar abiertos los

frascos para evitar que estallen y no es mala práctica cubrirles la boca con una lámina perforada de Parafilm, que evita la salida del bloque de hielo en caso de que alguna burbuja de aire haya quedado atrapada en el fondo.

3.4.5.5.- Eliminación de los inhibidores de proteasa.

Una vez liofilizada la muestra, es preciso eliminar los inhibidores de proteasas adicionados. Se resuspende para ello en 2 ml. de agua bidestilada y se sonica del modo antes descrito.

Se lleva a cabo un nuevo proceso de diálisis en tripas de 1 cm. de diámetro, frente a dos litros de agua bidestilada que previamente se enfría a 4 °C. El agua de la diálisis se cambia cada 12 horas por otros dos litros, también a 4 °C. Es suficiente con renovar el agua cuatro veces.

El proceso de diálisis completo ha de realizarse en el interior de una cámara refrigerada a 4 °C.

Acabada esta fase, se repite la medición de la cantidad de proteína, por medio de la técnica de Micro Lowry anteriormente descrita en el apartado 4.5.2, teniendo la precaución de sonicar la muestra y añadir al volumen que se va medir una solución de detergente cuya concentración final sea del 0.8%.

Una vez conocida la cantidad total de proteína presente en la muestra, se procederá a repartirla en viales de congelación de modo que en cada vial se depositen 20 µg. de proteína en

suspensión. Se recomienda sonicar intensamente la muestra antes de repartirla, de modo que la suspensión resultante sea uniforme (sonicar en lecho frío, para evitar que la temperatura suba excesivamente).

Seguidamente se congelan los viales de forma lenta, hasta alcanzar los -80°C y se liofilizan tal y como se indica en el apartado anterior.

Esta forma de proceder, repartiendo la proteína en fracciones de 20 $\mu\text{g.}$, tiene la ventaja de poder tomar cantidades conocidas para cada experiencia que se plantee, sin necesidad de descongelar y rehidratar proteína que no vaya a utilizarse y que resultaría deteriorada si este proceso hubiese de repetirse continuamente.

3.4.6.- Determinación del peso molecular

La determinación del peso molecular del factor proteico obtenido se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida, en una cubeta de lámina plana vertical (LKB 2001), que da lugar a geles separadores de 120 x 140 x 1.5 mm., al ensamblar el molde de vidrio y teflón del que vienen provistas.

3.4.6.1.- Preparación de los geles de poliacrilamida

Para la preparación de los geles seguimos una modificación del método de Laemmli y Favre (1973), descrita en el manual del aparato de electroforesis LKB 2001, para los geles SDS-PAGE de

tampón discontinuo.

Siguiendo esta técnica, preparamos una solución "stock" de acrilamida y bisacrilamida al 30% aproximadamente, cuya composición es la que sigue:

Acrilamida (Merck).....	30 g.
Bisacrilamida (Merck).....	0.8 g.
Agua bidestilada c.s.p.....	100 ml.

Esta solución puede almacenarse hasta dos semanas, en una botella oscura, dentro de un frigorífico a 4 °C.

A partir de ella preparamos dos clases de geles, el primero que se vierte en el molde es el separador, cuyo poro es menor y en el que se realiza la separación del factor proteico, tiene un 10% de acrilamida-bisacrilamida y la siguiente composición:

Solución stock de acrilamida-bisacrilamida.....	9.9 ml.
Tampón del gel separador.....	15 ml.
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina, Merck).....	10 µl.
Persulfato amónico (Merck), al 1%.....	0.75 ml.

Completando con agua bidestilada hasta 30 ml.

La composición del tampón del gel separador es la siguiente:

Tris.....11.82 g.

SDS.....0.2 g.

Añadir 100 ml. de agua destilada

El pH se ajusta a 8.8 con HCl.

Los componentes del gel, excepto el TEMED y el persulfato amónico, se mezclan en un frasco de Erlenmeyer con un brazo lateral, se desgasean intensamente y en este momento se añaden los dos compuestos antes excluidos, vertiéndose a continuación en el molde, con cuidado de que no se formen burbujas.

El gel aún no polimerizado se cubre con una película de agua para evitar el contacto con la atmósfera, que inhibe la polimerización y se deja hasta observar claramente una línea con distinto índice de refracción bajo la capa de agua, lo que será señal de que la polimerización se ha completado.

El siguiente paso es eliminar el agua que cubre el gel, secándola incluso con finas tiras de papel de filtro, introducir el peine que formará los pocillos donde se ha de depositar la muestra y verter el gel almacenador, ya desgaseado y con sus cantidades correspondientes de TEMED y Persulfato amónico añadidas inmediatamente después de desgasear.

El gel almacenador presenta un poro de mayor tamaño que el del separador, su porcentaje de acrilamida-bisacrilamida es del 3% y su composición es la siguiente:

Solución stock de acrilamida-bisacrilamida.....1 ml.
Tampón de gel almacenador.....5 ml.
TEMED.....5 µl.
Persulfato amónico al 1%.....0.5 ml.

Completar con agua bidestilada hasta 10 ml.

La composición del tampón del gel almacenador es la siguiente:

Tris.....3.94 g.
SDS.....1 g.

Completar con agua bidestilada hasta 100 ml.

El pH se ajusta a 6.8 con HCl.

La cubeta ha de estar llena en su parte inferior y superior de tampón de electrodos, cuya función es doble, refrigerar el gel y cerrar el circuito eléctrico, su composición se detalla seguidamente:

TRIS.....15.15 g.
Glicocola.....72 g.
SDS.....5 g.

Ha de añadirse agua bidestilada hasta completar 5 litros y el pH se ajusta a 8.3.

4.6.2.- Preparación de la muestra.

Por último, conviene describir la composición del tampón de muestras utilizado comúnmente, es un tampón normalizado para electroforesis y sobre él se han efectuado algunas modificaciones, en ensayos que describiremos más adelante.

La composición de un tampón de muestras habitual, es la siguiente:

Tampón de gel almacenador.....	25 ml.
SDS.....	2 g.
Glicerol (Merck).....	10 ml.
2-Mercaptoetanol (Merck).....	5 ml.
Azul de Bromofenol al 1% (Merck).....	0.1 ml.

Se completa hasta 100 ml. y se conserva en un frasco herméticamente cerrado.

Antes de aplicar la muestra en los pocillos del gel, se disuelve en tampón de muestra de modo que la concentración final no sea inferior a 1 mg./ml. y el vial se introduce en un baño de María o ebullidor a 100 °C durante 2 a 5 minutos. Después se deja enfriar a temperatura ambiente.

Como marcadores de peso molecular emplearemos una mezcla de proteínas de peso molecular conocido, que la casa Sigma provee especialmente con este fin y que antes de introducirse en el gel, habrán de procesarse del mismo modo que se describió para la

muestra problema.

Los marcadores de peso molecular empleados son los siguientes:

Lisozima :	14 300 d
β -lactoglobulina :	18 400 d
Tripsinógeno :	24 000 d
Pepsina :	34 000 d
Albúmina de huevo :	45 000 d
Albúmina bovina :	66 000 d

Se empleó también mielina como marcador (amablemente suministrada por Javier Ruiz Sanz, del departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias), en base a las proteínas insolubles que con ella aparecen (proteolípido de mielina) y cuyo comportamiento, en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes, nos interesaba conocer para la caracterización de nuestro factor proteico.

Es de hacer notar que proteínas insolubles de membrana como el proteolípido de mielina y nuestro factor proteico, tienen un mejor comportamiento en electroforesis si, una vez mezclados con el tampón de muestras, no se hierven, ya que al hervir tienden a formar agregados proteicos que aparecen como de mayor peso molecular, y que disminuyen la cantidad de proteína libre, disminuyendo la resolución.

Para comprobar el comportamiento electroforético de nuestro

factor proteico, realizamos un corrido en el que la muestra se sometió a diferentes condiciones de desnaturalización y a distintos detergentes.

3.4.6.2.1.- Condiciones desnaturalizantes

Se obtienen siguiendo el método descrito en el apartado 4.6.2, dan como resultado una completa ruptura de los puentes disulfuro, destruyendo la estructura terciaria de las proteínas y convirtiéndolas en cadenas peptídicas lineales. En uno de los pocillos se introdujo muestra problema, a la que se había aplicado este protocolo.

También se quiso comprobar el efecto desnaturalizante del calor, en ausencia de 2-mercaptoetanol (Merck) y con octilglucopiranosido (Fluka) en lugar de SDS, de modo que en uno de los pocillos se introdujo factor proteico, sometido a estas condiciones.

3.4.6.2.2.- Condiciones semidesnaturalizantes y no desnaturalizantes

En ambos casos, la muestra no es sometida a tratamiento por calor, pero cuando se desea que las condiciones sean semidesnaturalizantes, se incorporan las cantidades antes citadas de 2-mercaptoetanol. Bajo estas condiciones se procesaron tres muestras, una de mielina y otra de mezcla de proteínas marcadoras con SDS, a fin de que sirvieran de patrón y otra de la muestra problema también con SDS.

En condiciones no desnaturalizantes se procesaron otras tres muestras, una de mielina, utilizada como patrón, sin 2-mercaptoetanol y solubilizada con octil-glucopiranosido y otras dos de muestra problema, una solubilizada con octil-glucopiranosido y otra con SDS.

3.4.6.3.- Condiciones de corrido

El corrido de las muestras se realizó a una temperatura de 10 °C, refrigerando la cubeta por medio de un circuito cerrado de agua enfriada en un baño refrigerador "Selecta" y haciéndola circular con un termostatizador-agitador, de la misma marca.

Se invirtieron tres horas y media en el proceso, suministrando una intensidad constante de 60 mA, con una fuente de alimentación LKB 2303 MultiDrive XL.

Acabada la electroforesis, se separa el gel del vidrio y se deja fijándose en una solución compuesta por metanol:acético:agua (50:10:40), durante toda la noche.

3.4.6.4.- Tinción del gel

Hemos empleado una técnica de tinción con plata, muy sensible para detectar la presencia de los péptidos en geles de poliacrilamida, descrita por Oakley y col., en 1980, que consta de los siguientes pasos:

- El gel ya fijado se introduce en una solución mordiente, compuesta por un 5% de glutaraldehído (Merck) en agua bidestilada. En ella se mantiene durante 30 minutos.

- Se somete a 4 lavados de 10 minutos cada uno, en 200 a 300 ml. de agua bidestilada, agitando suavemente.

- Seguidamente se adiciona una solución recién preparada de plata amoniacal compuesta por los siguientes reactivos:

NaOH.....80 mg.
NH₄OH..4.....1.4 ml.
Agua destilada.....20 ml.

La sosa se disuelve en el agua en agitación constante y el amoniaco se añade poco a poco.

AgNO₃800 mg.
Agua destilada.....4 ml.

Se añade poco a poco al matraz anterior, evitando que precipite. Finalmente se adiciona agua destilada hasta completar 100 ml.

- En esta solución se mantiene el gel durante 10 minutos, en agitación suave.

- Se elimina la solución de tinción transcurrido este tiempo y se somete a dos lavados de 10 minutos cada uno, con agua

destilada.

- A continuación se mantiene en la solución de revelador hasta que las bandas aparecen en toda su intensidad, esta solución está compuesta por:

Acido cítrico.....5 mg.
Formaldehido(36%) (Merck)..25 µl.
Agua destilada.....100 ml.

- La tinción se detiene lavando tres veces en agua destilada y se fija introduciendo el gel en fijador ácido Kodak, durante un minuto.

Otro método de tinción empleado, que tiene la peculiaridad de teñir de distinto color cada proteína atendiendo a su composición, es el descrito por Adams y Sammons (1981), tiene además la ventaja de ser más rápido y por ello ha sido el método más comúnmente aplicado. Consta de los siguientes pasos:

- Tras el corrido, ha de fijarse el gel durante dos horas en una solución compuesta por etanol:acético:agua (50:10:40)

- El siguiente paso es realizar tres lavados de una hora cada uno con agua destilada.

- Se tiñe a continuación el gel con una solución de nitrato de plata al 0.19%, prepárense 250 ml. de ésta disolviendo en agua

0.475 g. de nitrato de plata. En ella se mantiene durante una hora.

- Acabada la tinción se lava con agua destilada durante 10 a 20 segundos.

- A continuación se mantiene durante diez minutos en una solución reductora compuesta por:

Formaldehido (36%) (Merck).....	1.875 ml.
NaOH.....	7.5 g.
Agua destilada.....	250 ml.

Es recomendable no añadir el formol hasta el momento en que se vaya a sumergir el gel.

- Serguidamente someter el gel a dos tratamientos, de una hora cada uno, con una solución intensificadora de color, de carbonato sódico al 0.75%. Se recomienda preparar 600 ml. en los que se disolverán 4.5 g. de dicha sal.

- La reacción se interrumpe con un fijador que consiste en ácido acético al 5% (v/v) en agua destilada.

Las bandas se comparan con las correspondientes a las proteínas marcadoras, a fin de determinar su peso molecular, colocando el gel sobre un transiluminador. Como precaución, es recomendable tomar fotos del gel en este momento.

Los geles se conserva húmedos en el interior de bolsas de plástico selladas herméticamente, con la ayuda de un sellador de bolsas "Vacupacks" (Krupps).

3.4.7.- Determinación del punto isoeléctrico.

Se eligió realizar esta determinación por isoelectroenfoque en geles de agarosa, a cuya matriz se añade detergente para favorecer la solubilización de proteínas difícilmente hidrosolubles, son fáciles de preparar, no presentan turbidez y al ser químicamente inertes, no resulta nocivo su manejo. En este caso fue empleada una cubeta horizontal de "Pharmacia" FBE 3000 y geles de 205 x 110 x 1 mm., preparados para separar péptidos con puntos isoeléctricos comprendidos entre 3 y 10.

3.4.7.1.- Preparación del gel de agarosa

Los geles se prepararon de acuerdo con las técnicas descritas en el libro "Isoelectric Focusing. Principles and Methods", editado por Pharmacia Fine Chemicals, añadiéndose un 2% de detergente con el fin de solubilizar la muestra.

El gel se prepara sobre una lámina de poliéster hidófilo (GelBond, Pharmacia), que con 2 ml. de agua destilada, se ha fijado por capilaridad sobre una plancha perfectamente nivelada a la horizontal. Con un par de toallas de papel, colocadas encima de la lámina de poliéster, sobre las que se pasa un rodillo de goma, se seca el alcohol sobrante, se retiran las toallas y entonces se ajusta sobre dicha lámina un marco de metacrilato, de

5 mm. de grosor, que servirá de molde al gel.

El gel se ha de calentar al baño de María para disolver sus componentes, una vez se hayan disuelto y la temperatura de la mezcla haya bajado hasta los 75 °C, pueden añadirse los anfolitos y el detergente, mezclándolos bien y vertiendo la disolución en el molde antes preparado. A los pocos minutos puede pasarse una cuchilla de escalpelo alrededor del gel y levantar con cuidado el molde, pero este gel aún no se puede usar, es preciso dejarlo endurecer durante una hora, a 4 °C, en el interior de una caja de plástico cerrada y con toallas húmedas en su fondo.

Los componentes de un gel de agarosa, preparado para realizar en él el isoelectroenfoque de una proteína poco hidrosoluble, cuyo pI se encuentre entre 3 y 10, son los siguientes:

Agarosa para IEF.....	0.26 g.
Sorbitol.....	3.14 g.
Agua destilada.....	23.53 ml.
Anfolitos (Pharmalite, Pharmacia)....	1.65 ml.
Octil-glucopiranósido (Fluka).....	0.522 g.

Cuando el gel ha endurecido y se encuentra listo para el isoelectroenfoque, se traslada a la cubeta horizontal FBE-300 (Pharmacia) y se fija por capilaridad al depositar 2 ml. de agua destilada en el centro de la cubeta, que se hacen extender bajo el GelBond, desplazándolo suavemente con movimientos laterales hasta eliminar las burbujas de aire atrapadas. El agua sobrante se seca con trozos de papel de filtro, aplicados al borde de la

lámina de poliéster.

3.4.7.2.- Preparación y montaje de los electrodos.

Directamente sobre el gel, a lo largo de los lados mayores de éste y próximos al borde, es preciso situar dos esponjillas de 6 x 10 mm. de sección transversal, una para el ánodo y otra para el cátodo, empapadas en las soluciones correspondientes:

Ánodo.....H₂SO₄ 0.052M 4

Cátodo.....NaOH 1 M

Antes de colocarlas sobre el gel es necesario secarlas intensamente, envolviéndolas en papel de filtro y presionándolas varias veces hasta que dejen de humedecer el papel.

3.4.7.3.- Preparación de la muestra

La muestra ha de contar al menos con 16 µg. de proteína, para que las bandas sean visibles en este tipo de pruebas. En el caso que nos ocupa, será preciso además que la proteína se sonique en una solución al 2% de octil-glucopiranosido (Fluka), durante al menos dos minutos, en un lecho de hielo, para evitar que la temperatura suba excesivamente.

Como patrones de marcaje de punto isoeléctrico, se utilizó una mezcla de distintas proteínas, que lo presentan entre 3 y 10 y que se sirven en polvo liofilizado y en las proporciones adecuadas por la casa Pharmacia.

Dichos marcadores y sus respectivos puntos isoeléctricos son:

Amiloglucosidasa.....	3.50
Inhibidor de la tripsina de soja.....	4.55
β -lactoglobulina A.....	5.20
Anhidrasa carbónica bovina B.....	5.85
Anhidrasa carbónica humana B.....	6.55
Mioglobina equina.....	6.85
Rojo de metilo (colorante visible).....	3.75
Mioglobina equina.....	7.35
Lectina de lenteja.....	8.15
Lectina de lenteja.....	8.45
Lectina de lenteja.....	8.65
Sucrosa.....	9.30

Tanto de estos marcadores, como de nuestro factor tóxico, se aplicaron 25 μ l. sobre el gel, absorbidos en pequeños rectángulos de papel 3MM, de 5 x 10 mm., en la cantidad de 16 μ g por cada una de las bandas esperadas, que se situaban en la zona central del gel. En total se emplearon 40 μ g. de nuestro factor proteico.

3.4.7.4.- Condiciones de corrido

Las condiciones en las que se realizó el isoelectroenfoque fueron las recomendadas para intervalos de punto isoeléctrico de 3 a 10, 1500 voltios y 15 watios, mantenidos durante hora y media, lo que representa entre 1500 y 2000 voltios/hora que se fijan previamente en el integrador de voltage LKB 2303 MultiDrive XL.

Transcurridos 45 minutos desde el comienzo del corrido, se detiene y los aplicadores de muestra son retirados de la superficie del gel, continuándose sin interrupción hasta el final.

3.4.7.5.- Tinción del gel

Inmediatamente después de cabado el corrido, el gel se sumerge en una solución fijadora, durante 30 minutos, compuesta por ácido sulfosalicílico al 5% y por un 10% de ácido tricloroacético y se inicia el proceso de tinción de acuerdo con los siguientes pasos:

- Inmersión en una solución de destinción, compuesta por metanol:ácido acético:agua destilada, en las proporciones 3:1:6, durante 25 minutos. Pasado este tiempo, se cambia la solución por otra igual y se mantiene otros 25 minutos.

- A continuación se seca el gel colocando sobre él una hoja de papel 3MM de su mismo tamaño y varias toallas de papel, sobre ellas se dispone un cristal y encima de éste un peso de un kilogramo, aproximadamente. Transcurridos 15 minutos, todo esto se retira y el secado se completa con un secador de pelo.

- El siguiente paso es mantener el gel durante 10 a 15 minutos en una solución de tinción consistente en Azul Coomassie R-250 al 0.2% en metanol:ácido acético:agua destilada, en las proporciones 3:1:6. Esta solución ha de ser filtrada a través de papel de filtro.

- Desteñir en solución de destinción hasta obtener un fondo claro. Este paso suele durar de 15 a 30 minutos y se realiza agitando suavemente el recipiente y cambiando la solución cuantas veces sea preciso.

- El gel es finalmente secado con un secador de pelo.

Al estar seco y adherido a la lámina de poliéster, no precisa de mayor protección, aunque resulta conveniente fotografiarlo en este momento, como medida precautoria. Las bandas se comparan con las correspondientes a las proteínas marcadoras para determinar su punto isoeléctrico, para ello se coloca el gel sobre un transiluminador.

Otra técnica de tinción empleada fue la descrita por Porro y col. en 1982, una tinción con sales de plata, muy sensible para geles de agarosa.

Se aplica sobre geles secados inmediatamente después de acabado el electroenfoque, por el procedimiento anteriormente descrito, que se fijan seguidamente en una solución de glutaraldehído al 5% v/v, durante 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se dejan teñir durante 5 a 10 minutos, en una solución de diamina de plata al 0.2% p/v que consta de los siguientes componentes:

NaOH al 0.36% p/v.....42 ml.

NH OH al 28%.....2.8 ml.

NO Ag al 20% p/v.....2 ml.

Se completa hasta 200 ml. con agua destilada.

Mientras el gel se mantiene en estas soluciones es preciso que la agitación sea constante para evitar la formación de depósitos.

Si el color de fondo resulta demasiado pronunciado, puede reducirse tratando el gel con una solución de ácido acético al 10%, durante uno o dos minutos.

Por último, se lava repetidamente en agua destilada y se seca con el secador de pelo.

3.4.8.- Ensayos de citopatogenicidad

Se llevaron a cabo en placas de microtitulación, sobre células Vero, cultivadas en 200 μ l. de medio MEM suplementado con un 20% de suero, por pocillo.

