

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA HUMORAL (IgG) CONTRA  
LOS ANTÍGENOS PROTEICOS DE *Naegleria fowleri* ENTRE RESIDENTES  
DEL VALLE DEL YAQUI Y VALLE DEL MAYO, SONORA**

**TRABAJO DE TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA**

**ALEJANDRA RETANA CRUZ**

**HERMOSILLO, SONORA**

**SEPTIEMBRE DE 2010**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Alejandra Retana Cruz**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

---

Dr. Fernando Lares Villa  
Director Académico

---

Dr. Ramón Alberto Rascón Pacheco  
Secretario

---

Dra. Maria Del Carmen Candia Plata  
Vocal

---

Dr. Eduardo Ruiz Bustos  
Suplente

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a Dios por permitirme alcanzar este sueño a base de esfuerzo y perseverancia.*

*Mi proyecto de vida es dedicado para ti, Madre. Gracias por ser mi fortaleza y espíritu de lucha. No tengo palabras para agradecerte tu apoyo incondicional porque esta maestría la hicimos las dos. A mi hermano y mi sobrino, por ser mi familia.*

*A mi esposo Carlos, no tengo palabras para agradecerte tu amor, apoyo y paciencia.*

*A mi asesor de tesis, Dr. Fernando Lares Villa del ITSON, agradezco por tener paciencia y fe en mí. Que más hubiera querido que estuviera presente en este examen profesional y ver el logro de este sueño tan anhelado, que parecía imposible... pero usted siempre con sus palabras de consuelo diciendo ahora sabes más que ayer...Es digno de admirarse mi gran amigo Lares...Le deseo éxito y un regreso con bien a estas tierras sonorenses con sus AVL que lo extrañamos!!!*

*A mis compañeras del laboratorio ITSON, en especial a Claudia Hernández....*

*Agradezco a toda la gente que me ha ayudado en este camino dándome estancia en sus hogares y corazón: Mónica Lara, Chuyita, Adelina y mi tía Lidia Cruz (Navojoa, Obregón, Hermosillo).*

*Al excoordinador de investigación en Salud del IMSS: Dr. Alejandro Gómez Alcalá por su apoyo en este mi proyecto de vida. Gracias!!*

*Agradezco las facilidades del IMSS en Obregón: al personal de Banco de Sangre, Dr. Héctor Pérez, especialmente a Quím. Lucrecia, Quím. Jacqueline por su gran ayuda y al Dr. Sabag, por su gran apoyo en los análisis estadísticos.*

*Agradezco a mis amigos del laboratorio IMSS de Navojoa, por su apoyo en este trabajo de investigación: Quím. Sergio Gil, Quím. Rosy Velderrain, Quím. Rosy Vzla., sobretodo por entender mi ausentismo del grupo por mi tiempo limitado y dedicado a la elaboración de este trabajo.*

*Al Dr. Saúl Rojas por aceptarme en el laboratorio de Bioquímica del Instituto Politécnico Nacional de la Cd. de México, D.F. para el procesamiento del W. Blot. Así como su equipo de trabajo, muy especial a Dra. Sandra Rojas, por todo Gracias!!*

*Al comité revisor se le agradece sus observaciones y críticas llevadas a cabo para mejorar este proyecto de investigación: Dra. Candia, Dr. Rascón, Dr. Ruiz y Dr. Lares, Muchas Gracias por todo! Créanme no fue fácil...se me hacía increíble verme haciendo el examen profesional, parecía que cada día que pasaba salían más detalles en el escrito...excelente trabajo realizaron...*

*A mis maestros y compañeros de UNISON Navojoa por sus enseñanzas: Quím. Rosa Amelia, Quím. Icedo, M.I. Lozano y M.I. Carlos Anaya. Gracias!!*