Una vez sembradas las células, se mantuvieron durante 24 horas en estufa a 37 °C y 5% de CO₂, con el fin de facilitar la adherencia al sustrato. Transcurrido este tiempo, el medio fue sustituido por otro medio MEM fresco, con un 2% de S.B.F.

Tres días después, el medio fue sustituido por otro, con la misma concentración de S.B.F., que contenía distintas diluciones del factor proteico (1, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) preparadas del siguiente modo:

- Preparar una solución madre 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ disolviendo los 20 μg que contiene un vial, en 200 μl . de medio MEM suplementado con un 2% de suero.
- La dilución a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se obtiene al añadir al pocillo 30 μl de solución madre y 120 μl de medio fresco.
- La dilución de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. se obtiene añadiendo al pocillo 15 μl . de solución madre y 135 μl . de medio fresco.
- La dilución a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. es algo más compleja, se prepara llevando 10 μl de dilución madre a un volumen final de 100 μl ., añadiendo medio fresco. De esta dilución intermedia se depositan en el pocillo 15 μl ., y a ellos se adicionan los 135 μl . restantes de medio fresco, hasta completar los 150.

Algunos de los pocillos se llenaron otra vez con 150 μl . de medio fresco, con un 2% de S.B.F., a fin de que sirviesen como control.

El cultivo se observa y fotografía a las 12 , 24 y 48 horas, para seguir la evolución del efecto citopatogénico.

3.4.8.1.- Actividad permeabilizante.

Se estudia la posible actividad permeabilizante del factor proteico añadiendo en cada pocillo una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. de α -sarcina, proteína tóxica incapaz de atravesar la membrana celular, pero que si ve facilitado su paso, es capaz de matar a la célula.

Esta concentración se prepara a partir de una solución madre de 20 mg. en 2 ml. de medio MEM con un 2% de S.B.F., de la que se prepara 1 ml. de solución diluida hasta la concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$., añadiendo 10 μl . de solución madre a 990 μl . de medio fresco.

De esta dilución final se tomarán 30 μl . que se añadirán a cada pocillo, descontando esta cantidad de los microlitros de medio fresco que hubiese que añadir para completar los 150 por pocillo, esto sin alterar las cantidades de factor proteico que haya que depositar en cada pocillo, para obtener las mismas diluciones pormenorizadas en el apartado anterior.

Igualmente, el proceso se sigue al microscopio invertido, fotografiándose cada 12, 24 y 48 horas.

RESULTADOS

4.1.- Obtención del factor proteico sobre filtros de nitrocelulosa

Cultivadas las acantamebas en ausencia de otras proteínas en el medio, las fijadas en los filtros de nitrocelulosa habrán de pertenecer a las amebas necesariamente. Para comprobar la adherencia de los organismos al sustrato y constatar la ausencia de alteraciones en ellos, se recurrió a la microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, ya que cada una muestra aspectos distintos de la morfología.

En cuanto a la cantidad de proteína obtenida tras solubilizar con detergente, las mediciones se realizaron por la técnica de Micro-Lowry descrita en el apartado 3.4.5.2. y los resultados se describen más adelante.

4.1.1.- Estudio al microscopio electrónico de barrido

Se ha estudiado la adherencia y aspecto de las amebas sobre nitrocelulosa a diferentes tiempos y de acuerdo con la metodología ya indicada en el apartado 3.3.1.1.

- 1 hora.

La Fig. 1 muestra una visión panorámica del aspecto del cultivo amebiano. En la Fig. 2, puede observarse un detalle a mayores aumentos.

Las Figs. 3 y 4 muestran distintos trofozoitos de

Acanthamoeba culbertsoni A-1, sobre el soporte de nitrocelulosa.

(Las flechas señalan los acantópodos).

- 12 horas.

La Fig. 5 muestra una visión panorámica de las amebas sobre el soporte de nitrocelulosa, transcurrido un plazo de 12 horas. En las Figs. 6 y 7, se observan dos trofozoitos a mayores aumentos y en la Fig. 8, un detalle que muestra la adhesión de los acantópodos al sustrato de nitrocelulosa.

- 24 horas.

La Fig. 9 muestra una visión a pequeños aumentos del cultivo, transcurridas 24 horas, apreciándose un detalle a mayores aumentos, en la Fig. 10.

Las Figs. 11, 12 y 13, muestran distintos trofozoitos adheridos a la nitrocelulosa. (Las flechas señalan acantópodos y amebostomas).

4.1.2.- Estudio a microcopía electrónica de transmisión

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.1.2., se ha estudiado la ultraestructura de las amebas a diferentes tiempos de permanencia sobre la nitrocelulosa, con los resultados que a continuación se detallan:

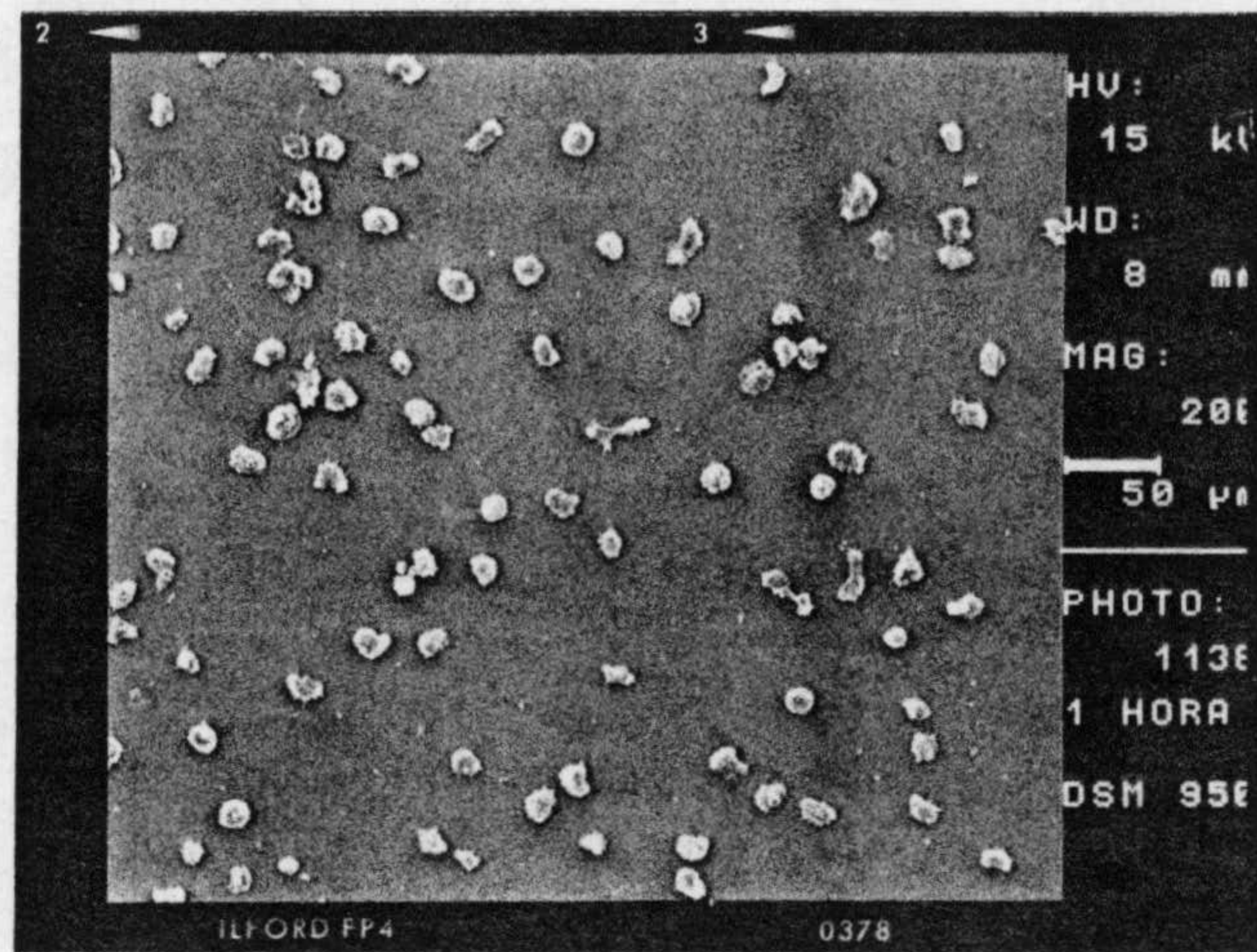


Figura 1

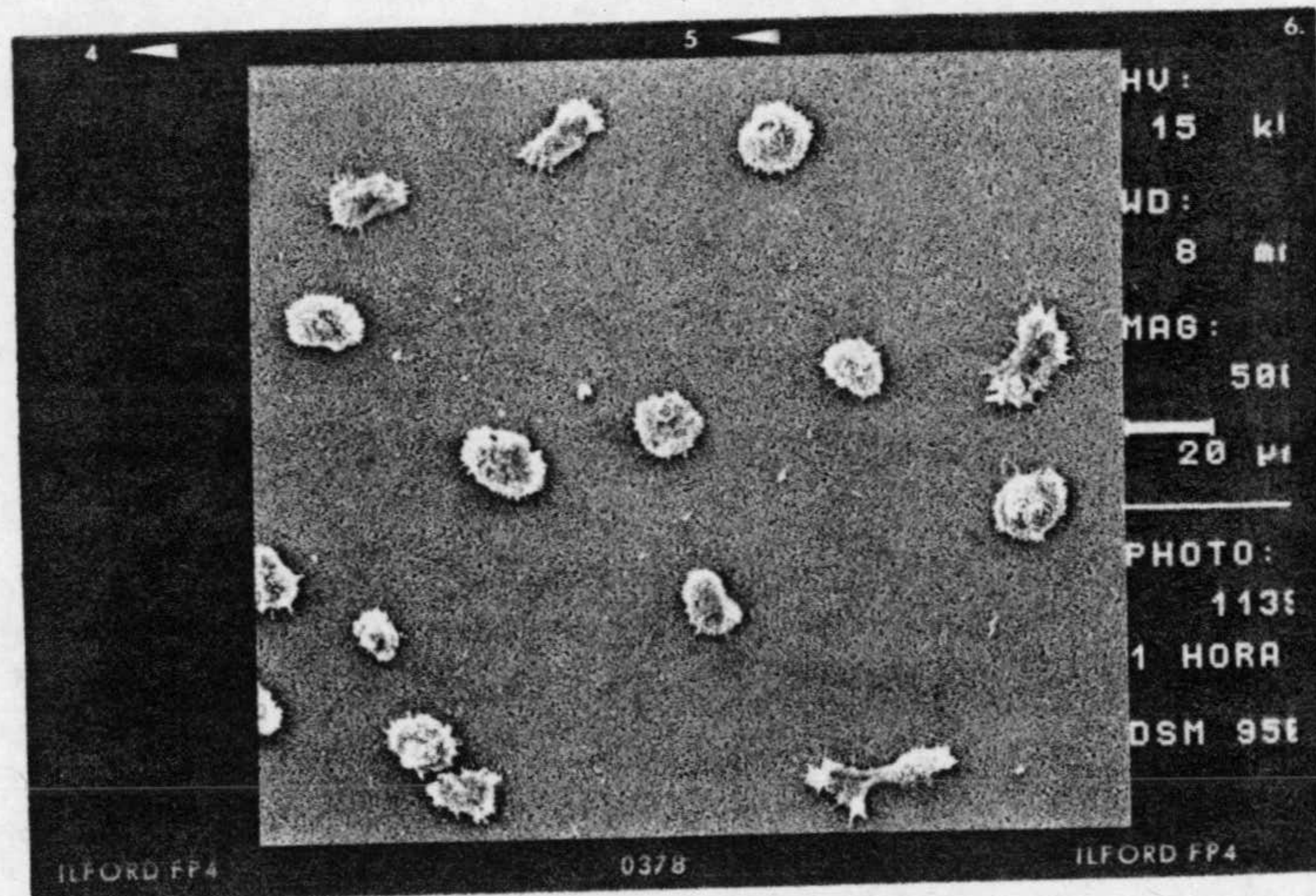


Figura 2

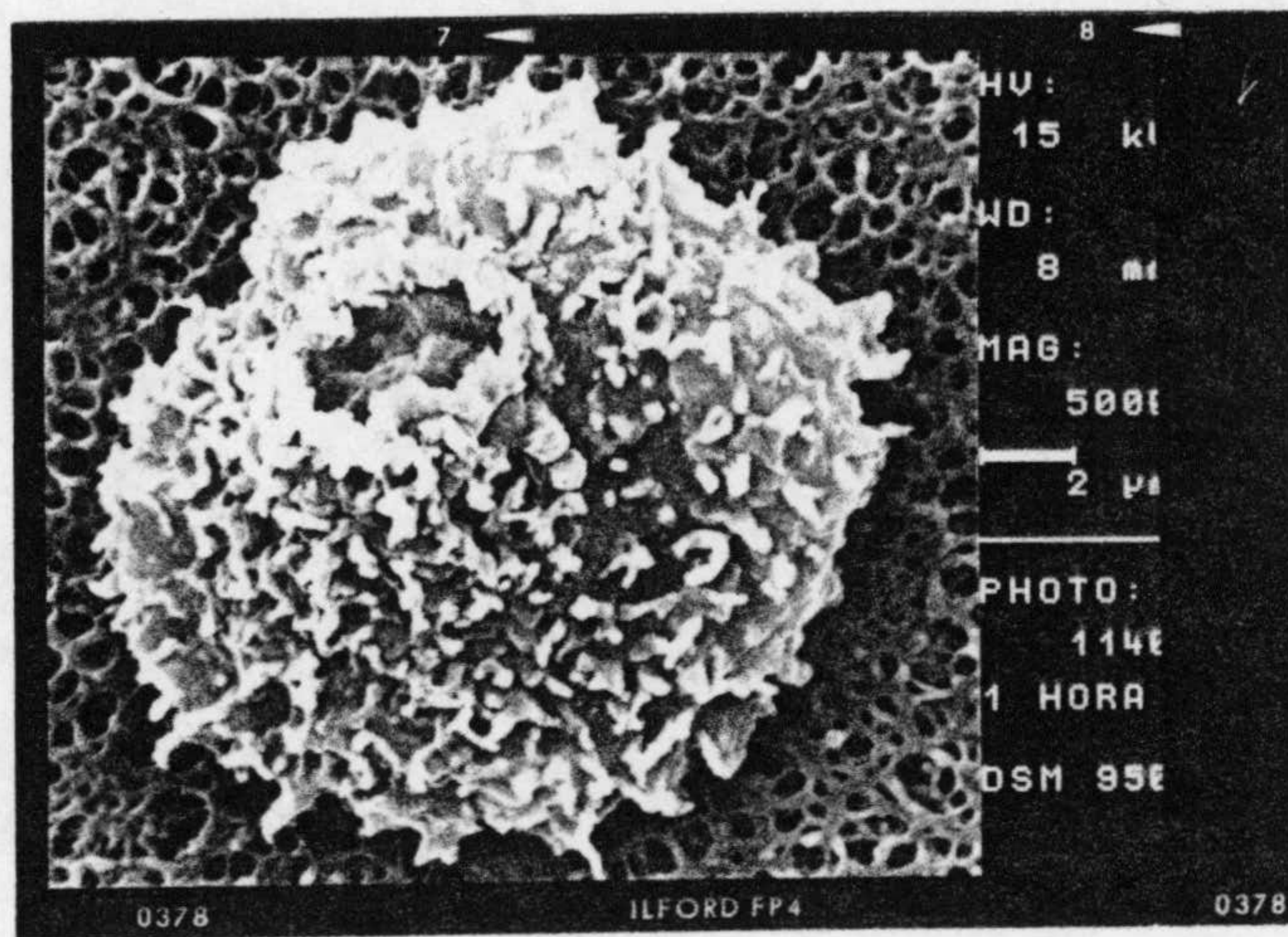


Figura 3

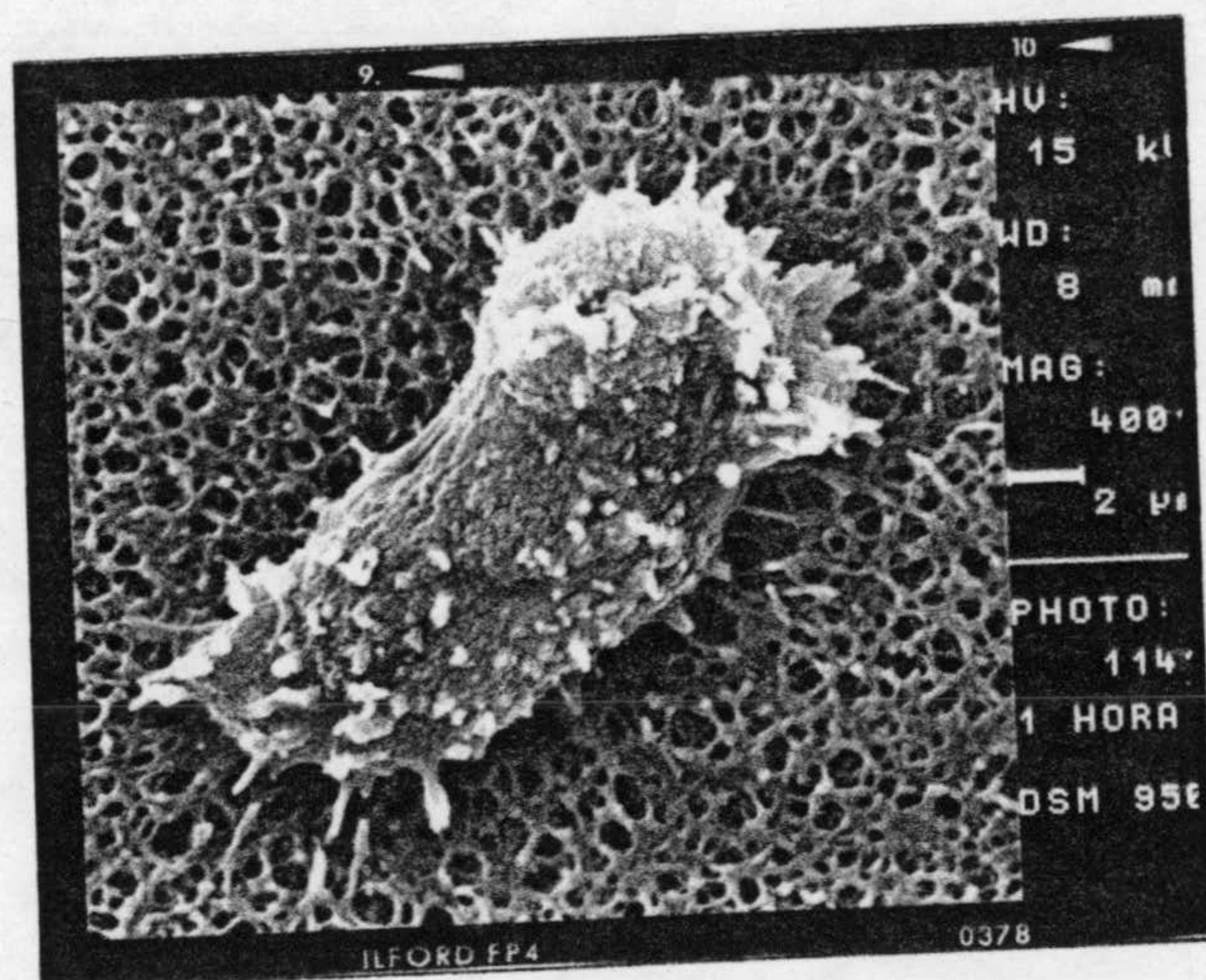


Figura 4

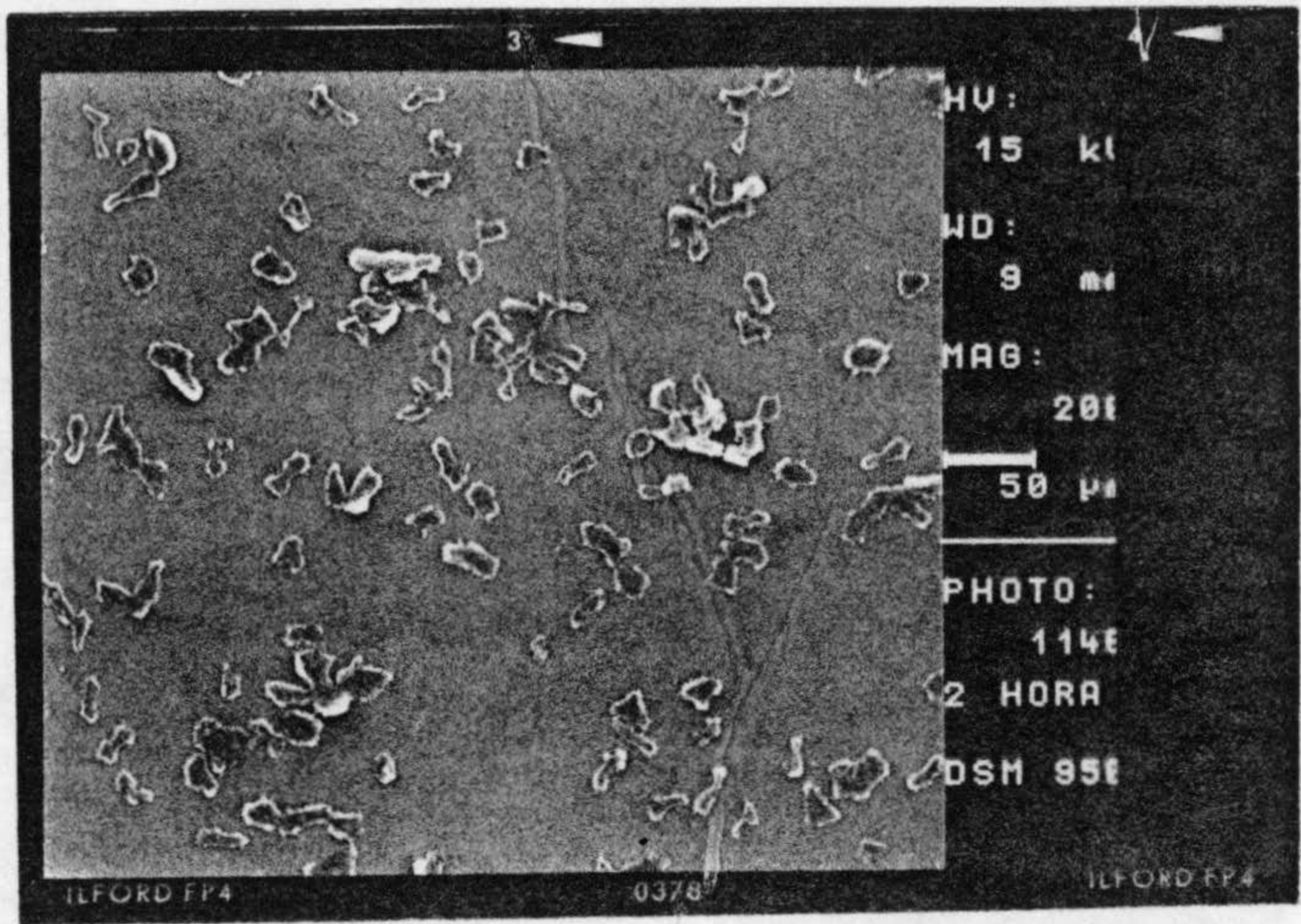


Figura 5

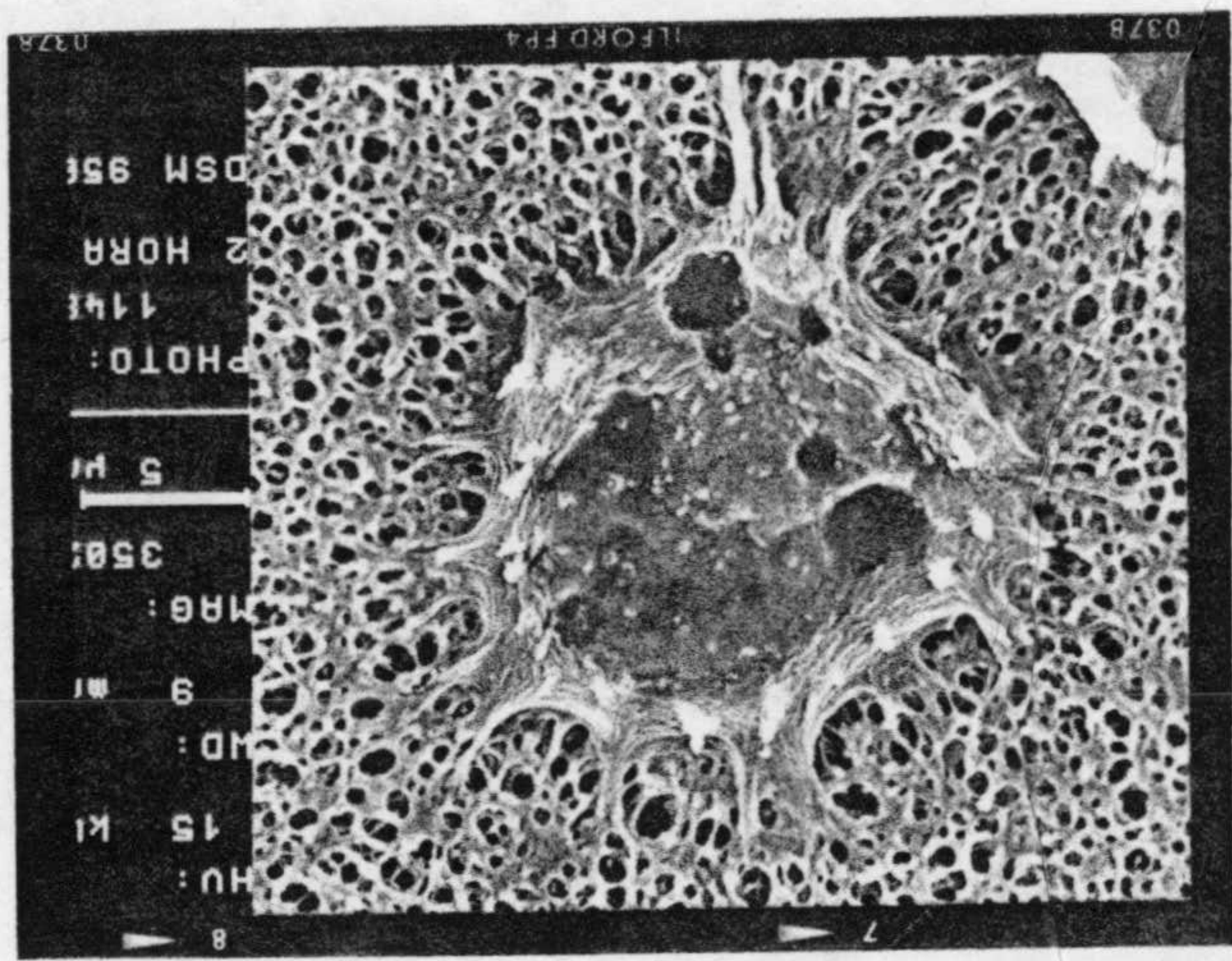


Figura 6

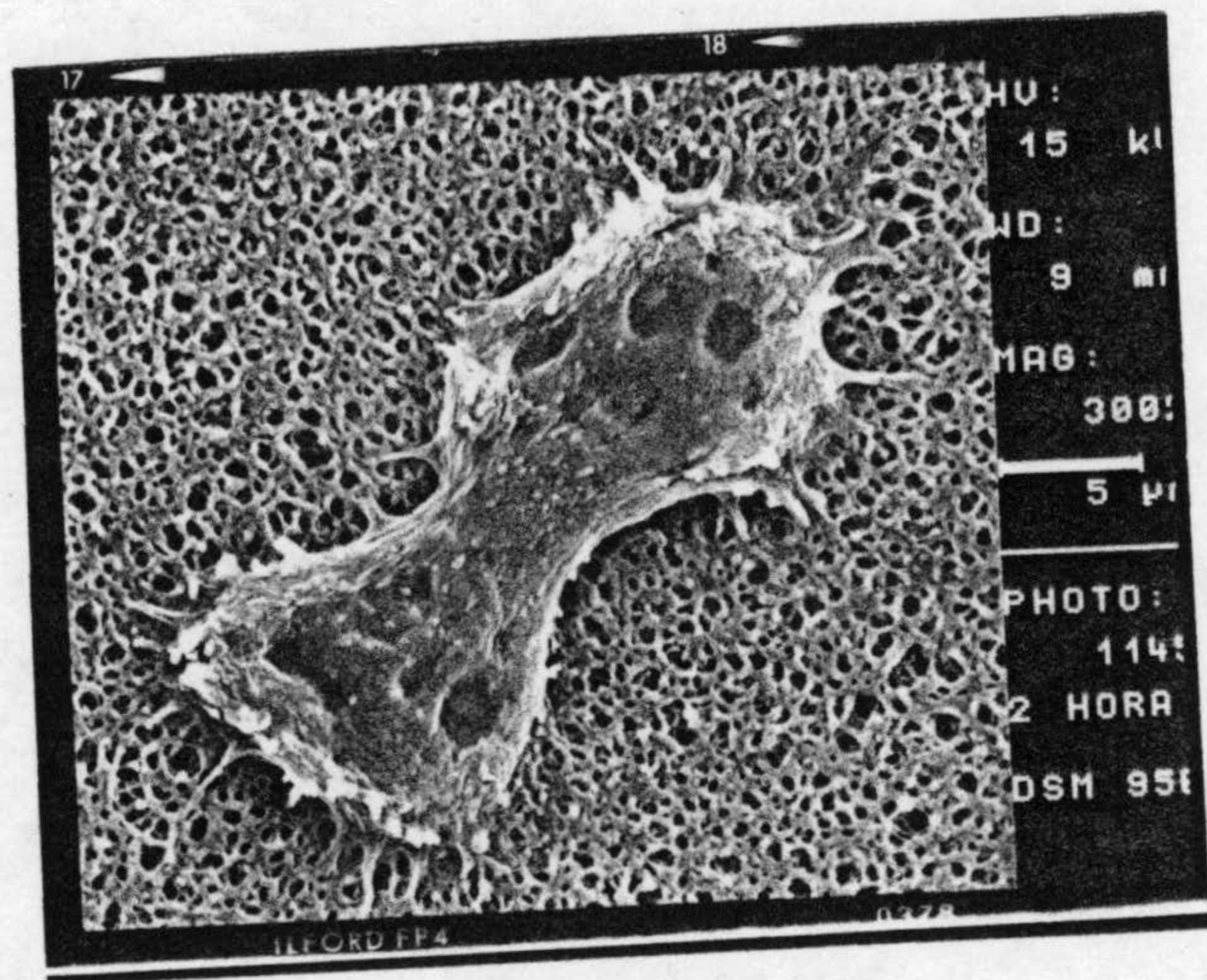


Figura 7

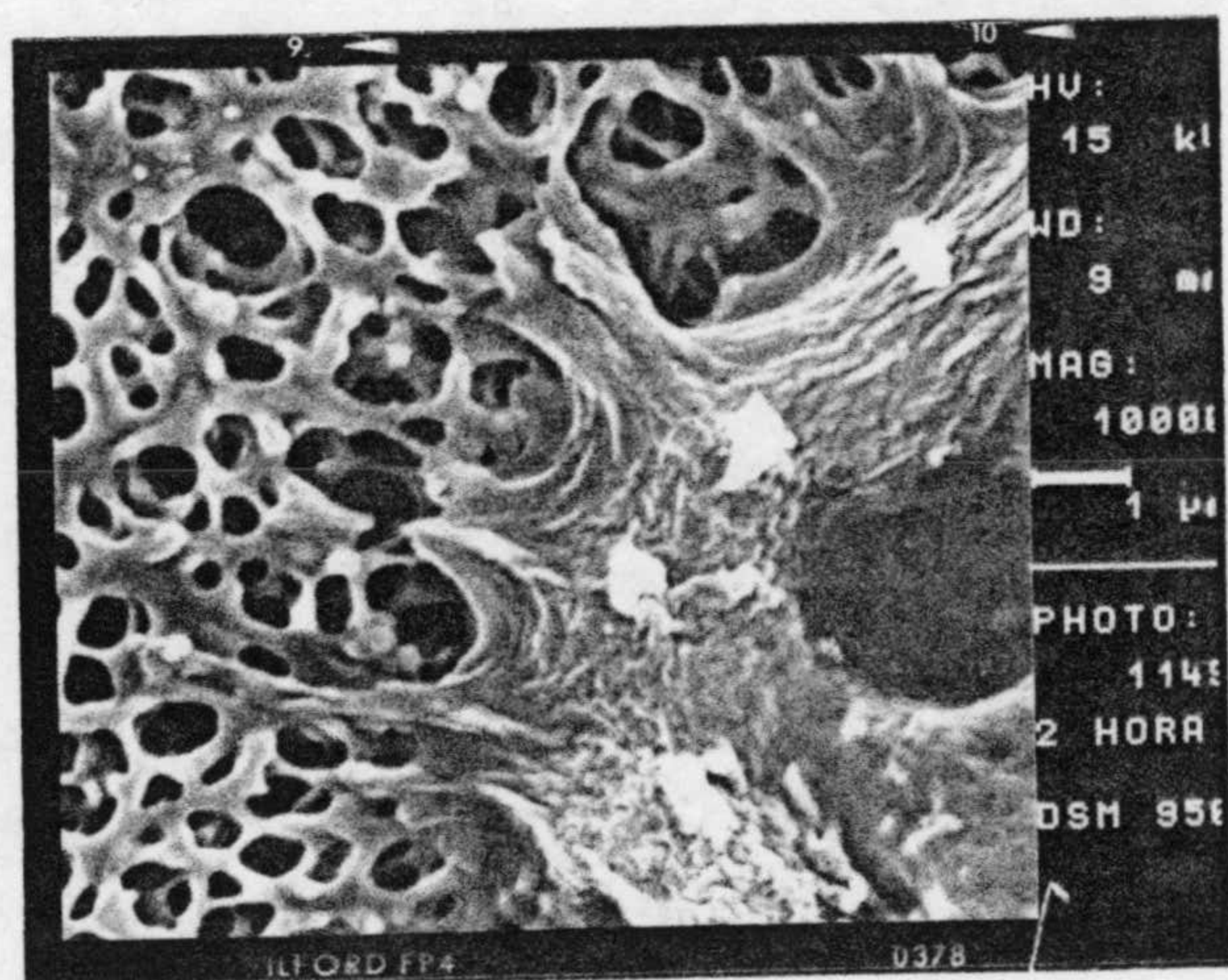


Figura 8

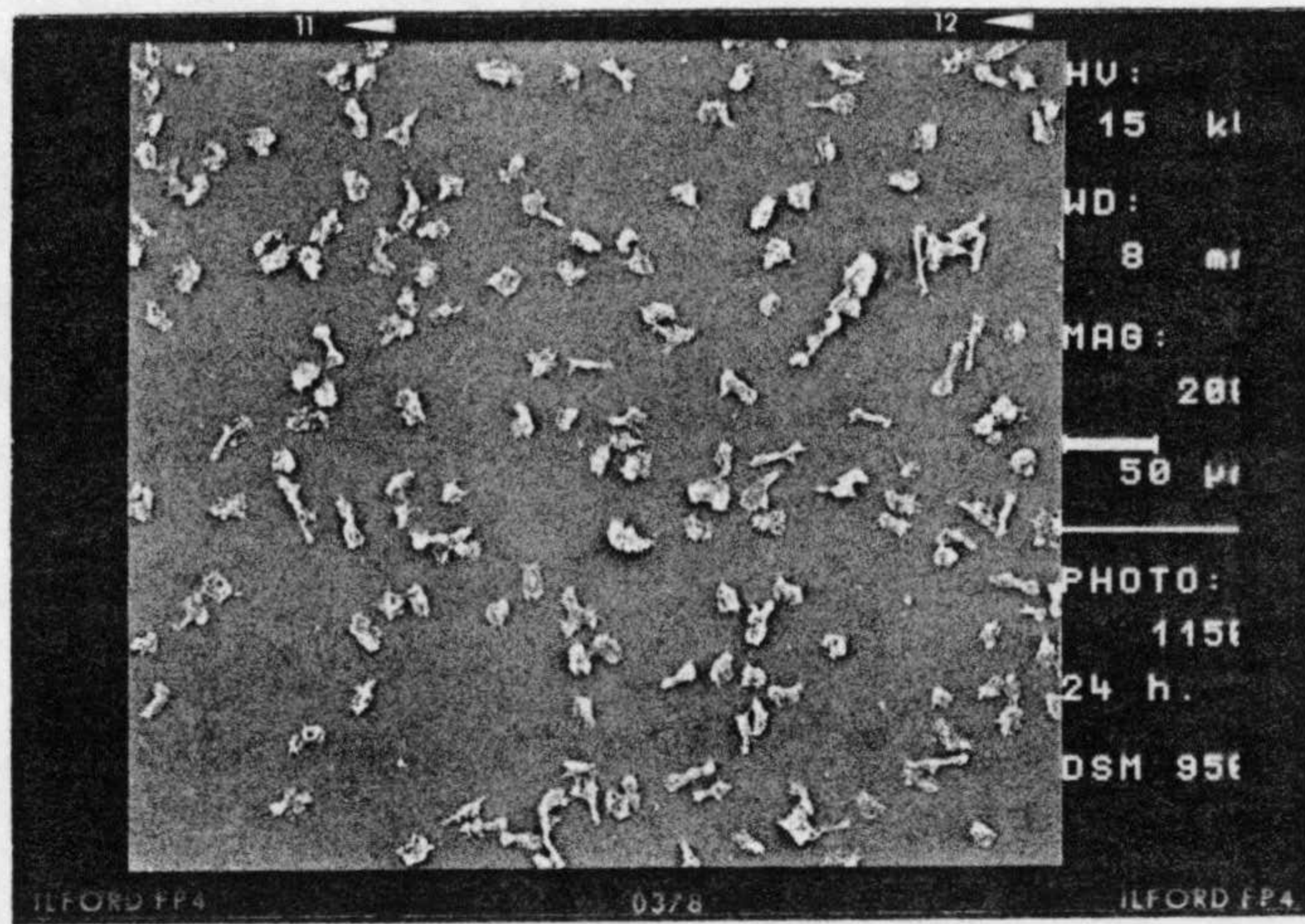


Figura 9

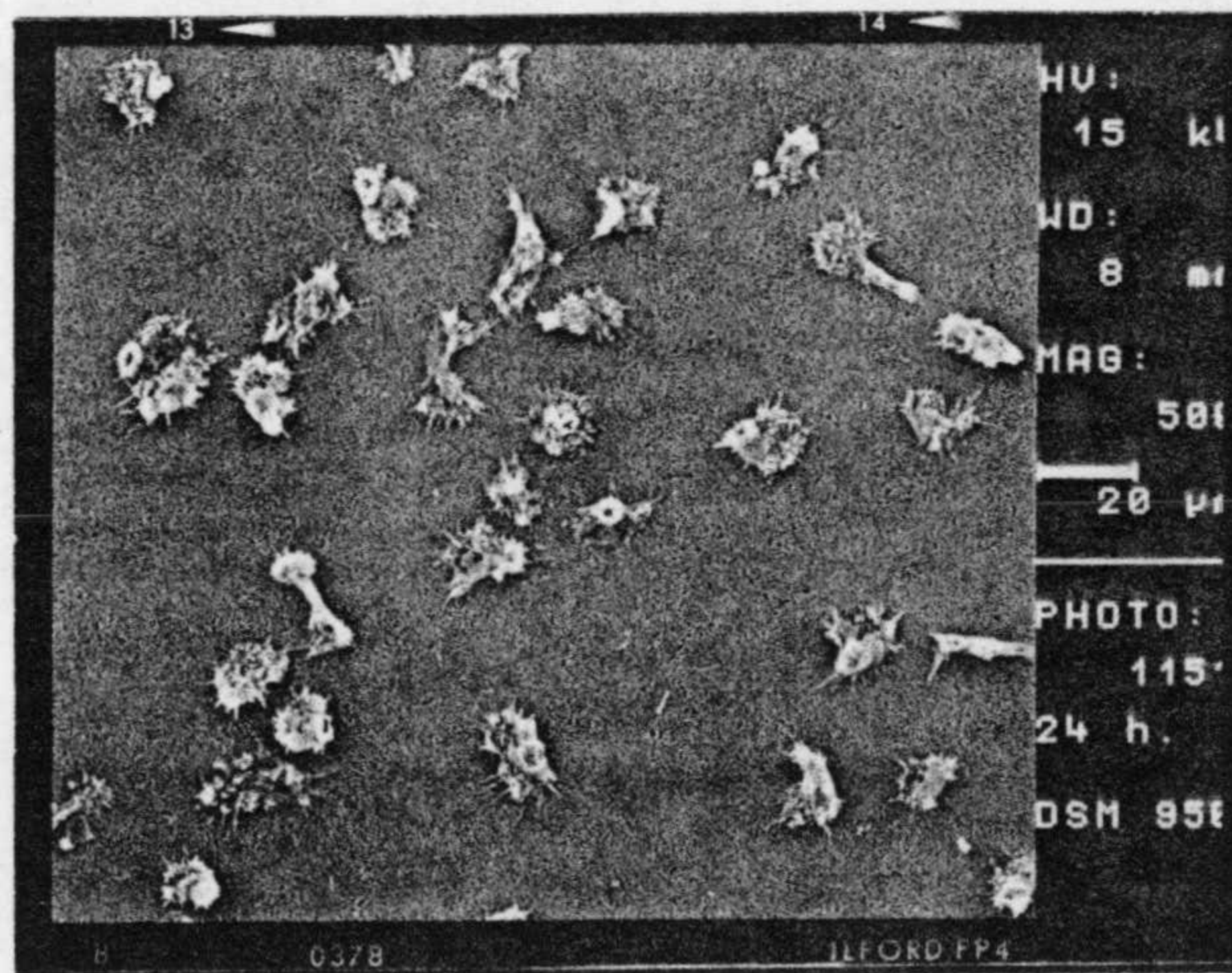


Figura 10

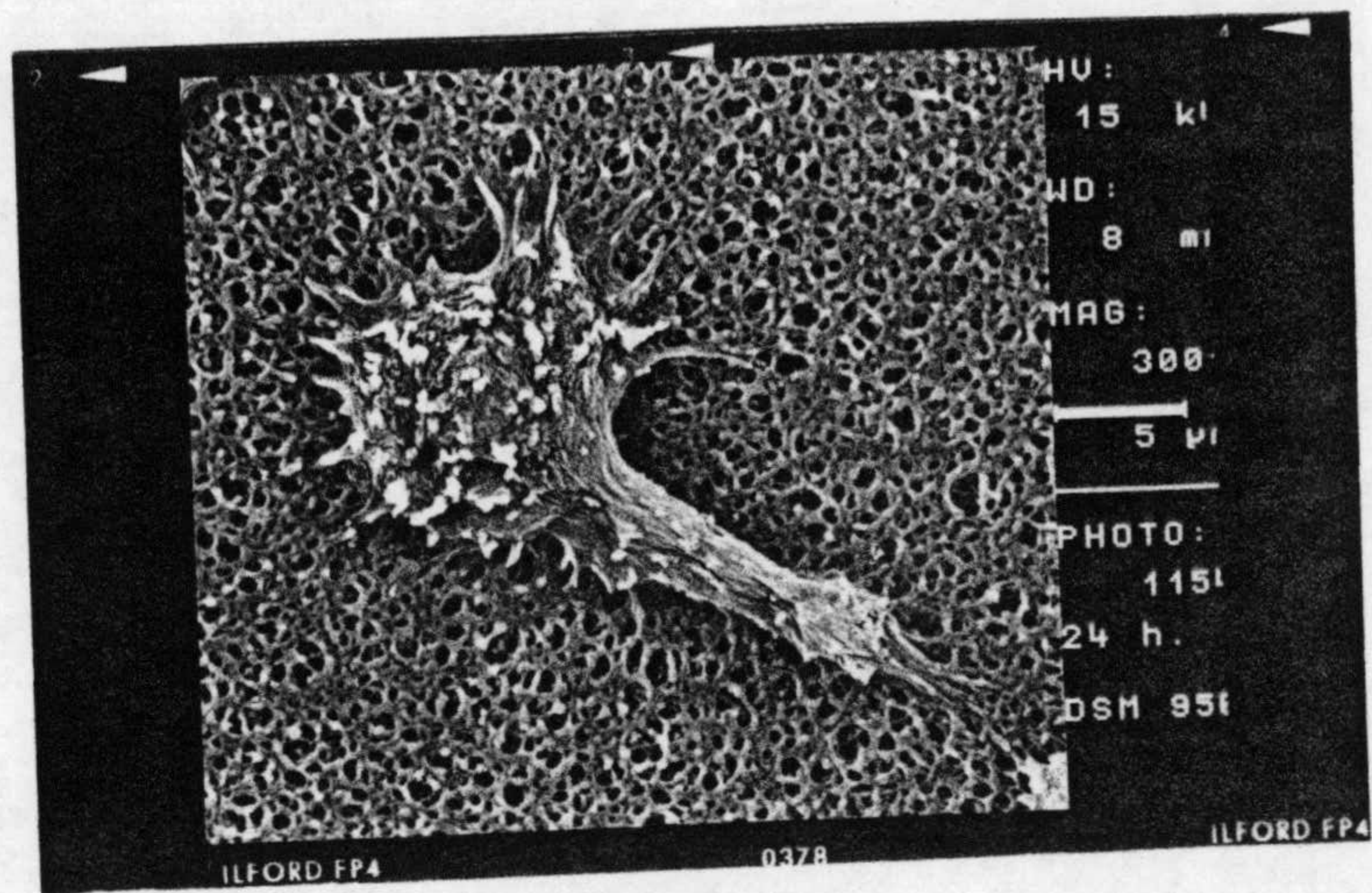


Figura 11

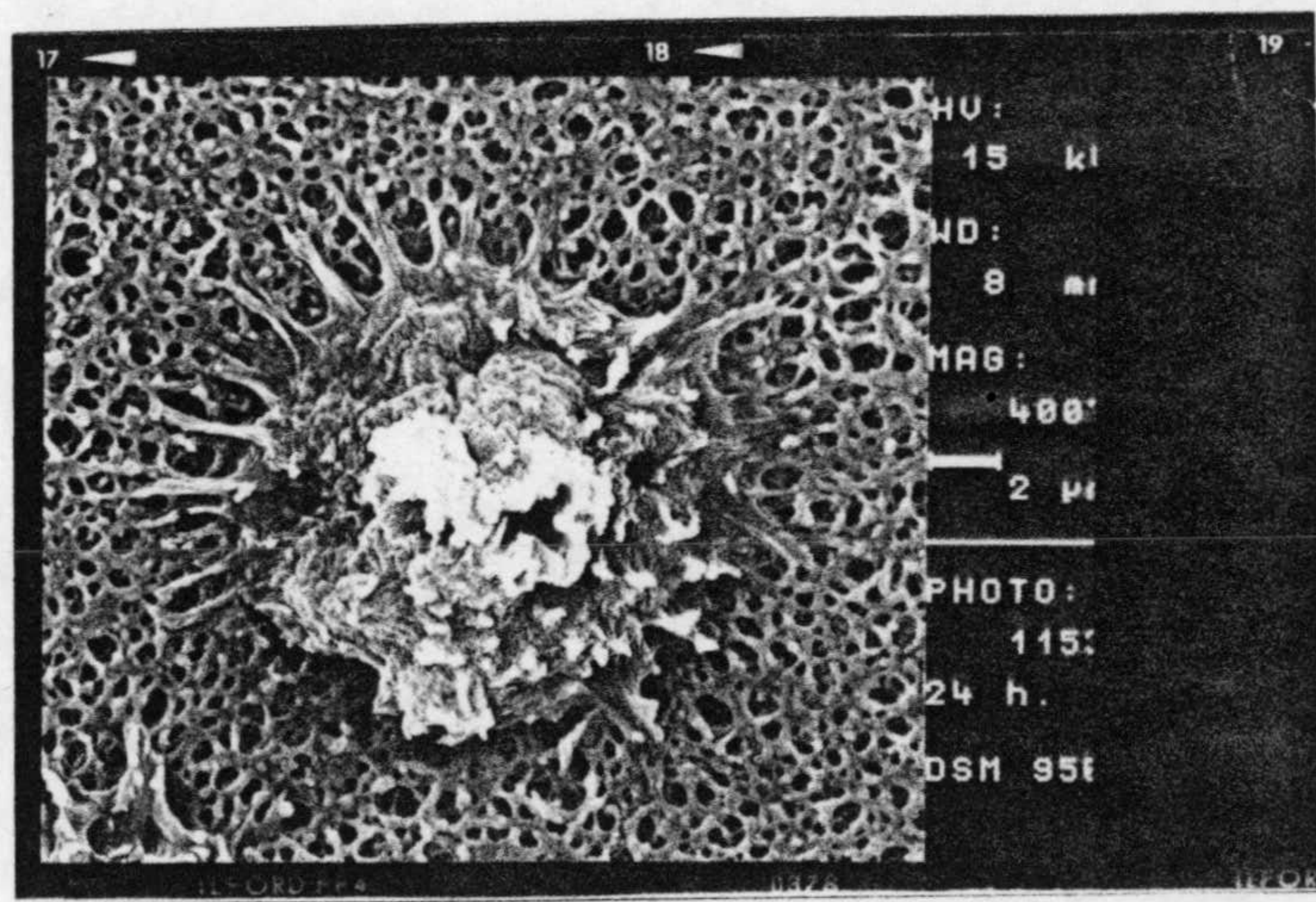


Figura 12

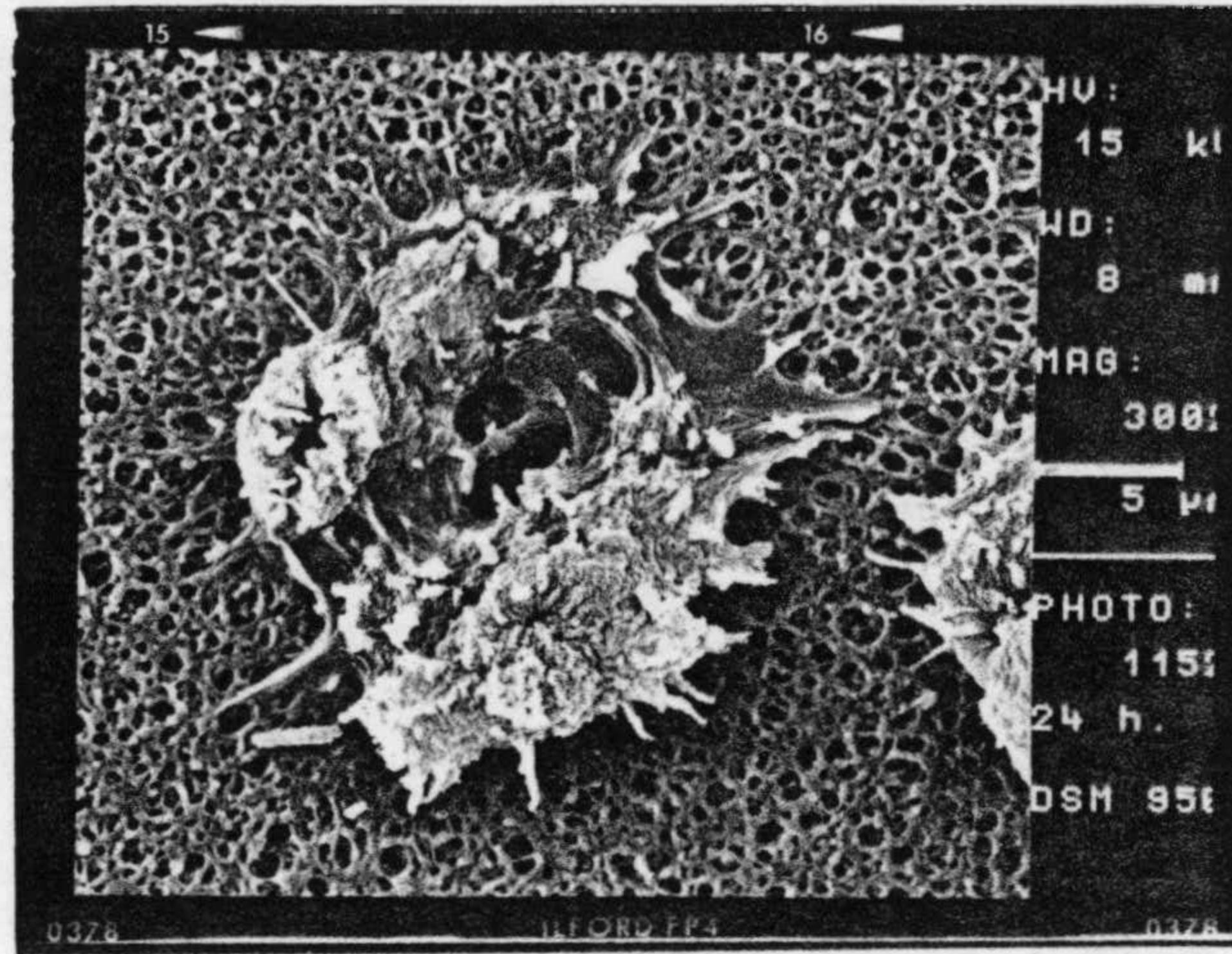


Figura 13

- 1 hora

En la Figura 14, puede apreciarse un detalle a 8000 aumentos del aspecto de las amebas, una hora después de sembrarse sobre los filtros de nitrocelulosa.

- 12 horas

Tras 12 horas de permanencia sobre los filtros de nitrocelulosa, las amebas presentan, a 10 000 aumentos, el aspecto que puede observarse en la Figura 15.