***¿Pero que hay detrás de esta maestría?** Existen muchos esfuerzos, viajes, esperanzas, gastos, horas robadas al sueño, pero muchas ganas de salir adelante y alcanzar lo que algún día soñé, me regreso a mi ciudad con aprendizaje y conocimiento, pero lo más bonito que me llevo es la amistad de mis grandes amigos, en quienes recibí su apoyo incondicional, a ustedes mis grandes amigos les deseo éxito en sus vidas y agradezco su amistad: Alma Delia, Pacheco, Irasema, Vélez, Aimara y Ana Gloria.*

## ÍNDICE

	PÁGINA
LISTA DE TABLAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
OBJETIVOS .....	ix
Objetivo General .....	ix
Objetivos Específicos .....	ix
RESUMEN .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	4
Estudios Sobre Respuesta Inmune Contra <i>N. fowleri</i> .....	5
Técnicas Inmunológicas .....	7
ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) .....	8
ELISA Indirecto .....	9
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida .....	10
Western Blot .....	12
METODOLOGÍA .....	15
Tipo de Investigación y Población de Estudio .....	15
Selección de muestra .....	15
Criterios de Selección .....	15
Criterios de inclusión .....	16
Criterios de exclusión .....	16
Recolección de Muestras Séricas .....	16
Preparación de Antígeno .....	17
Curva Patrón de Proteínas .....	17
Selección de Concentración Óptima de Antígeno .....	17
Determinación del Título de Anticuerpos en Muestras Humanas .....	18
Análisis PAGE y Western Blot .....	18
Análisis Estadístico .....	19

Nivel de significancia .....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
Análisis Descriptivo de la Variable Residencia .....	20
Selección de Concentración Óptima de Antígeno .....	23
Respuesta Humoral IgG contra <i>N. fowleri</i> en Sueros Humanos del Valle del Mayo .....	26
Respuesta Humoral IgG contra <i>N. fowleri</i> en Sueros Humanos del Valle del Yaqui .....	29
Comparativo de Reactividades Anti- <i>N. fowleri</i> de Sueros del Valle de Yaqui y Mayo .....	32
Inmunoblots de IgG séricos contra proteínas de <i>Naegleria</i> y <i>Acanthamoeba</i> .....	36
CONCLUSIONES .....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	43
ANEXOS .....	49
Anexo I. Cultivo axénico de <i>N. fowleri</i> .....	49
Anexo II. Obtención del extracto de <i>N. fowleri</i> .....	51
Anexo III. Cuantificación de proteínas por Método Bradford .....	53
Anexo IV. Determinación de Concentración Óptima de Antígeno por Ensayo ELISA .....	55
Anexo V. Determinación de Anticuerpos IgG humana contra <i>N. fowleri</i> por Técnica ELISA .....	57
Anexo VI. Electroforesis de Proteínas SDS-PAGE .....	59
Anexo VII. Electrotransferencia .....	63
Anexo VIII. Preparación de reactivos y soluciones .....	67
Anexo IX. Carta de consentimiento informado .....	73

## LISTA DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
I Pesos moleculares de las proteínas de <i>N. fowleri</i> , <i>N. lovaniensis</i> y <i>A. mauritaniensis</i> reconocidas por anticuerpos IgG de sueros sonorenses .....	41
II Preparación de una curva estándar de albúmina .....	54
III Esquema de trabajo de concentración óptima de antígeno .....	56
IV Mezcla de soluciones para preparar el gel separador al 10% .....	60
V Mezcla de soluciones para preparar el gel concentrador al 10% .....	61



## LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
1	Esquema general del procedimiento ELISA .....	11
2	Fases de un Western Blot .....	14
3	Distribución de residencia de los participantes del Valle del Mayo ...	21
4	Distribución de residencia de participantes del Valle del Yaqui .....	22
5	Curva patrón de Albúmina medida por Método Bradford .....	24
6	Determinación de concentración óptima de antígeno por ELISA .....	25
7	Reactividad de anticuerpos IgG contra <i>N. fowleri</i> en sueros humanos (1:100) del Valle del Mayo .....	27
8	Reactividad de anticuerpos IgG contra <i>N. fowleri</i> en sueros humanos (1:500) del Valle del Mayo .....	28
9	Reactividad de anticuerpos IgG contra <i>N. fowleri</i> en sueros humanos (1:100) del Valle del Yaqui .....	30
10	Reactividad de anticuerpos IgG contra <i>N. fowleri</i> en sueros humanos (1:500) del Valle del Yaqui .....	31
11	Comparativo de reactividades contra <i>N. fowleri</i> de sueros humanos del Valle de Yaqui y Mayo (1:100) .....	33
12	Comparativo de reactividades contra <i>N. fowleri</i> de sueros humanos del Valle de Yaqui y Mayo (1:500) .....	35
13	Inmunoblots de proteínas de <i>N. fowleri</i> , <i>N. lovaniensis</i> , <i>A. mauritaniensis</i> y sueros del Valle del Yaqui y Valle del Mayo .....	38
14	Inmunoblots de proteínas de <i>N. fowleri</i> , <i>N. lovaniensis</i> , <i>A. mauritaniensis</i> y sueros del Valle del Yaqui y Valle del Mayo .....	39

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar si los sueros humanos del Valle del Mayo y Valle del Yaqui presentan el mismo título de anticuerpos e identifican las mismas bandas proteicas de *N. fowleri*.

### **Objetivos Específicos**

- Obtener sueros sanguíneos de residentes del Valle del Yaqui y del Valle del Mayo, representados por donadores IMSS para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Naegleria fowleri*.
- Determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-*Naegleria fowleri* de la población seleccionada por la técnica de ELISA indirecta.
- Identificar bandas inmunorreactivas de extractos amebianos reconocidas por anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* a través de análisis Western Blot.
- Comparar la respuesta humoral (IgG) contra los antígenos proteicos de *N. fowleri* entre residentes del Valle del Yaqui y Valle del Mayo, Sonora.

## RESUMEN

La presencia de amibas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, que contienen especies patógenas para el hombre y los animales, ha sido evidenciada en distintos medios acuáticos naturales tanto del Valle del Yaqui como en el Valle del Mayo del Estado de Sonora. En el caso particular de *Naegleria fowleri*, agente causal de la meningoencefalitis amibiana primaria, su aislamiento se ha logrado en algunas ocasiones en el Valle del Yaqui pero no así en el Mayo. Con el fin de determinar de manera indirecta si las poblaciones del Valle del Yaqui, y del Mayo, han estado en contacto con *N. fowleri*, se realizó un estudio comparativo de la respuesta inmunológica, en sueros de residentes de ambos valles, a través la presencia de anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* mediante la prueba de ELISA y la caracterización de la especificidad de los anticuerpos se determinó a través de la prueba de Western Blot. El análisis comparativo de la respuesta humoral indicó que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el título de anticuerpos IgG contra *N. fowleri*, presentando mayor reactividad el Valle del Mayo. Por otro lado, los sueros probados de ambas regiones, reconocieron un grupo heterogéneo de proteínas con masa molecular de 37 hasta 70 KDa para el lisado de *N. fowleri*. A pesar de la cercanía de ambos valles, los sueros mostraron diferencias en el título de anticuerpos y no manifestaron un reconocimiento proteico total a las mismas proteínas de *Naegleria fowleri* reveladas por el Western blot.

## INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre patógenas constituyen un grupo de protozoarios representados por *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Sappinea diploidea*. Estas amibas de vida libre (AVL), producen en el hombre enfermedades de curso diverso; desde cuadros agudos a fatales con componentes de predominio necrótico a enfermedades crónicas con reacción inflamatoria granulomatosa (Oddó, 2006).