- 24 horas

El aspecto de las amebas, tras 24 horas de cultivo sobre los filtros de nitrocelulosa, puede apreciarse en la Figura 16, en la que aparecen a 15 000 aumentos

4.1.3.- Medida de la cantidad de proteína

Medimos la cantidad de proteína fijada a los filtros de nitrocelulosa y posteriormente solubilizada con octil-glucopiranosido, por medio de la técnica de Micro-Lowry descrita en el apartado 3.4.5.2, obteniéndose una lectura de +39 en el espectro fotómetro, lo que interpolado en la escala de albúmina empleada como patrón, que para 2 μg de albúmina ofrece una lectura de +22, para 4 μg , da +30 y a 8 μg le corresponde +65, nos da una concentración de proteína de 23.7 $\mu\text{g/ml.}$, que sería distribuida en viales a razón de 20 μg de proteína por cada uno.

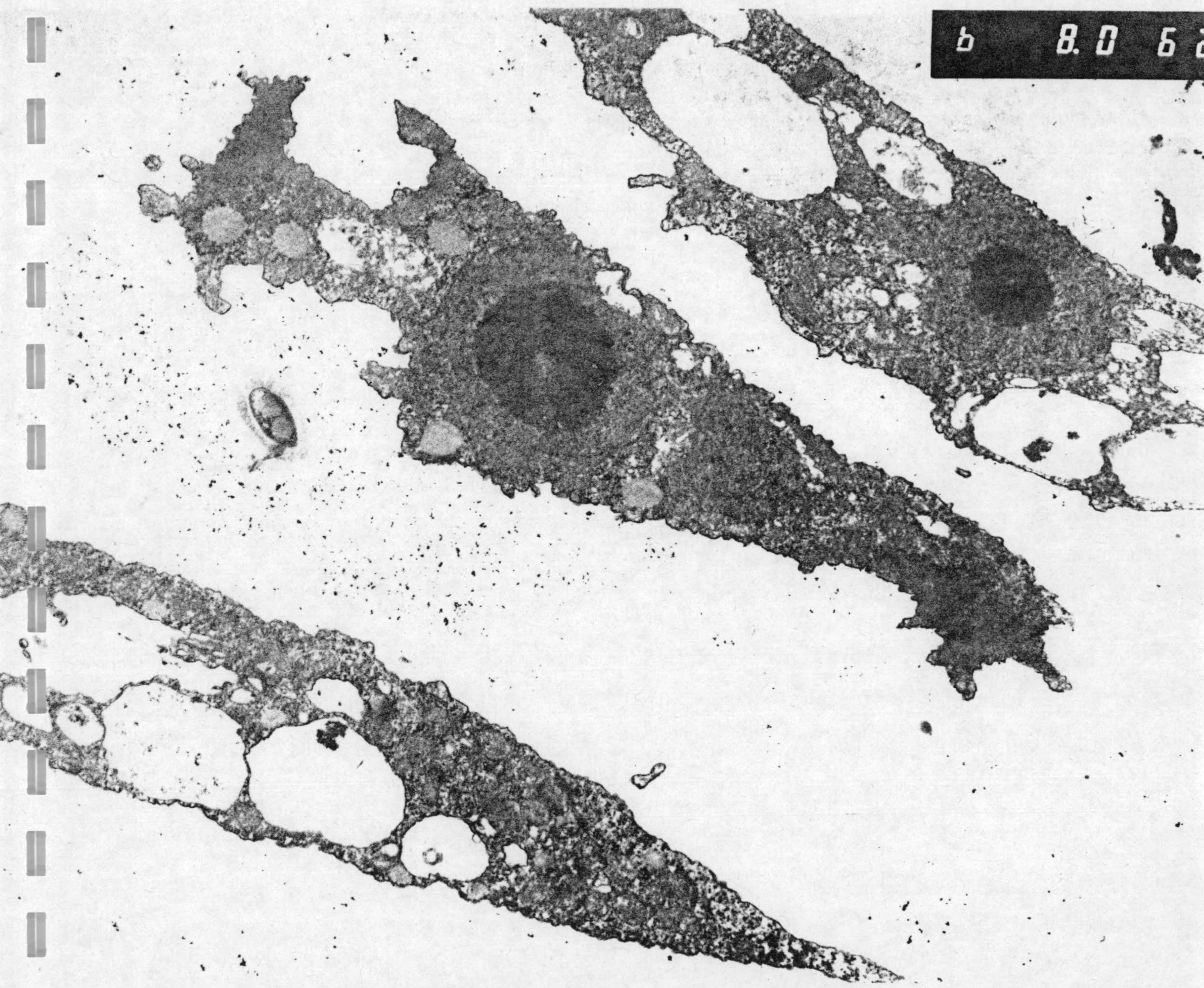


FIGURA 14



FIGURA 15

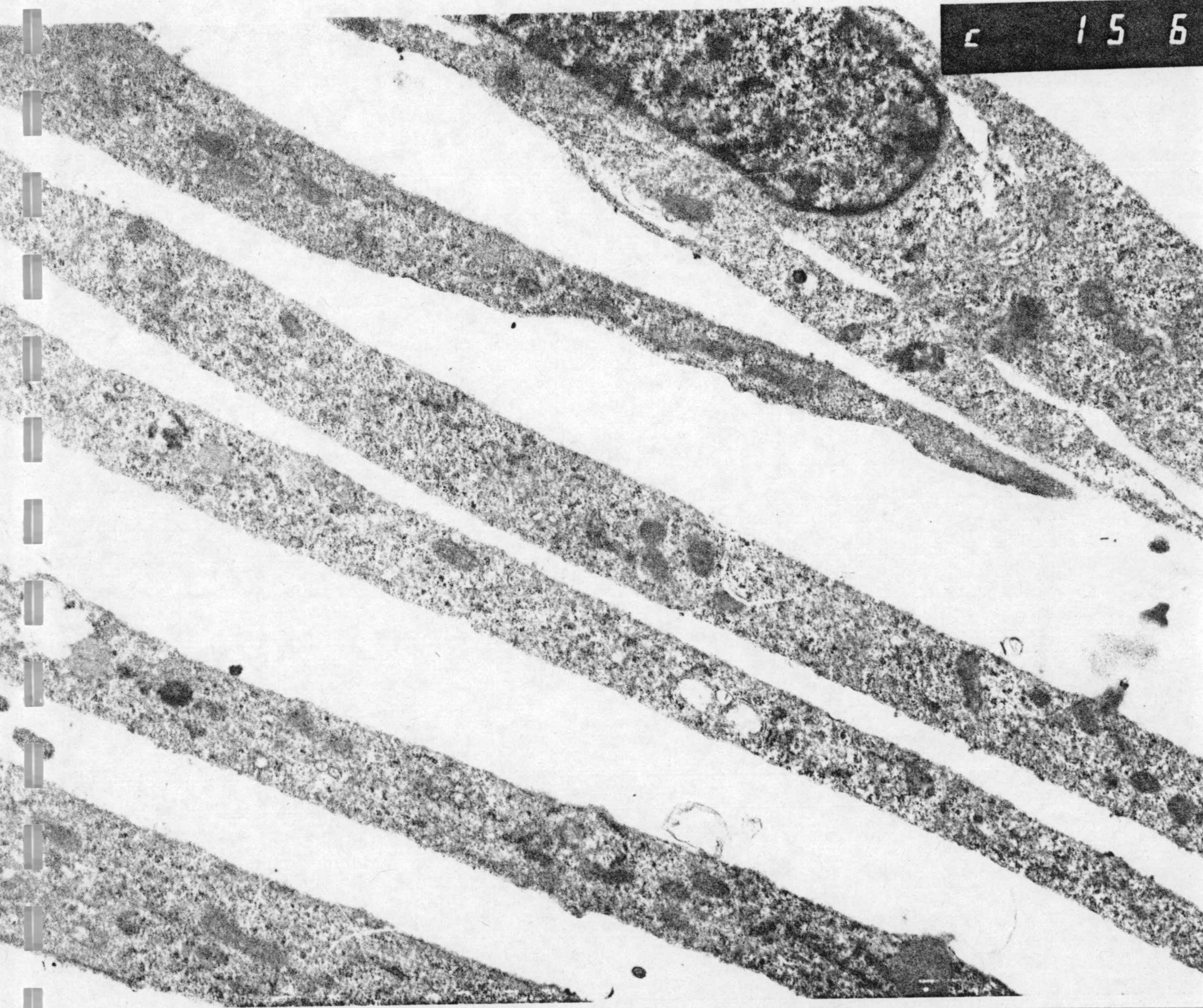


FIGURA 16

4.1.4.- Medida del peso molecular

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.6, se obtuvo una banda mayoritaria en la zona correspondiente al factor proteico amebiano (flecha), tal y como se aprecia en la Figura nº 17, cuyo peso molecular resulta ser de 65 000 d al compararla con las bandas correspondientes a las proteínas empleadas como patrón.

4.1.5.- Medida del punto isoeléctrico

Una vez aplicada la metodología descrita en el apartado 3.4.7, la tinción revela una única banda (Figura 18), situada en la zona correspondiente a un punto isoeléctrico de 4.2 (flecha), al interpolar entre las bandas correspondientes a los marcadores empleados.

4.1.6.- Ensayos de citopatogenicidad.

Tras 12, 24 y 48 horas de interacción con 1 µg/ml de factor proteico, el aspecto que presentan los cultivos de células Vero, a 400 aumentos, se reproduce en las figuras 19, 20 y 21, siendo la figura 22 el aspecto que presenta el control.

En las figuras 23, 24 y 25 aparece el aspecto de las células, a los mismos aumentos, tras los mismos tiempos de interacción con 10 µg/ml de factor proteico. La figura 26 corresponde al control.

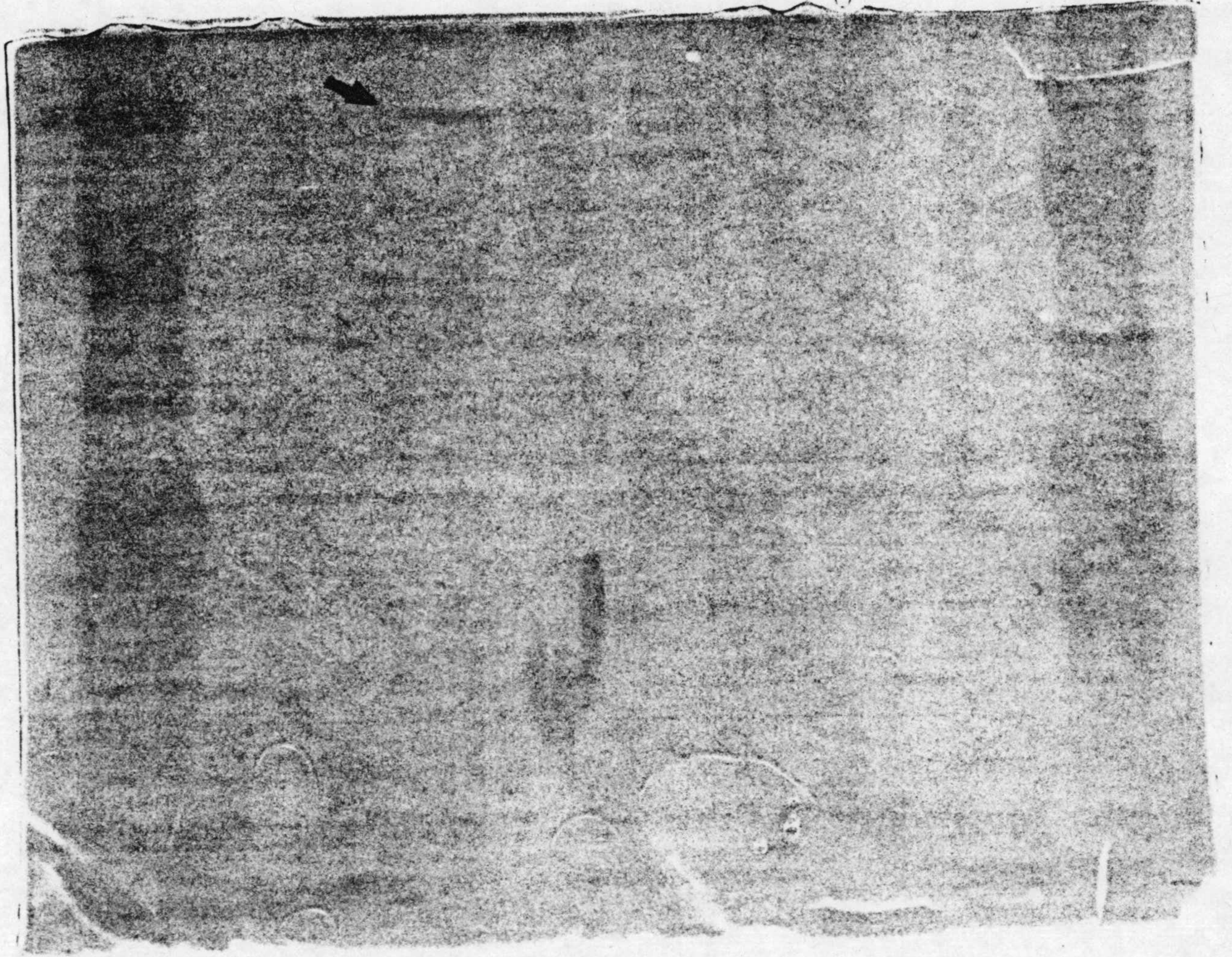


FIGURA 17



FIGURA 18

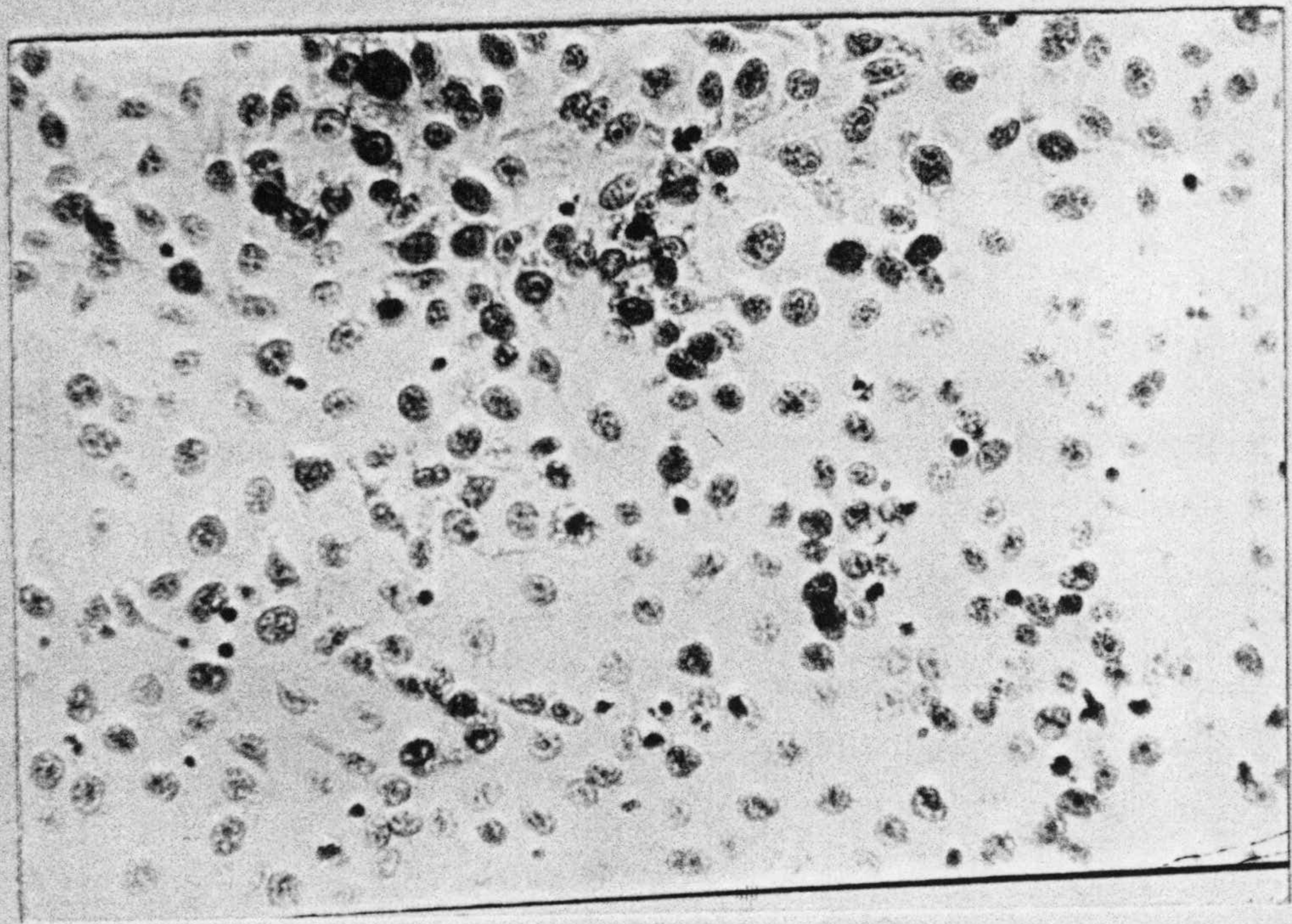


Figura 19

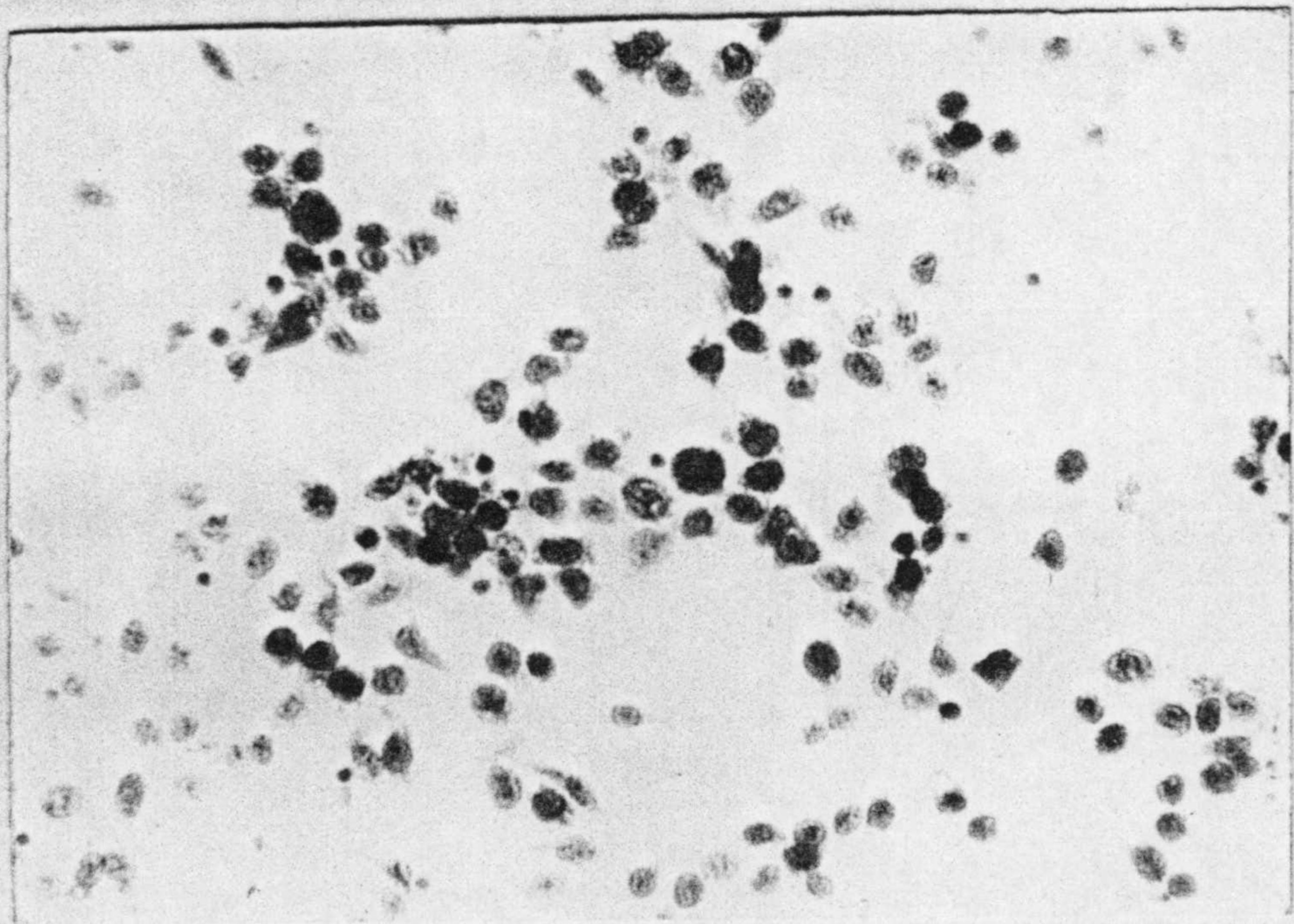


Figura 20

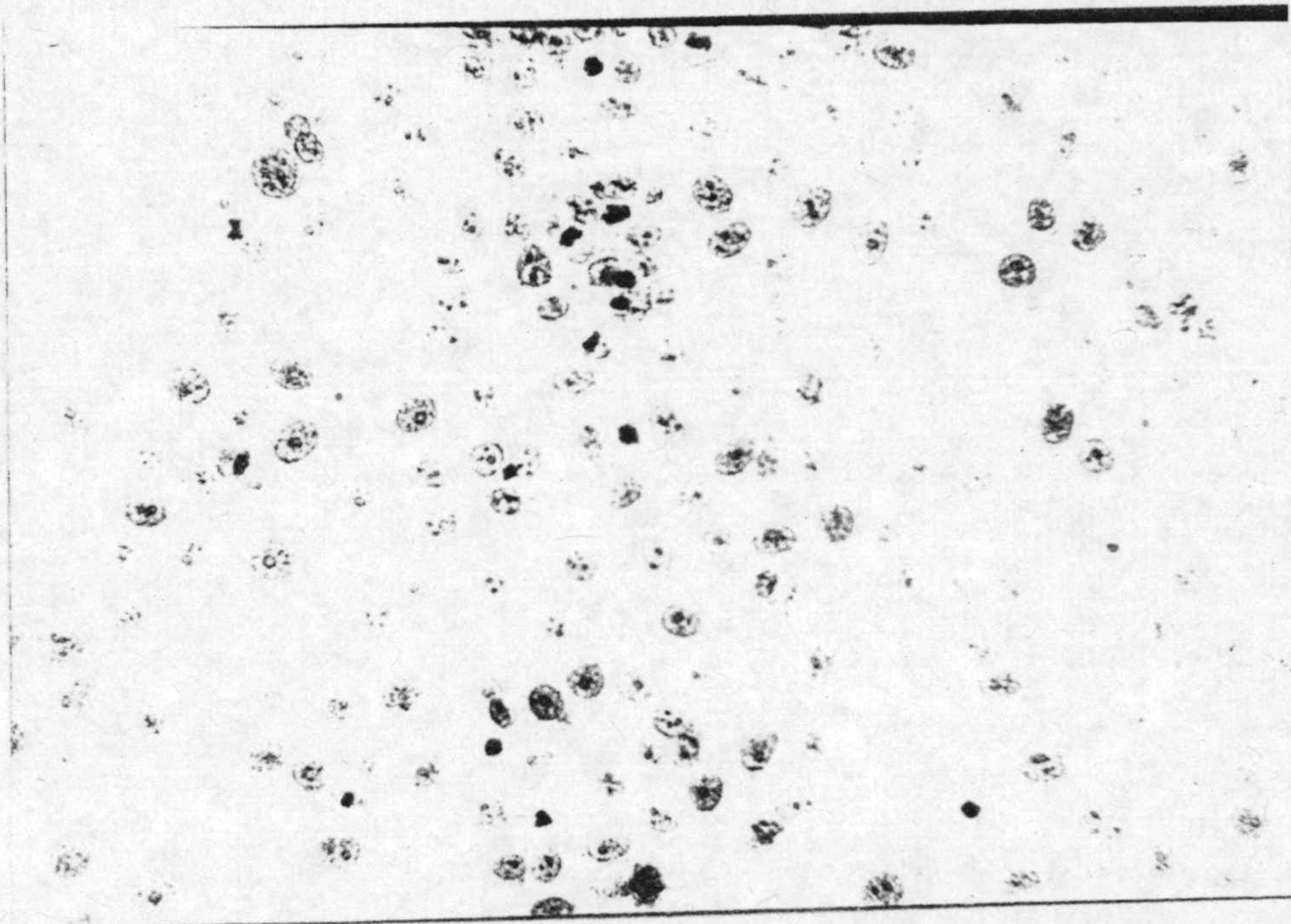


Figura 21

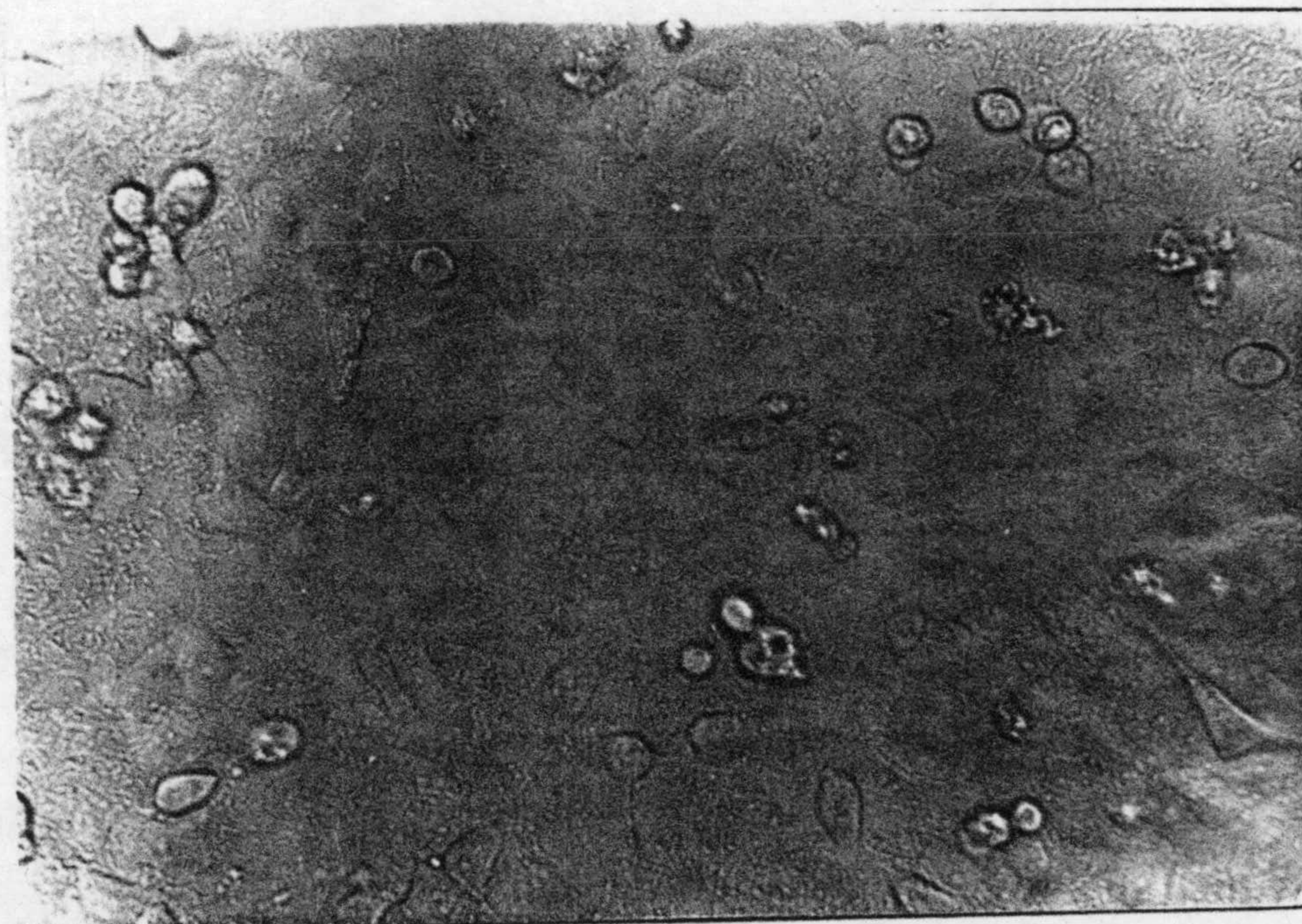


Figura 22

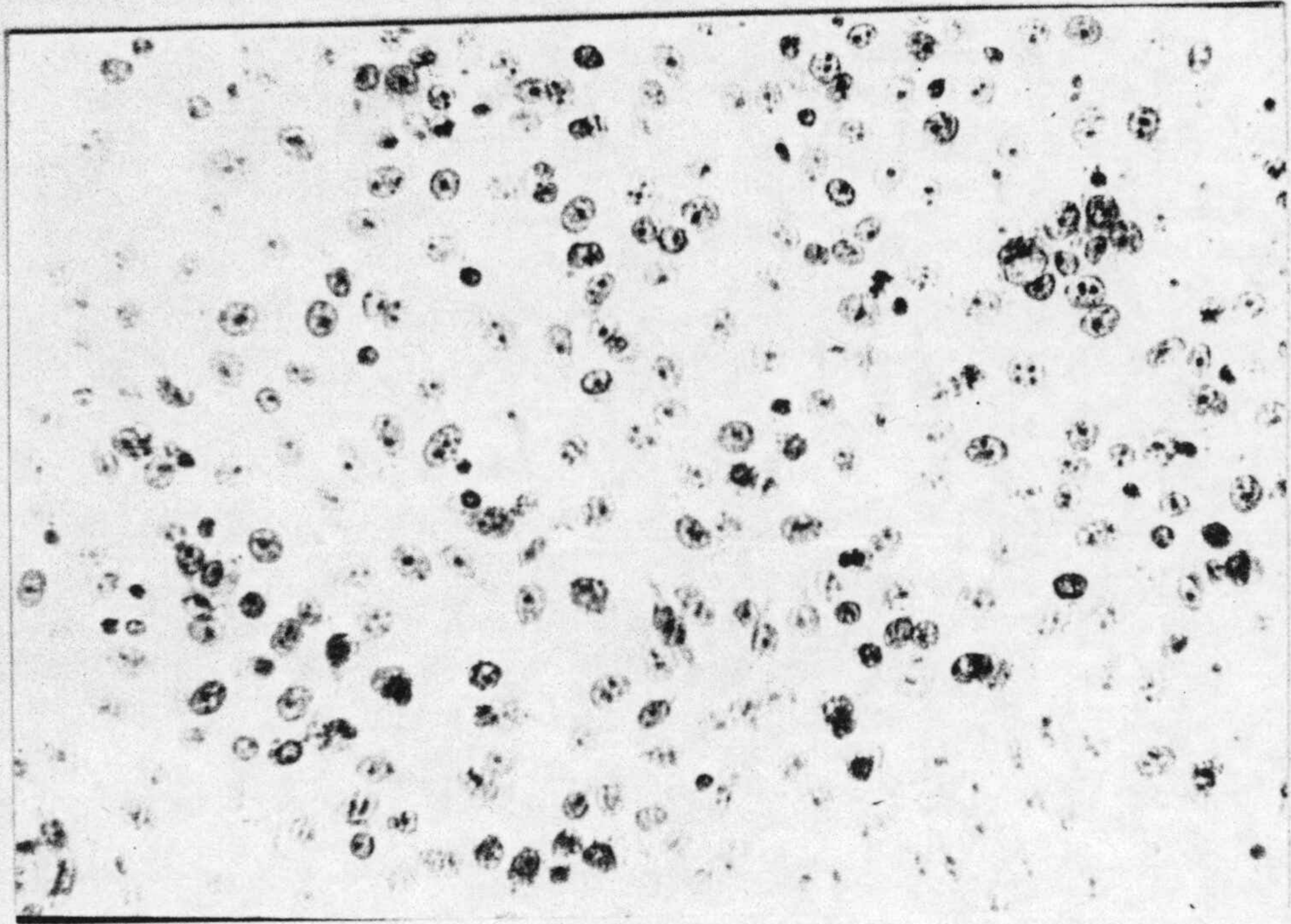


Figura 23

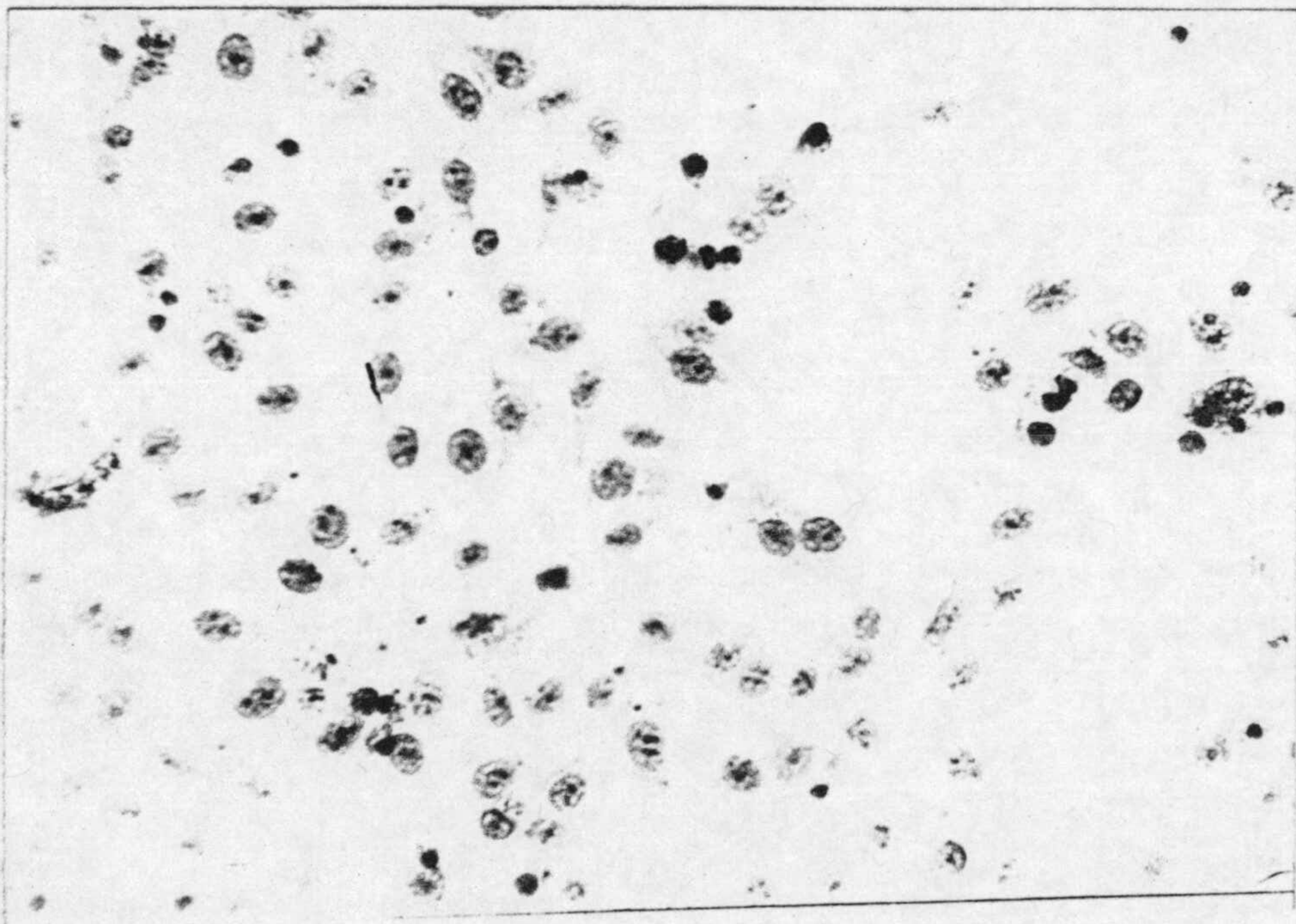


Figura 24

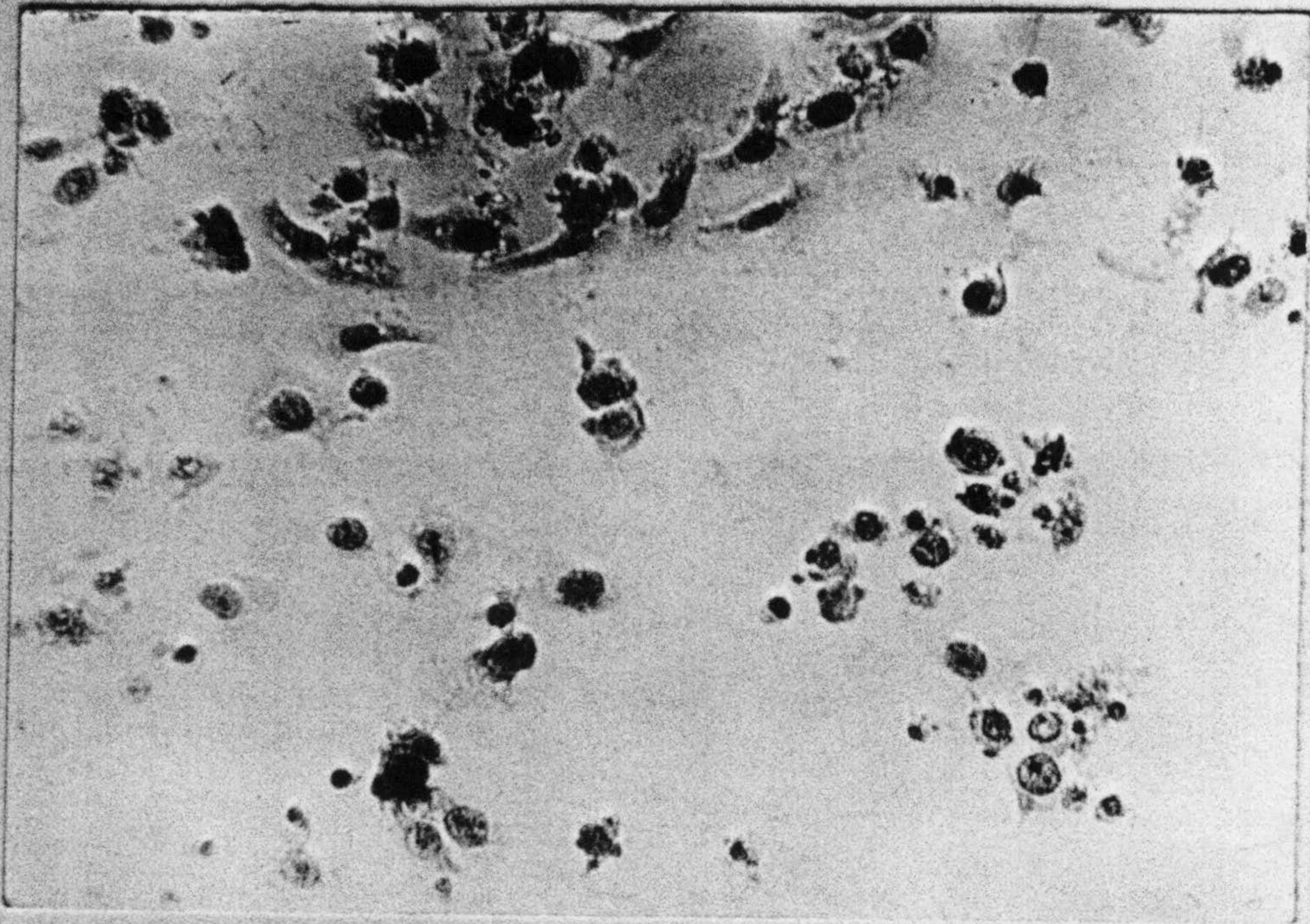


Figura 25

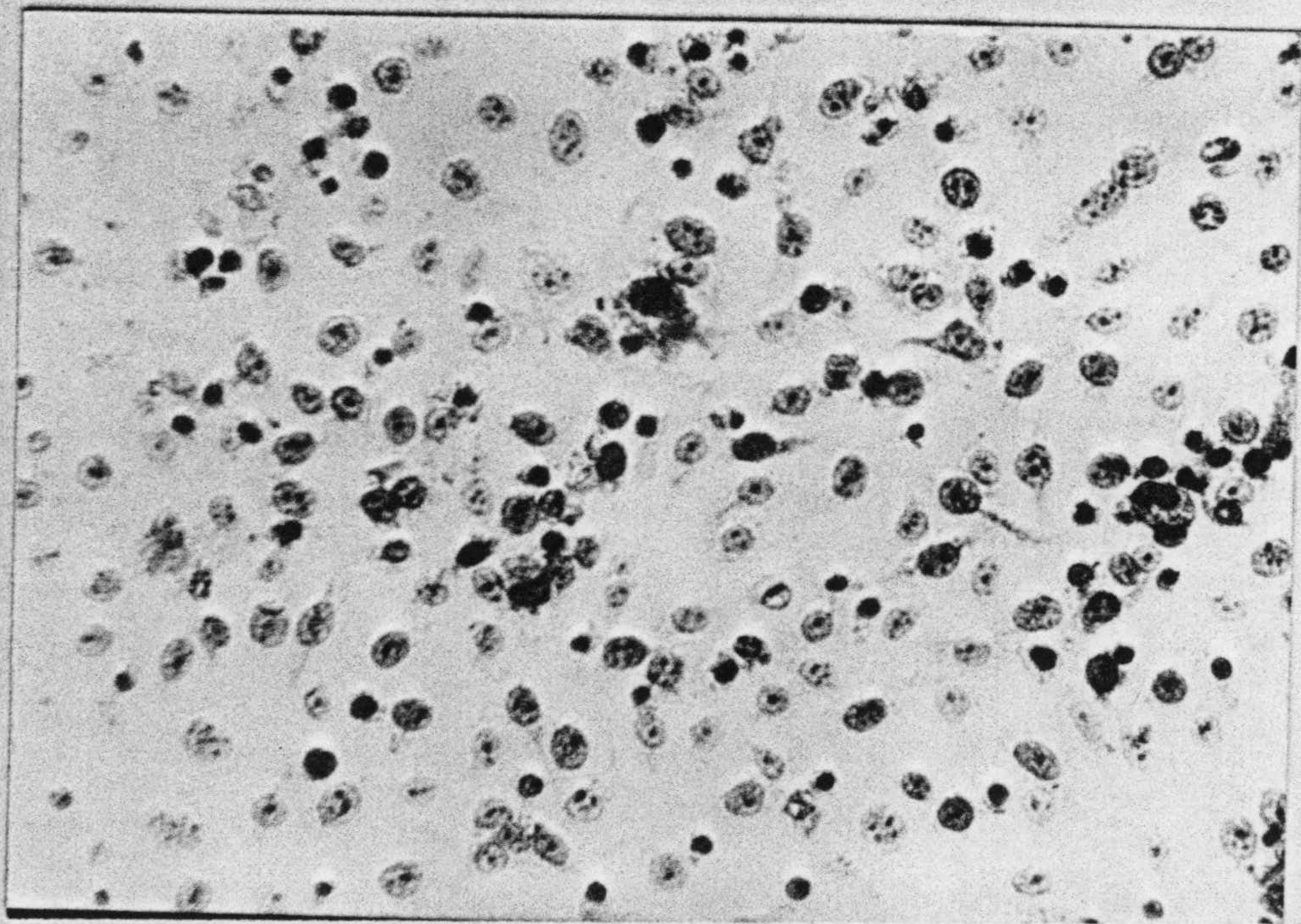


Figura 26

Tras iguales tiempos de interacción y a iguales aumentos, el aspecto de las células Vero en contacto con 20 µg/ml de factor proteico, aparece reflejado en las figuras 27, 28 y 29, siendo la figura 30 la correspondiente al control.

4.1.7.- Actividad permeabilizante

Los resultados obtenidos tras diferentes tiempos de interacción (12, 24 y 48 horas), se muestran en las figuras 31, 32 y 33 respectivamente, siendo la figura 34 el control sin α -sarcina.