Presentan amplia distribución en la naturaleza donde viven como fagótrofos en distintos cuerpos de agua, suelo; asimismo, se han aislado del aire que les sirve como medio de dispersión. Por su capacidad de vivir libres en la naturaleza y actuar como organismos parásitos oportunistas, han sido caracterizados como anfizóicos (Ávila y col., 2006), que pueden afectar la salud del hombre, es por ello, la importancia que tienen en el campo de la salud pública (Beltrán y Uyema, 1997).

La capacidad que presentan las AVL para sobrevivir en distintos entornos ambientales, hace posible la interacción constante con los seres humanos y animales, por lo que es factible encontrar anticuerpos séricos en individuos saludables, que pueden ser producto de una respuesta inmune humoral o quizás representar una reactividad cruzada con ciertos antígenos. No obstante, aún se desconoce si estos anticuerpos naturales resultan de la inmunidad protectora contra las infecciones que ocasionan, debido a la complejidad del sistema inmunológico y a los factores precisos que contribuyen a la resistencia del huésped (Cursons y col., 1980; Schuster, 2002; Visvesvara y col., 2007).

El contacto de las AVL con el ser humano es constante debido a su fácil aislamiento en la naturaleza, lo cual quizás sea la causa de la presencia de anticuerpos anti-*Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Balamuthia* en sueros humanos (Bonilla-Lemus y col., 2005; Chapell y col., 2001; Huang y col., 1999; Marciano-Cabral, 1988).

La respuesta inmune humoral con anticuerpos IgA, IgG e IgM contra *N. fowleri* ha sido evaluada en personas sanas y enfermas en varias partes del mundo en muestras séricas y de saliva (Rivera y col., 2001). La capacidad de *N. fowleri* para causar

enfermedad es debido, en parte a la evasión del sistema inmunológico del huésped y a la migración al sistema nervioso central (Réveiller y col., 2001).

A pesar de la prevalencia de las AVL en el ambiente, pocas infecciones se han reportado; una posible explicación que la exposición ubicua de los humanos a más de una especie amibiana no patógena relacionadas antigénicamente, pueden inmunizar contra especies patógenas más virulentas (Cursons y col., 1980).

Es importante indicar, que la presencia de *N. fowleri* en nuestro medio es considerada por la autoridad sanitaria de Sonora (Dirección General de Regulación y Fomento sanitario de los Servicios de Salud) un riesgo para la salud de la población del estado, ya que sus temperaturas elevadas prevalecen en gran parte de su territorio durante la mayor parte del año (Gómez-Infante y col., 2002). Como resultado de las acciones de vigilancia y control sanitario de AVL en nuestro estado, se han aislado amibas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* a partir de piscinas y diversos cuerpos de agua, señalando que las altas temperaturas son un factor de riesgo determinante para su presencia (Gómez-Infante y col., 2002).

Lares-Villa y col. (1997), demostraron la presencia de *N. fowleri* y cepas patógenas de *Acanthamoeba* en distintos medios acuáticos del Valle del Yaqui, Sonora, años más tarde (2001), se detectó la presencia de estos microorganismos en jacuzzis y piscinas de uso recreativo en la Ciudad de Hermosillo, Sonora, justificando la necesidad de revisar la normatividad que permitiera la evaluación de las condiciones de saneamiento de balnearios y sitios con medios acuáticos de uso recreativo (Lares-Villa y col., 2001b). Estos estudios resultaron ser la piedra angular para la implementación permanente de los Sistemas de Vigilancia Epidemiológica para enfermedades producidas por AVL en Sonora (Espinoza-Verdugo, 2006).

Lares-Villa reporta que la mayoría de los casos de MAP registrados en la República Mexicana corresponden a la región noroeste, principalmente Baja California y Sonora, que son identificados por sus altas temperaturas en verano. Es imprescindible destacar que su detección es debida seguramente, al sistema de vigilancia epidemiológica que es llevada en ambos estados (Lares-Villa, 2001a; Lares-Villa y col., 1993).