Figura 27



Figura 28

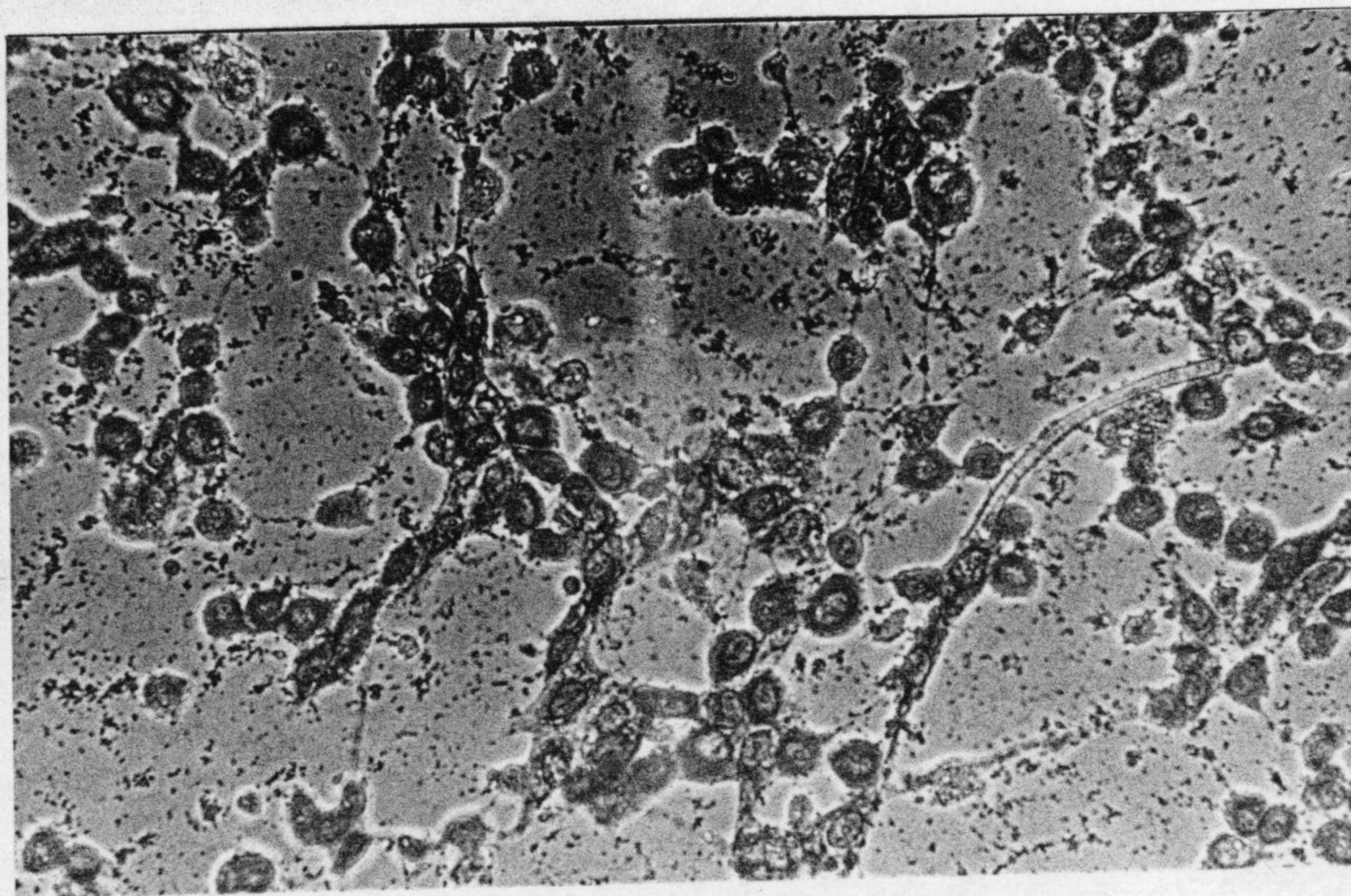


Figura 29

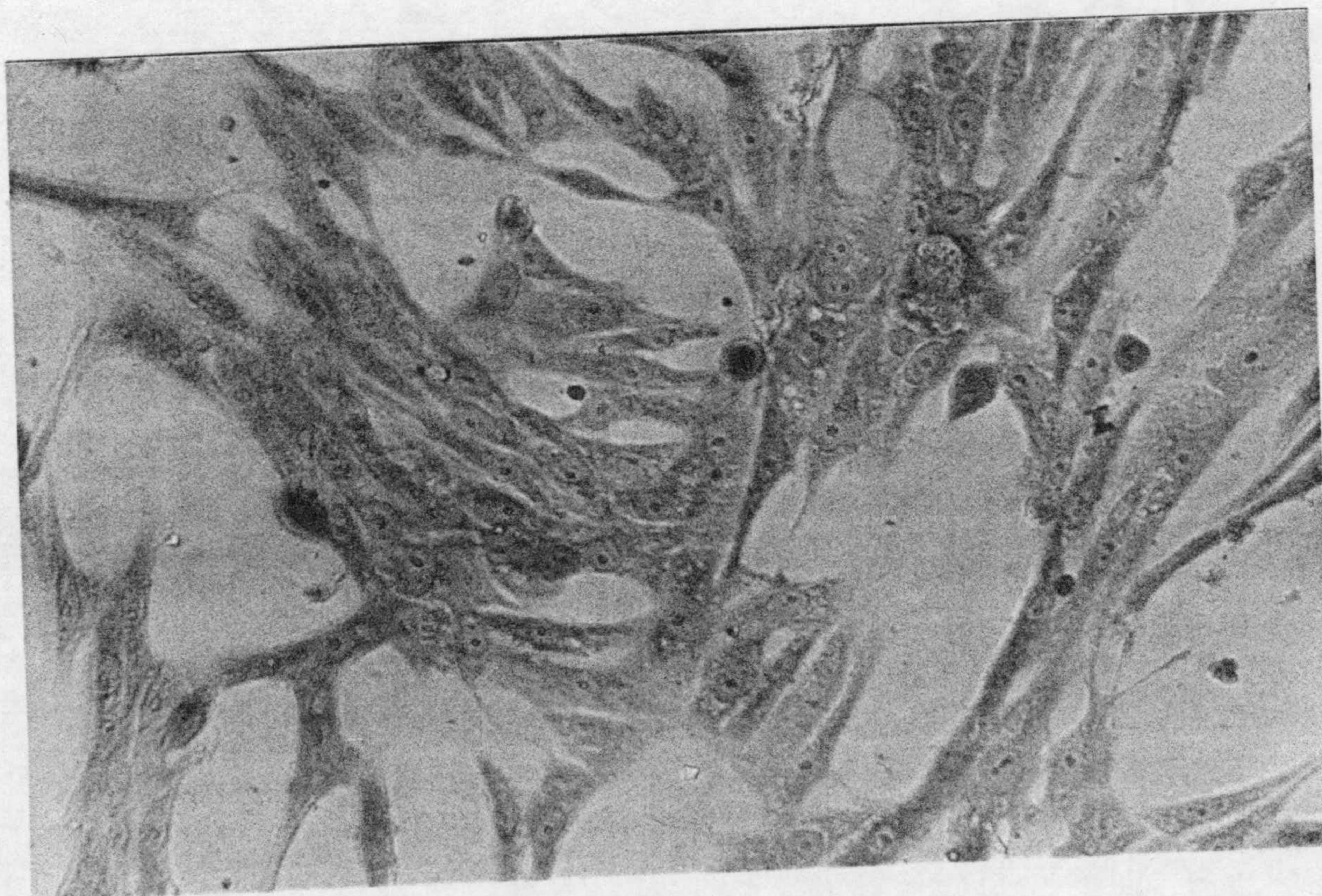


Figura 30

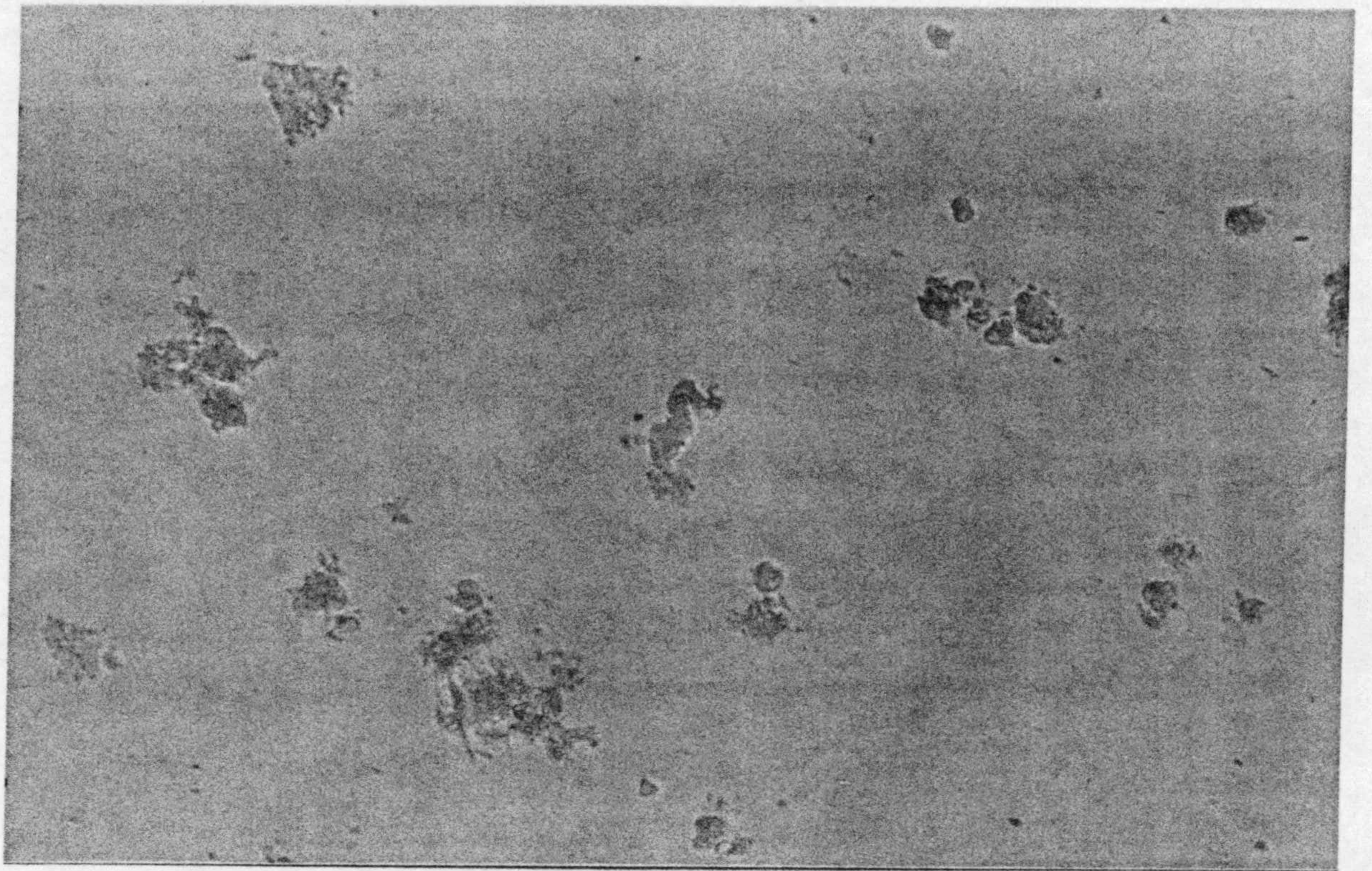


Figura 31

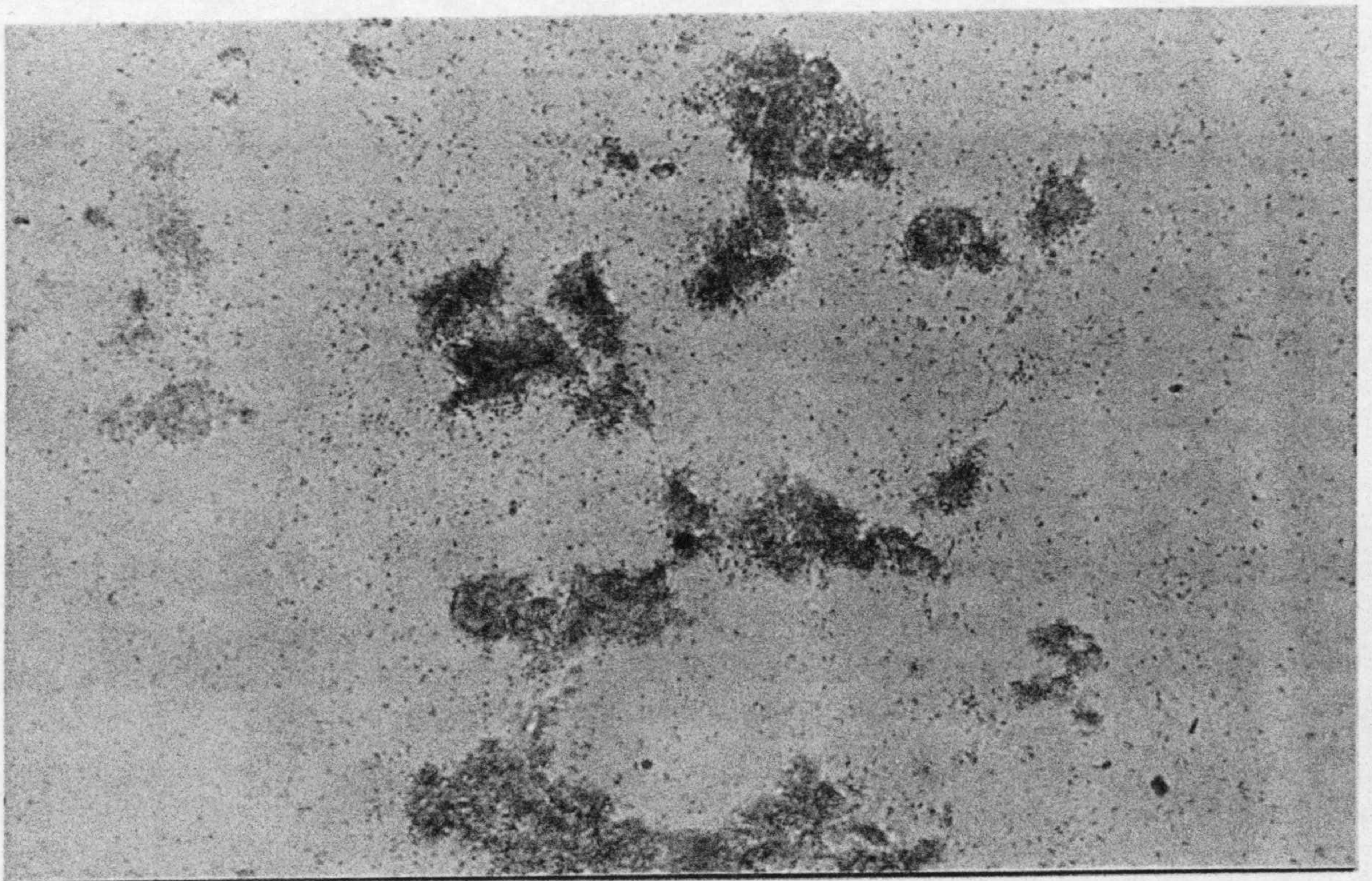


Figura 32

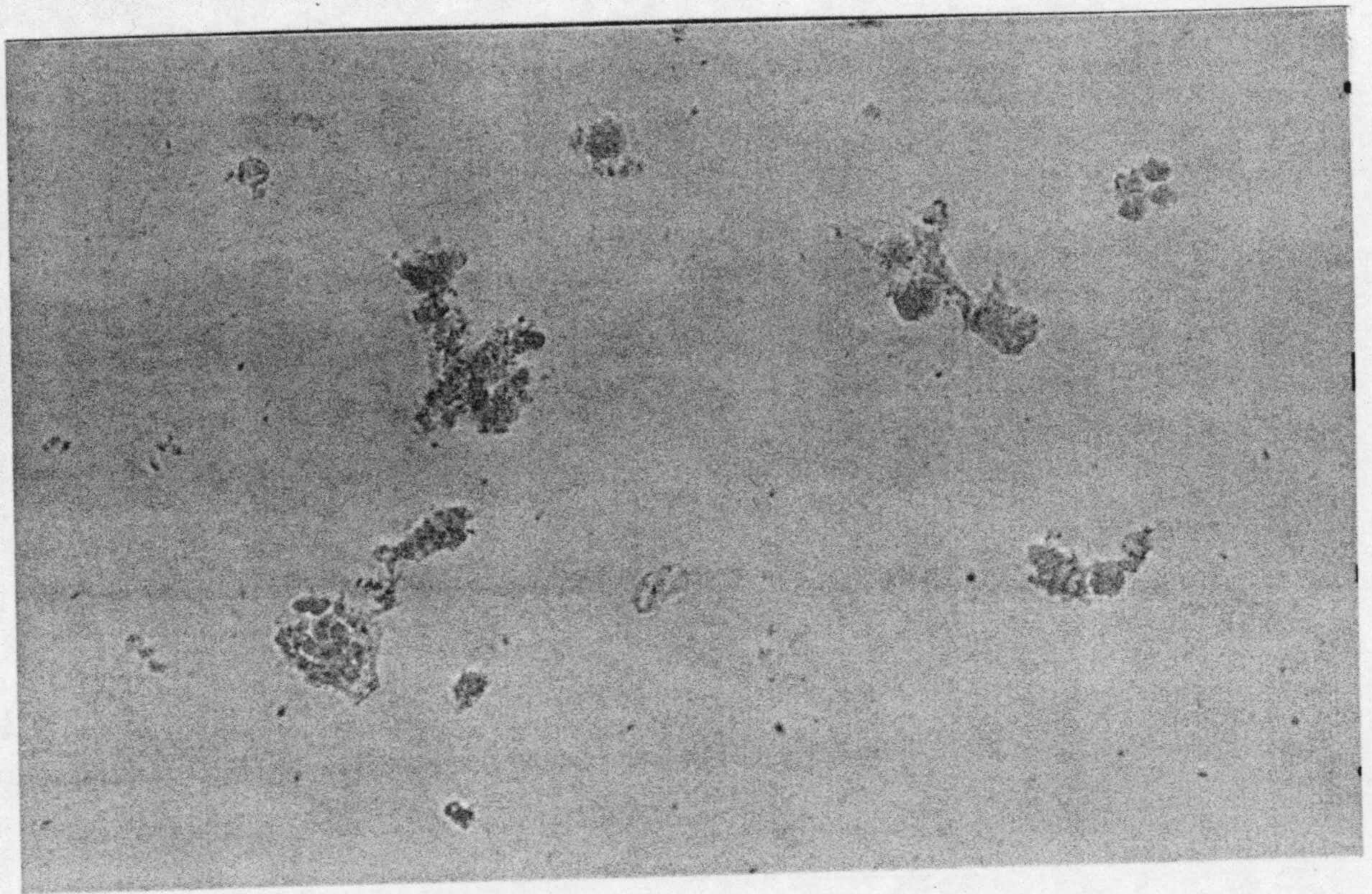


Figura 33

DISCUSSION

El estudio a Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), del empleo de un soporte de nitrocelulosa para la obtención de proteínas o factores proteicos liberados por Acanthamoeba culbertsoni A-1, ofreció interesantes resultados.

Transcurrida tan sólo una hora tras la siembra de las amebas sobre los filtros, puede ya apreciarse (Figs. 2 y 4), como los trofozoitos se están adhiriendo fuertemente al sustrato. Su forma sigue siendo mayoritariamente globular (Fig. 3), pero ya es notable la emisión de acantópodos que van a fijar a la ameba al papel (Fig. 4). Así, siendo la superficie rugosa debido a las proyecciones pseudopodiales, puede, sin embargo, apreciarse que éstas son más pronunciadas y de mayor longitud en las zonas en que contactan con el sustrato.

Transcurridas 12 horas, parece haber comenzado la división de la población amebiana (Fig. 5), los trofozoitos no son ya mayoritariamente redondeados, sino aplanados; muchos de ellos se están dividiendo, a lo que probablemente se debe su menor fijación al sustrato y el mayor tamaño si se compara con las observadas a una hora.

No obstante, la fijación a la nitrocelulosa es mucho más marcada (Fig. 6 y 7), resultando casi imposible distinguir donde finaliza un pseudópodo y donde comienza la nitrocelulosa (Fig. 8). En esta misma figura pueden observarse sobre la membrana, pequeños depósitos puntiformes que pudieran corresponder al algún material secretado por el protozoo.

Transcurridas 24 horas (Fig. 9), el número de trofozoitos es mayor y un examen detallado muestra como la morfología de las amebas ha experimentado notables cambios. Destaca entre ellos la formación de amebostomas, patentes en la Figura 10, donde puede constatarse su frecuencia bastante elevada.

La Fig. 11 muestra un trofozoito con su amebostoma y una firme adhesión al sustrato, y en las Figs. 12 y 13, dos trofozoitos con amebostomas, igualmente adheridos con firmeza a la nitrocelulosa, de modo que es imposible diferenciar el límite entre el seudópodo y el sustrato.

La formación de amebostomas en ausencia de células u otro material fagocitable es, en principio, sorprendente.

Los amebostomas fueron descritos por vez primera en el género Naeqleria por John y col. en 1984, lo que fue acogido por la comunidad científica con un cierto excepticismo, pues no habían sido observados hasta entonces. Estos autores los encuentran en 13 cepas de Naeqleria fowleri, aisladas de líquido cefalorraquídeo humano y les atribuyen una función fagocítica, para "engullir" alimento, que sería complementaria a la pinocitosis y a la fagocitosis pseudopodial. Debido a su aparición temporal en una u otra zona del protozoo, no tienen carácter de citostomas y estos autores proponen el nombre de amebostomas, para denominar esta especie de ventosas "fagocíticas".

Un año después, John y col. publican un nuevo trabajo sobre el tema, profundizando en el conocimiento de los amebostomas de

Naegleria y visualizando su utilización para la ingestión de levaduras, eritrocitos y bacterias. Constatan la aparición de un número máximo al final de la fase logarítmica de crecimiento, (72 horas a 30 C). Detectan también la presencia de amebostomas en Naegleria australiensis, mientras que en las especies apatógenas (N. gruberi, N. jadini y N. lovaniensis), los amebostomas no aparecen como tales, por lo que parecen estar asociados a la mayor o menor patogenicidad de la estirpe.

En Acanthamoeba, la formación de amebostomas no se constató hasta 1987, (Diaz Rivadeneyra, J., Memoria de licenciatura, 1987). En esta fecha, un estudio sobre citopartogenicidad de amebas para las células Vero (Gamarro, F. y col. 1987) reveló la formación, al menos en Acanthamoeba griffini S-7, Acanthamoeba lenticulata PD2 y Acanthamoeba spp. Gr-1, de amebostomas, aunque menos definidos morfológicamente que los de Naegleria. Estos autores asocian la formación de dichas estructuras con la existencia de material fagocitable, debido a que no habían sido observados en ausencia de células.

Así, esta parte del trabajo nos reveló claramente la conveniencia del empleo de un soporte de nitrocelulosa. La comparación de nuestras imágenes con las obtenidas por otros autores (Juan Diaz Rivadeneyra, 1987) sobre soporte de plástico o vidrio, indica claramente que la adhesión es mayor en la nitrocelulosa. Probablemente, debido a su composición química por una parte y a la estructura física, rugosa y de aspecto esponjoso, las amebas se ligan fuertemente al soporte.

Se constata por otra parte la formación de amebostomas por Acanthamoeba culbertsoni A-1, en ausencia de células u otro material fagocitable, lo que la hace similar a las cepas patógenas de Naeqleria fowleri. Sería interesante por tanto repetir el proceso con otras especies y/o cepas del mismo género, para ver si de nuevo se produce la formación de amebostomas al situarlas, en iguales condiciones, sobre un soporte de nitrocelulosa, y si ello está relacionado con el grado de patogenicidad de la estirpe.

Al mismo tiempo, el estudio de la morfología amebiana, revela claramente la inexistencia de alteraciones que pudieran ser debidas al empleo de un medio como es el TC-199, en ausencia de suero. En consecuencia, tras el estudio detallado de estos resultados, se consideró positiva la metodología utilizada, procediéndose al estudio a microscopía electrónica de transmisión.

CONCLUSIONES

1.- Las membranas de nitrocelulosa son un soporte adecuado para la fijación de Acanthamoeba culbertsoni, cepa A-1.

2.- Las amebas fijadas sobre nitrocelulosa, en ausencia de otras células, liberan factores citopatogénicos.

3.- El aislamiento y purificación de estos factores lleva a la purificación de una proteína de peso molecular 65 000 d y 4.2 de pI.

CONCLUSION GENERAL

Se ha estandarizado una técnica de obtención y purificación de proteínas liberadas por protozoos parásitos, en ausencia de otras células. Se demuestra la producción por parte de la cepa A-1 de Acanthamoeba culbertsoni de una proteína citopatogénica.

BIBLIOGRAFIA

- Adam, K.G.M. (1964).
A comparative study of Hartmannellid amoebas.
J. Protozool. 11: 423-430.

- Adams, L.D. y Sammons, D.W. (1981).
A unique silver staining procedure for color characterization
of polypeptides.
Electrophoresis '81. De Gruyter, W. and Co. Eds. Berlin, New
York. pp. 155-165.

- Alexeieff, A. (1912).
Sur les caractères cytologiques et la systématique des amibes
du groupe limax (Naeqleria nov. gen. et Hartmannia nov.
gen.) et des amibes parasites des vertebrates (Protamoeba
nov. gen.).
Bull. Soc. Zool. (France). 37: 55-74.

- Anail, A.P. (1989).
Acanthamoebiasis and AIDS
Am. Assoc. Neuropath. Annual Meeting. Dallas. 15-18 Junio.

- Arborgh, B., Bell, P., Brunk, U., y Collins, U.P. (1976).
The osmotic effect of Glutaraldehyde during fixation. A
T.E.M., S.E.M. and citochemical study.
J. Ultrastruct. Res. 56: 339.

- Arroyo, R. y Orozco, E. (1987).
Location and identification of an Entamoeba histolytica
adhesin.
Molecular and Biochemical Parasitology 23: 151-158.

- Ayers, K.M., Billups, L.H. y Garner, F.M. (1972).
Acanthamoebiasis in a dog.
Vet. Path. 9: 221-226.

- Baun, J. y Albert, D. (1985).
A 29 year-old native of India with bilateral ulcerative
keratitis.
N. Engl. J. Med. 312: 634-641.

- Bone, Q. y Ryan, K.P. (1972).
Osmolarity of Osmium tetroxide and glutaraldehyde fixatives.
Histochem. J. 4: 331.

- Bos, H.J. y Van de Griend, R.J. (1977).
Virulence and toxicity of axenic Entamoeba histolytica
Nature. Lond., 265: 341-343.

- Boyde, A. y Maconnachle, E. (1979).
Volume changes during preparation of mouse embryonic tissue
for S.E.M.
Scannin. 2: 149.

- Brown, T. (1978).
Observations by light microscopy on the cytopathogenicity of
Naegleria fowleri in mouse embryo - cell cultures.
J. Med. Microbiol., 11: 249-259.

- Brown, T. (1980).
Cytotoxicity of pathogenic and non-pathogenic Naegleria
spp. in mammalian cell cultures.
Int. Conf. Biol. Pathogen. Small free-living amoebae 2nd,
Univ. Fla. Gainesville p. 88 (Abstracts).

- Brown, T.J. y Cursons, R.T.M. (1987).
Prophylaxis.
En: Amphizotic Amoebae Human Pathology. Editado por
Rondanelli, E.G. et al. Piccin. Nuova Libreria. pp.: 217-236.

- Brunk, U., Collins, V.P., y Arro, E. (1981).
The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells
for SEM.
Journal of Microscopy. 123: 121.

- Cash, J. y Hopkinson, J. (1905).
The British Freshwater Rhizopoda and Heliozoa.
1. London. The Ray Society.

- Castanys Cuello, S. (1987).
Estudio de algunas alteraciones de la célula hospedadora y
purificación de factores liberados por Trypanosoma cruzi
durante su interiorización.
Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

- Cerva, L., Serbus, C. y Skocil, V. (1973).
Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of a man.
Folia Parasit. (Praha). 30: 97-101.

- Chang, S.L. (1979).

Pathogenesis of pathogenic Naeqleria fowleri amoeba.

Folia Parasit., 26: 195-200.

- Chevez, A., Sepúlveda, B., Segura, M., Corona, D. y Diaz, J.
(1976).

Initial phases of pathogenic activity of Entamoeba histolytica in the hamsters liver. I. Confrontation of trophozoites and isolated hepatic cells.

Proc. I. Conf. Amebiasis. pp. 477-482.

Public. Inst. Mexicano del Seguro Social, México.

- Collins, V.P., Arborgh, B., y Brunk, U. (1977).

A comparison of the effects of three widely used glutaraldehyde fixations on cellular volume and structure.

Act. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. 85: 157.

- Costas, M., Edwards, S.W., Lloyd, D., Griffiths, A.J. y Turner, G. (1983).

Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus Acanthamoeba as an aid in taxonomy.

FEMS Microbiol. Lett., 17: 231-234.

- Costas, M. y Griffiths, A.J. (1980).

The suitability of starch-gel electrophoresis of esterases and acid-phosphatases for the study of Acanthamoeba taxonomy.

Arch. Protistenkd., 123: 272-279.

- Costas, M. y Griffiths, A.J. (1984a).
The taxonomic significance of the fatty-acid composition of Acanthamoeba (Amoebida, Acanthamoebidae).
Protistologica., 20: 27-31.
- Costas, M. y Griffiths, A.J. (1984b).
The esterases and acid-phosphatases of Acanthamoeba (Amoebida, Acanthamoebidae).
Protistologica., 20: 33-41.
- Costas, M. y Griffiths, A.J. (1985).
Enzyme composition and the taxonomy of Acanthamoeba.
J. Protozool., 32: 604-607.
- Culbertson, C.G. (1961).
Pathogenic Acanthamoeba (Hartmannella).
Am. J. Clin. Pathol., 35: 195-202.
- Culbertson, C.G. (1971).
The pathogenicity of soil amoebas.
Ann. Rev. Microbiol. 25: 231-254.
- Culbertson, C.G., Smith, J.W., Cohen, H.K. y Minner, J.R. (1951).
Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba.
Am. J. Pathol., 35: 185-197.
- Culbertson, C.G., Smith, J.W. y Minner, J.R. (1958).
Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity.
Science 127: 1506.

- Cursons, R.T.M., Brown, T.J. y Keys, E.A. (1978).
Virulence of pathogenic free-living amoebae.
J. Parasitol. 64: 744-745.

- Cursons, R.T.M., Brown, T.J. y Keys, E.A. (1980).
Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in
axenic conditions.
Appl. Environ. Microbiol. 40: 62-66.

- Cursons, R.T.M., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M. y
Till, D. (1980).
Immunity to pathogenic free-living amoebae. Role of humoral
antibody.
Infect. Immun. 29: 401-407.

- Dawson, M.W., Brown, T.J. y Till, D.G. (1983).
The effect of Baquacil on pathogenic free-living amoebae.
(PFLA). In axenic conditions.
M. Z. J. Mar. Freshwat. Res. 17: 305-311.

- Dawson, M.W., Brown, T.J. Biddick, C.J. y Till, D.G. (1984).
The effect of Baquacil on pathogenic free-living amoebae.
(PFLA). 3. Increased Baquacil concentrations and exposure
time in the presence of bacteria.
M. Z. J. Mar. Freshwat. Res. 18: 53-56.