Espinoza-Verdugo y col. (2006) determinaron la concentración de *Naegleria* spp. termofílicas en aguas naturales de uso recreativo en el Valle del Yaqui, y un año más tarde, se determinó la presencia de amibas de vida libre en muestras acuáticas en el Valle del Mayo, aislando amibas del género *Naegleria* y varios géneros más; aunque en las muestras analizadas no se aisló *N. fowleri*, no se descarta su presencia en el entorno (Lares-Jiménez y Lares-Villa, 2009). Hasta el día de hoy, no existen reportes de casos de MAP que hayan ocurrido en la región del Valle del Mayo.

Considerando que en el Valle del Yaqui y en el Valle del Mayo se han aislado amibas del género *Naegleria* y que éstas a su vez pueden interactuar con el sistema inmunológico de los residentes, se propone un estudio que permita comparar la respuesta humoral (IgG) contra los antígenos proteicos de *N. fowleri* en residentes de ambas regiones; asimismo, destacando que las características ambientales del Estado de Sonora son factores importantes para creer primeramente, la existencia de anticuerpos contra las AVL en una población sonoreense que actualmente no tiene reportes previos de estudios de la respuesta humoral contra *N. fowleri*, resulta interesante conocer también el perfil de proteínas que pudieran identificar los anticuerpos IgG de las muestras séricas de dichas poblaciones hacia *N. fowleri*, por lo que se realiza la siguiente pregunta de investigación:

¿Los sueros humanos del Valle del Mayo y Valle del Yaqui presentan el mismo título de anticuerpos IgG e identifican las mismas bandas proteicas de *Naegleria fowleri*?

## ANTECEDENTES

*Naegleria fowleri* es una AVL patógena con distribución mundial, que puede infectar a humanos causando meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), enfermedad de curso rápido y fatal (Oh y col., 2005) y dado a que la infección por este microorganismo produce rápidamente la muerte, la respuesta inmune al parásito ha sido poco estudiada (Oddó, 2006). En la actualidad, se sabe que *N. fowleri* es la única especie del género *Naegleria* que causa infección al ser humano (Kyoung y col., 2007) y se encuentra asociada al contacto con aguas cálidas (Shenoy y col., 2002).

Respecto a las características del protozooario se señala que es un organismo termotolerante, capaz de sobrevivir a la temperatura de 45°C, preadaptándose a la temperatura corporal de mamíferos (Schuster, 2002). Por esta razón, esta amiba prolifera durante los meses calurosos del año cuando la temperatura es alta y su desarrollo se favorece en áreas geográficas con climas tropicales (Kyoung-Ju y col., 2007; Oddó, 2006).

Aunque las temperaturas elevadas están asociadas con el aumento de la presencia de *N. fowleri*, las condiciones térmicas que inducen o seleccionan las cepas patógenas de las amibas son entendidas de manera incompleta. Los estudios sugieren que un rango de temperatura de 30 a 40°C está asociado a una frecuencia elevada de aislamiento de *N. fowleri*, en ambientes con altas temperaturas (Huizinga y col., 1990).

Las amibas del género *Naegleria* son protozoarios a los que continuamente los seres humanos son expuestos en el curso de su vida, a través del contacto directo con suelo, agua o por quistes transportados por el viento que podrían hospedarse en la mucosa nasal (Schuster y Visvesvara, 2004). Se ha propuesto que la patogenicidad de *N. fowleri* está determinada más, por la capacidad de proliferar y escapar de las defensas del huésped que por factores de virulencia únicos (Reilly y col., 1983a).

## **Estudios Sobre la Respuesta Inmune Contra *N. fowleri***

La presencia de anticuerpos contra *Naegleria* spp. ha sido investigada en mamíferos salvajes, animales de laboratorio y en humanos (Myoung-Soo y col., 2003). No obstante, la respuesta del huésped generada ante la infección por *N. fowleri* aún no ha sido bien entendida. El papel protector que los anticuerpos pudieran desempeñar no se ha establecido con claridad (Hernández-Martínez y col., 2003).

La interacción de las AVL con los seres humanos es reconocida por el sistema inmunológico, que ha sido motivo de estudio por distintos investigadores. En el transcurso del tiempo se ha encontrado una gama de evidencias importantes de tales interacciones (Marciano-Cabral y col., 2007).

La especificidad y afinidad de los anticuerpos presentes en una concentración adecuada, los hace muy eficaces para proporcionar protección contra ciertos parásitos, aunque el papel que pudieran jugar éstos en la protección contra *N. fowleri* no está claramente entendido. Debido a que la mayoría de los pacientes mueren rápido después de la infección y por lo tanto, existe tiempo insuficiente para montar una respuesta detectable por técnicas de laboratorio, su utilidad para desarrollar pruebas diagnósticas es muy limitada (Visvesvara y col., 2007).

En 1978, Haggerty sostenía que existían relativamente pocas infecciones causadas por AVL, aunque creía que había un gran número de individuos expuestos. También afirmaba que los factores de resistencia a infecciones de *N. fowleri* no eran claras en humanos y en MAP inducida en experimentos con animales (Haggerty y John, 1978). Varios intentos se han hecho por inducir la inmunidad protectora contra *N. fowleri* en ratones experimentales, pero el estudio de la inmunidad en infecciones naturales y experimentales ha sido limitado al análisis de la respuesta de anticuerpos séricos (Rojas-Hernandez y col., 2004).

En muestras séricas de individuos saludables pertenecientes a Nueva Zelanda se encontraron anticuerpos de clase IgG e IgM contra *Naegleria* patógena y no patógena, en títulos 1:5 a 1:120 (Cursons y col., 1980).



Reilly y col., (1983b) propusieron que la presencia de anticuerpos circulantes anti-*N. fowleri* en sueros humanos señalaba una exposición previa al antígeno correspondiente, más no indicaba un estado de la resistencia del huésped a este protozooario.

Asimismo utilizando sueros de residentes de Pennsylvania, Carolina del Norte y Virginia, se demostró la especificidad de anticuerpos de la clase IgM para especies de *Naegleria*, analizados por pruebas de aglutinación. Con los datos obtenidos se mostró que los sueros de individuos residentes del sureste de E.U.A. poseían actividad aglutinante más alta contra *Naegleria* spp., al ser ésta comparada con la respuesta inmunológica de los individuos de Pennsylvania (Marciano-Cabral y col., 1987; Ferrante, 1991).

Ferrante y Rowan-Kelly (1988), sugieren que los anticuerpos juegan un papel importante en la protección adquirida por inmunización con *N. fowleri* en ratones. El análisis de su estudio evidenció que el grado de protección se relacionaba con los niveles de anticuerpos anti-*N. fowleri* que reaccionaron con la superficie de la amiba, demostrando que la inmunidad a esta especie resultaba de la colaboración de células fagocíticas y anticuerpos. También opinaban que es posible que aquellos sujetos que no han sido expuestos al antígeno de *N. fowleri* o quienes no han desarrollado anticuerpos sean más vulnerables a desarrollar MAP.

En sueros de pacientes de Tennessee, E.U.A., se encontraron anticuerpos (IgG e IgM) contra *N. fowleri* y *N. lovaniensis* en más del 80% en la población estudiada, con títulos de 1:20 a 1:640 (Dubray y col., 1989). Por otro lado, en un grupo seleccionado de Checoslovaquia (estudiantes y pacientes psiquiátricos), los porcentajes de individuos con respuesta positiva a *Naegleria* fue 1 a 4 % (Cerva, 1989).