- Diaz Rivadeneyra, J. (1987).

Estudio al microscopio electrónico de barrido de las interacciones entre células Vero y amebas de los géneros Naeqleria y Acanthamoeba.

Memoria de licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

- De Jonckheere, J.F. (1980).

Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different Acanthamoeba species.

Appl. Envirom. Microbiol., 39: 681-685.

- De Jonckheere, J.F. (1983).

Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus Acanthamoeba.

J. Protozool., 30: 701-706.

- De Jonckheere, J.F. (1987).

Taxonomy.

En: Amphizoic Amoebae Human Pathology. Editado por Rondanelli, E.G. et al. Piccin. Nuova Libreria. pp.: 25-85.

- De Jonckheere, J.F. y Van de Voorde, H. (1976).

Differences in destruction of cysts of pathogenic and non-pathogenic Naeqleria and Acanthamoeba by chlorine.

Appl. Envirom. Microbiol. 31: 294-297.

- Dunnebacke, T.H. y Schuster, F.L. (1971).
Infectious agent from a free-living soil amoeba, Naeqleria gruberi.
Science, 174: 516-518.

- Dunnebacke, T. H. y Schuster, F.L. (1974).
An infectious agent associated with amebas of the genus Naeqleria.
J. Protozool. 21: 327-329.

- Dunnebadcke, T. H. y Schuster, F.L. (1977).
The nature of a Cytopathogenic material present in amoebae of genus Naeqleria.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 26: 412-421.

- Dunnebacke, T.H. y Schuster, F.L. (1985).
Morphological response of cultured cells to Naegleria amoeba cytopathogenic material.
J. Cell Sci., 75: 1-16.

- Dunnebacke, T.H. y Dixon, J.S. (1989).
NACM, a cytopathogen from Naegleria ameba: Purification, production of monoclonal antibody, and immunoreactive material in NACM-treated vertebrate cell cultures.
J. Cell Sci., 93: 391-401.

- Dwivedi, J.N. y Singh, C.H. (1964).
Pulmonary lesions in an indian buffalo associated with Acanthamoeba sp.
Ind. J. Microbiol. 5: 31-34.

- Eaton, R.D.P., Meerovitch, E. y Costerton, J.W. (1969).
A surface active lysosome in Entamoeba histolytica.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63: 678-680.

- Eaton, R.D.P., Meerovitch, E. y Costerton, J.W. (1970).
The functional morphology of pathogenicity in Entamoeba histolytica.
Ann. Trop. Med. Parasit. 64: 299-304.

- Echlin, P. (1975)
Sputter coating techniques for S.E.M.
Scanning Electron Microscopye (I): 217, IITRI, Chicago.

- Elridge, A.E. y Tobin, J.O'H. (1967).
Natural immunity to limax amoebae.
Ryan virus. Br. Med. J. 1: 299.

- Feldman, T.S., Speaker, H. y Cleveland, P.M. (1989).
The effect of magaining on Acanthamoeba castellanii.
Intern. Symp. on Acanthamoeba and the eye. The Woodlands,
Texas. 1989. Proceedings 41.

- Findlay, J.B.C. (1986).
Biological membranes. A practical approach. Isolation and
labeling of proteins and peptides.
IRL Press. Lim. P.O. Box 1, Eynsham, Oxford OX8 1JJ, England.

- Frank, W. y Bosch, I. (1972).
 Isolierung von amoeben des Typs "Hartmannella - Acanthamoeba"
 und "Naegleria" aus kaldblütern.
 Z. Parasitenk. 40: 139-141.

- Freitas, D., Belfort, R.Jr. y Foronda, A.S. (1989).
 Susceptibility of Acanthamoeba spp. to soft contact lens
 disinfection systems.
 Intern. Symp. on Acanthamoeba and the eye. The Woodlands,
 Texas. 1989. Proceedings: 24.

- Fulford, D.E. y Marciano-Cabral, F. (1986).
 Cytolytic activity of N. fowleri cell-free extract.
 J. Protozool., 33: 498-502.

- Gamarro, F., Diaz, J., Mascaró, C., Osuna, A. y Pérez, M.I.
 (1987).
 Sucker-like structures on Acanthamoeba spp..
 Third Mediterranean Conference of Parasitology.

- Gaur, A.K., Mehdi, H. y Garg, K. (1986).
 Purification and characterization of a RBC-Lytic factor from
Acanthamoeba culbertsoni.
 Protistologica, XXII: 369-377.

- Grillot, R. y Ambroise-Thomas, P. (1981).
 Etude comparative du pouvoir pathogene des amibes libres chez
 la souris et leur effect cytophatogene in vitro.
 C. R. Soc. Biol. 175: 187-193.

- Hamburg, A. y De Jonckheere, J.F. (1980).
Amoebic keratitis.
Ophthalmologica. 181: 74-80.

- Hoffman, E.O., García, C., Lunseth, J., McGarry, P. y Coover, J. (1978).
A case of primary amoebic meningo-encephalitis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 29-38.

- Hysmith, R.M. y Franson, R.C. (1982a).
Elevated levels of cellular and extracellular phospholipids from pathogenic Naeqleria fowleri.
Biochim. Biophys. Acta, 711: 26:32.

- Hysmith, R.M. y Franson, R.C. (1982b).
Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic Naeqleria fowleri.
Biochim. Biophys. Acta, 712: 698-701.

- Jager, B.V. y Stamm, W.P. (1972).
Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus Hartmannella in a patient with Hodgkin's disease.
Lancet. ii: 1343-1345.

- Jahnes, W., Fullmer, H. y Li, C. (1957).
Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture.
Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 96: 484-488.

- John, D.T., Cole, T.B.Jr. y Marciano-Cabral, F.M. (1984).
Sucker-like structures on the pathogenic amoeba Naeqleria fowleri.
Appl. Envirom. Microbiol., 47: 12-14.

- John, D.T., Cole, T.B. Jr., Bruner R.A. (1985).
Amebostomes of Naeqleria fowleri.
J. Protozool., 32 (1): 12-19.

- Knight, R., Bird, R.G. y McCaul, T.F. (1975).
Fine structural changes at Entamoeba histolyca rabbitkidney cells (R.K. 13) interface.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 69, 197.

- Laemmler, U.K. y Favre, M. (1973).
Maturation of the head of bacteriophage T4
J. Mol. Biol. 80: 575-599.

- Lal, A.A. y Garg, N.K. (1979).
Hartmannella culbertsoni: Biochemical changes in the brain of meningoencephalitic mouse.
Exp. Parasitol., 48: 331-336.

- Larkin, D.F.P. y Kilvington, S. (1989)
Incidence of Acanthamoeba contamination of contact lens cases in Britain.
International Symposium on Acanthamoeba and the eye.
The Woodlands, Texas, pag. 20.

- Lawande, R.V., Abraham, S.N., John, I. y Egler, L.J. (1979).
Recovery of soil amebas from the nasal passages of children during the dusty Haimattan period in Zaria.
Am. J. Clin. Pathol. 71: 201-203.

- Lowrey, D.M. y McLaughlin, J. (1984).
A multicomponent hemolytic system in the pathogenic amoeba Naeqleria fowleri.
Infect. Immun., 45: 731-736.

- Lowrey, D.M. y McLaughlin, J. (1985).
Activation of a heat-stable cytolytic protein associated with the surface membrane of Naeqleria fowleri.
Infect. Immun., 50: 478-482.

- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., Pittman, F.E. y Pittman, J.C. (1978)
Surface ultraestructure of E. histolytica: a study by H.U.T.E.M. and S.E.M.,
Arch. Invest. Med., 9:191.

- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Cantey, J.R., Hofbauer, A.F. y Pittman, F.E. (1979).
Isolation of a cytotoxin enterotoxin from Entamoeba histolytica
J. Infect. Dis. 139: 9-17.

- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., Kairalla, A.B., Cantey, J.R. y Pittman, F.E. (1984).

Relationship of cytotoxins and axenically cultivated Entamoeba histolytica to virulence.

Gastroenterol. 86: 1488-1495.

- Lynch, E.C., Rosenberg, I.M. y Gitler, C. (1982)

An ion channel forming protein produced by Entamoeba histolytica.

Embo. J. 1: 801-804

- Marciano-Cabral, F., Patterson, F.M., John, D.T. y Bradley, S.G. (1982).

Cytopathogenicity of Naeqleria fowleri and Naeqleria gruberi for stablished mammalian cell cultures.

J. Parasitol., 68: 1110-1116.

- Marciano-Cabral, F. y John, D.T. (1983).

Cytopathogenicity of Naeqleria fowleri for rat neuroblastoma cell cultures: Scanning electron microscopy study.

Infect. Immun., 40: 1214-1217.

- Martínez, A.J. (1980).

Is Acanthamoeba encephalitis an opportunistic infection?

Neurology 30: 567-574.

- Martínez, A.J., García, G.A., Halks-Miller, M. y Arce-Vela, R. (1980).
Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion.
Acta Neuropathol. (Berl.) 51: 85-91.

- Martínez, A.J. (1982).
Acanthamebiasis and Immunosuppression. Case report.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 41: 548-557.

- Martínez, A.J. (1983).
Free-living amoebae: Pathogenic aspects. A review.
Protozool. Abst. 7: 293-306.

- Martínez, A.J. (1987a).
Clinical manifestations of free-living amebic infections.
En: Amphizoid Amoebae Human Pathology. Editado por Rondanelli E.G. et al. Piccin Nuova Libreria pp.: 161-179.

- Martínez, A.J. (1987b).
Anatomic pathology of free-living amebic infections.
En: Amphizoid Amoebae Human Pathology. Editado por Rondanelli E.G. et al. Piccin Nuova Libreria pp.: 179-191.

- McCaul, T.F., Poston, R.N. y Bird, R.G. (1977).
Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens: Chromium release from labeled human liver cells in culture.
Exper. Parasitol. 43: 342-352.

- McConnel, E.E., Garner, F.M. y Kirk, J.H. (1968).
Hartmannellosis in a bull.
Path. Vet. 5: 1-6.

- McGowan, K., Deneke, C.F., Thorne, G.M. y Gorbach, S.L.
(1982).
Entamoeba histolytica: Cytotoxin purification,
characterization, strain virulence and protease activity.
J. Infec. Dis. 146: 616-625.

- Meerovitch, E., Eaton, R.D.P. y McLaughlin, J. (1975).
Functional aspects of host-parasite relations in amoebiasis.
Proc. Intern. Conf. on Amebiasis. pp. 628-635.
Publ. Inst. Mexicano del Seguro Social, México. (published
1976).

- Meisler, D.M. (1989).
Acanthamoeba and contact lens disinfection: Questions.
Intern. Symp. on Acanthamoeba and the eye. The woodlands,
Texas. 1989. Proceedings: 23.

- Mishra, S.K. y Garg, N.K. (1982).
Properties and subcellular distribution of phospholipase A of
Acanthamoeba culbertsoni (Singh y Das, 1970).
Indian J. Parasitol., 6: 199-204.

- Mishra, S.K., Sharma, A.K., Medhi, H. y Garg, N.K. (1983).
Phospholipase A and lipid contents in pathogenic and non-
pathogenic Acanthamoeba spp. in relation to their virulence.
Protistologica, 19: 513-521.

- Mishra, S.K., Jaiswal, A.K. y Garg, N.K. (1985).
Purification and properties of phospholipase A2 of Acanthamoeba culbertsoni.
Indian J. Biochem. Biophys., 22: 344-349.

- M.R.C. Symposium. (1977).
Humidifier fever.
Thorax. 32: 653-663.

- Müller, R. (1973).
Nachweis von amöben in herdförmigen Organnekrosen bei einem jungen kanadischen Biber (Castor canadensis).
Acta Trop. 30: 373-376.

- Nagington, J., Watson, P.G., Playfair, T.J., McGill, J., Jones, B.R. y Steel, A.D. (1974).
Amoebic infection of the eye.
Lancet ii.: 1537-1540.

- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R. (1980).
A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.
Analytic Biochem. 105: 361-363.

- Olohu, N., Martinez, J.A., Lamarco, K.L., Nerad, T.A., Sama, A.K., Das, S. y Glew, R.H. (1986).
Demonstration of various acid hydrolases and preliminary characterization of acid phosphatase in Naegleria fowleri.
J. Protozool. 33: 317-321.

- Page, F.C. (1967).

Taxonomic criteria for Limax amoebae, with description of 3 new species of Hartmannella and 3 of Vahlkampfia.

J. Protozool. 14: 499-521.

- Page, F.C. (1974).

A further taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of new species and a key to genera.

Arch. Protistenk. 116: 149-184.

- Page, F.C. (1976).

An illustrated key to freshwater and soil amoebae.

Ambleside. Freshwater Biological Association.

- Page, F.C. (1988).

Fresh water and soil Gymnamoebae. Culture collection of algae and protozoa.

Freshwater Biological Association, The Ferry House, Ambleside, Cumbria LA22 0LP.

- Pérez López, M.I. (1987).

Estudios biológicos y bioquímicos sobre la citopatogenicidad de las amebas Limax: Naeqleria y Acanthamoeba.

Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

- Pernin, P., Omar, S. y Hullo, A. (1989).

Isolation, morphological and isoenzymatic study of an ocular Acanthamoeba strain.

International Symposium on Acanthamoeba and the Eye. The Woodlands, Texas, Pag. 3.

- Pharmacia Fine Chemicals (1982).
Isoelectric Focusing. Principles & Methods.
Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-751 04 Upsala 1,
Suecia.

- Polliack, A., Lampen, N., y de Harven, E. (1973).
The comparisson of air drying and critical point drying
procedures for the study of human blood cells by S.E.M.
Scann. Electr. Microscop. pp. :529, IIT. R.I. Chicago.

- Porro, M., Viti, S., Antoni, G. y Saletti, M. (1982).
Ultrasensitive silver-stain method for the detection of
proteins in polyacrylamide gels and immuno precipitates on
agarose gels.
Analytical Biochemistry. 127: 316-321.

- Pussard, M. (1972).
Compareison morphologique de 4 sonches d'Acanthamoeba du
groupe astronyxis-comandoni.
J. Protozool. 19: 557-563.

- Pussard, M. y Pons, R. (1977).
Morphologie de la paroi Kystique et taxonomie du genre
Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida).
Protistologica. T. XIII, fasc. 4: 557-598.

- Raizada, M.K. y Moran V.K. (1972).
L-Threonine dehydratase activity of Harmannella culbertsoni.
Arch. Mikrobiol., 84: 119-128.

- Ravdin, J.I., Croft, B.Y. y Guerra, N.T. (1980).
Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica.
J. Exp. Med., 152: 377-390.

- Ringsted, J., Jager, B.V., Suk, D. y Visvesvara, G.S. (1979).
Probable Acanthamoeba meningoencephalitis in a Korean child.
Am. J. Clin. Pathol. 66: 723-730.

- Rondanelli, E.G., Garosi, G., Filice, G. y De Carneri, I.
(1972).
Ultrastructure di Entamoeba coli, studio microelectronico dei
trofozoiti delle culture in vitro.
Riv. Parasitol., 33: 81-98.

- Rondanelli, E.G., Carosi, G., Filice, G. y De Carneri, I.
(1974a).
Observations of surface active lysosomes and other organelles
in monoxenically cultivated trophozoites of Entamoeba histolytica
y Entamoeba coli.
Int. J. Parasit. 4: 433-435.

- Rondanelli, E.G., Carosi, G., Scaglia, M. y De Carneri, I.
(1974b).
Ultrastructure of Entamoeba moshkouskii with particular
regard to the presence of surface active lysosomes.
Inter. J. Parasit. 4: 331-333.

- Rondanelli, E.G., Carosi, G., Scaglia, M., Deicas, A. y Lotznicker, M. (1976).
Ultrastructural pattern of the ameboid trophozoite of Naegleria fowleri and Acanthamoeba astronyxis, ethiological agents of Primary Amoebic Meningoencephalitis, (PAME) in man. *Giornale de Malattie Infettive e Parassitaire*. 28: 450-456.

- Rondanelli, G.E., Carosi, G., Lazarini, P. y Filice, G. (1987).
Ultrastructure of Acanthamoeba - Naegleria free-living amoebae.
En: *Amphizoic Amoeba Human Pathology*. Editado por Rondanelli, E.G. et al. Piccin. Nuova Libreria. pp.: 87-125.

- Saunders, S.K., Alexandes, E.L., y Braylan, R.C. (1975).
A High-field technique for preparing cells fixed in suspension for S.E.M.
J. Cell Biol. 67: 476.

- Schuster, F.L. (1969).
Intranuclear virus-like bodies in the amoeboflagellate Naegleria gruberi.
J. Protozool., 16: 724-727.

- Schuster, F.L. y Dunnebacke, T.H. (1974a).
Growth at 37 °C of the EGs strain of the amoeboflagellate Naegleria gruberi containing virus-like particles.II. Cytoplasmic changes.
J. Inverteb. Path., 23: 182-189.

- Schuster, F.L. y Dunnebacke, T.H. (1974b).
Virus-like particles and an unassociated infectious agent in amoebae of the genus Naeqleria.
Annls. Soc. Belge Med. Trop., 54: 359-370.
- Schuster, F.L. y Dunnebacke, T.H. (1976).
Cytopathology induced by cell-free lysates of Naeqleria spp..
J. Protozool., 23: suppl. 7A.
- Sheir, T.W. (1982).
Cytolytic mechanisms: Self destruction of mammalian cells by activation of endogenous hydrolytic enzymes.
J. Toxicol. 1: 1-32.
- Shukla, O.P., Kishore, P., Gupta, S. y Srivastava, D.K. (1989).
Potential metabolics targets in the chemoterapy of Acanthamoeba infections: Poliamine metabolism.
Intern. Symp. on Acanthamoeba and the eye. The Woodlands, Texas. 1989. Proceedings : 40.
- Singh, B.N. (1950).
A culture method of growing small free-living amoebae for the study of their nuclear division.
Nature. Lond. 165: 65.
- Singh, B.N. (1952).
Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 236: 405-461.

- Singh, B.N. (1955).
Culturing soil protozoa and estimating their numbers in soil.
Soil Zoology. Butterworths Scientific Publications. London.
pp. 403-411.

- Singh, B.N. y Das, S.R. (1970).
Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living
amoebae and the bearing of nuclear division on the
classification of the order Amoebida.
Phil. Trans., B, 259: 435-476.

- Stehor-Green, J.K., Bailey, T.H. y Visvesvara, G.S. (1989).
The epidemiology of Acanthamoeba keratitis in the United
States.
International Symposium on Acanthamoeba and the eye. The
Woodlands, Texas. pag. 18.

- Takeuchi, A. y Phillips, P.B. (1975a)
Electron microscope studies of experimental Entamoeba
histolytica infection in the guinea pig.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 34-48.

- Takeuchi, A. y Phillips, P.B. (1975b).
Interactions of Entamoeba histolytica with host cell in the
gut mucose.
Proc. Intern. Conf. Amebiasis. pp. 382-393.
Pbl. Inst. Mexicano del Seguro Social, México. (published
1976).

- Taylor, P.W. (1977).
Isolation and experimental infections of free-living amoebae in freshwater fishes.
J. Parasitol. 63: 232-237.

- Treviño-García Manzo, N., Castaneda, M. y Gonzalez-Angulo, A. (1973).
Comparación entre los trofozoitos de Entamoeba histolytica procedentes de portadores asintomáticos y los obtenidos de pacientes con lesiones amebianas.
Arch. Inv. Med. (Méx). 4. Suppl. 1: 17-24.

- Tyndall, R.L., Willaert, E., Stevens, A. y Nicholson, A. (1979).
Pathogenic and enzymatic characteristics of Acanthamoeba isolated from cultured tumor cells.
Protistologica. T. XV, Fasc. 1: 17-22.

- Villarejos, V. (1969).
Studies on the pathogenicity of Entamoeba histolytica and other amoeba species.
PhD. Thesis. New Orleans. Tulane University.

- Willaert, E. (1975).
Etude immuno-taxonomique des genres Naegleria et Acanthamoeba (Protozoa: Amoebida).
Tesis doctoral. Facultad de Ciencias de la Universidad de Lille.

- Willaert, E. (1977).

Immunotaxonomy of the genera Naeqleria and Acanthamoeba and its diagnostic consequences in cases of amoebic meningitis.

Giorn. Mal. Infett. Parassit., 29: 680-689.

- Willaert, E. y Stevens, A.R. (1976).

Indirect immunofluorescent identification of Acanthamoeba causing meningoencephalitis.

Pathol. Biol., 24: 545-547.

- Young, J.D.E., Young, T.H., Lu, L.P., Unkeless, J.C. y Cohn, Z.A. (1982).

Characterization of a membrane pore-forming protein from Entamoeba histolytica.

J. Exp. Med. 156, 1677-1690.

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de
la fecha, constituido por:

- D. RAMON GALVEZ VARGAS
- D. RAMON LOPEZ ROMAN
- D. JOSE ANETROS CACHAZA
- D. HERMINIA GIJON BOTELLA
- D. M^o JOSE ALEJANDRE PEREZ

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don
JAVIER CIFUENTES MELCHOR

se acordó por UNANIMIDAD otorgar la califica-
ción de APTO "CUM LAUDE"

y para que conste, se extiende firmada por los
componentes del Tribunal, la presente diligen-
cia.

Granada, a 14 de Septiembre de 1990

El Secretario,

M. J. Alejandro

M^o J. ALEJANDRE

El Presidente,

Ramon Galvez Vargas
Ramon Galvez Vargas

El Vocal,

Ramon Lopez Roman
Ramon Lopez Roman

El Vocal,

Jacinto Cadiz
Jacinto Cadiz

El Vocal,

Herminia Gijon Botella
Herminia Gijon Botella