En la República Mexicana, se evaluaron anticuerpos IgA e IgM en muestras séricas y salivales tanto de personas saludables como de sujetos enfermos, quienes viven en la Ciudad Valles, San Luis Potosí, caracterizada por sus condiciones climáticas apropiadas para la presencia de AVL; lugar donde fue aislado una cepa de *N. fowleri*. Los investigadores reportan que los anticuerpos IgA e IgM reconocen proteínas de *N. fowleri* siendo encontrados en muestras de saliva y suero, determinados a través del método de

ELISA (Rivera y col., 2001). Una continuación a este trabajo, determinó que las IgA de las muestras de los pacientes reconocieron a un mayor número de proteínas que el grupo control sano. Las proteínas que con mayor frecuencia fueron identificadas por aquellas muestras tienen masas moleculares de 171, 107, 102, 62, 50, 46 y 10 KDa (Rivera y col., 2000).

Hernández-Martínez. y col. (2003), detectaron niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* a diluciones del suero de 1:100 y 1:500, en residentes de Mexicali, Baja California, ciudad donde la MAP es considerada como endémica, ya que el número de casos reportados representan casi el 10% del total de casos descritos a nivel mundial; asimismo, esta región se caracteriza por tener ambientes desérticos, donde las altas temperaturas son prevalentes especialmente en meses de verano, favoreciendo al desarrollo de éste protozooario termofílico (Lares, F., 2001a).

Los resultados de este estudio indicaron que los anticuerpos séricos IgG de las muestras reconocieron un grupo heterogéneo de proteínas en los lisados amebianos de *N. fowleri*, determinados por Western blot. No obstante, a pesar de la heterogeneidad de la respuesta, pudieron ser identificadas algunas proteínas relevantes (mismas que fueron reconocidas por varias muestras), con masas moleculares aproximadas de 120, 95, 45, 36, 20, 15 y 6.5 KDa. Los investigadores concluyeron que la gente saludable de dicho lugar ha estado expuesta a *N. fowleri* (Hernández-Martínez, M.D., 2003).

### **Técnicas Inmunológicas**

Varias técnicas para evaluar la respuesta inmunitaria humoral han sido utilizadas ante la necesidad de entender mejor la transmisión ambiental de las AVL y la epidemiología de la enfermedad. Dichas técnicas incluyen al ensayo de anticuerpos fluorescentes indirecto, la hemaglutinación indirecta, el Western Blot (Powell y col., 1994) y la ELISA (Ferrante y col., 1988). Los resultados de las diversas investigaciones sugieren que los humanos tienen anticuerpos de forma natural, reactivos anti-amiba, siendo representados por IgG e IgM (Powell y col., 1994).

Los distintos estudios efectuados a lo largo del tiempo, demuestran significativamente que existen evidencias de una respuesta humoral contra *Naegleria* spp. presentes en el ambiente, sin embargo, la comparación de los resultados de dichas investigaciones no es factible del todo, debido a que fueron procesadas con distintas técnicas; por lo tanto, las diferencias observadas en la medición de la respuesta humoral, se acepta que puede estar una función de las técnicas usadas en la demostración del título de anticuerpos (Schuster y col., 2004).

### **ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)**

El inmunoensayo enzimático conocido como ELISA, fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman. En este sistema el antígeno o el anticuerpo se absorben a una fase sólida (microplacas de poliestireno, o bien membrana de nitrocelulosa), sobre la cual se llevan a cabo las reacciones. Se utilizan anticuerpos conjugados a enzimas; los primeros conservan su capacidad de unión específica al antígeno, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción en la cual el sustrato se transforma en un producto de color (Correa y col., 2000).

La técnica ELISA se basa en dos fenómenos biológicos importantes:

1. La elevada especificidad de los anticuerpos (Ac).
2. La alta actividad de algunas enzimas usadas en este tipo de ensayos, lo que le permite la amplificación de la señal generada de la muestra.

Los inmunoanálisis comprenden dos etapas generales: la reacción de un inmunoreactante con un antígeno (Ag) o Ac y la detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático (Margni, 1996).

Existen variantes de ELISA: directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto con el que se detectan anticuerpos (Correa y col., 2000).

En todos los ensayos ELISA en fase sólida, independientemente de las numerosas estrategias existentes, se pueden distinguir 3 etapas:

1. Inmovilización del inmunorreactante (Ag o Ac) en la fase sólida.
2. Incubación de la muestra de modo que ésta reaccione con el inmunorreactante inmovilizado.
3. Amplificación o modulación por medio de la utilización de un conjugado enzimático (esta etapa puede en realidad ser de más de un paso) (Margni, 1996).

Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -galactosidasa, debido a su estabilidad y a la reproducibilidad de los resultados. Los sustratos para la enzima HRP son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos que al oxidarse en la reacción enzimática desarrollan color. De éstos, la empleada con mayor frecuencia es la orto-fenilendiamina, que continúa en forma soluble después de ser oxidada.

El ELISA es muy versátil por lo que presenta aplicaciones muy variadas como diagnóstico de enfermedades infecciosas, cuantificación de hormonas, haptenos y titulación de anticuerpos, entre otras (Correa y col., 2000).

**ELISA indirecto:** Consiste en la fijación del inmunorreactante (Ag) a la placa de poliestireno, reacción con Ac específicos y posterior revelado con un conjugado anti-inmunoglobulinas especie-específicos. El propósito de utilizar este procedimiento es conocer el título de anticuerpos anti-*N. fowleri* presentes en los sueros humanos a analizar (Margni, 1996).

El procedimiento general consta de distintas etapas detalladas a continuación:

**Fijación o sensibilización de la microplaca:** Consiste en adsorber una concentración determinada del antígeno a estudiar. Este proceso de unión a fase sólida se realiza incubando toda la noche a 4°C o una hora a 37°C.

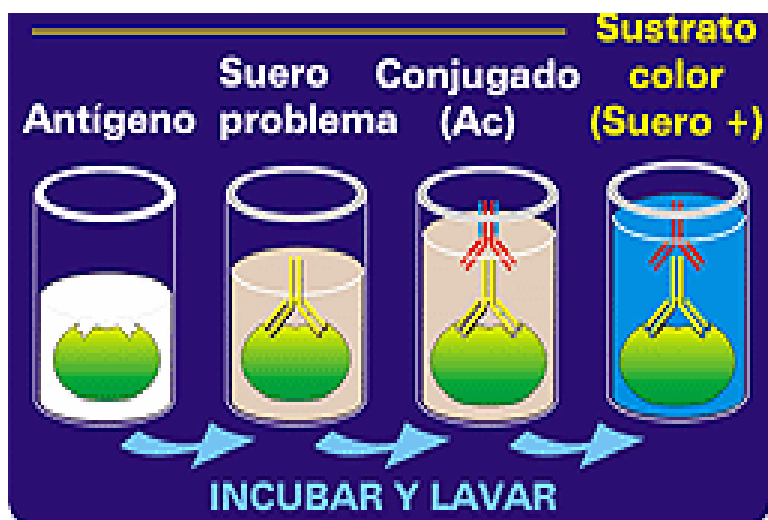
Los factores más importantes en el proceso de adsorción de los inmunorreactantes a fase sólida son la temperatura, tiempo, pH y la concentración.

**Proceso de bloqueo:** Debido a que después de la etapa de sensibilización de la fase sólida persisten sitios de unión al plástico no ocupados, es necesario bloquear estos sitios con proteínas ajenas al sistema. De otro modo, los inmunorreactantes que se emplearán en etapas posteriores podrán unirse a estos sitios, produciendo resultados falsamente positivos.

En una etapa siguiente se agrega la muestra con lo que el componente a analizar es retenido. Posteriormente este reacciona con el inmunorreactante específico marcado con una enzima. La actividad enzimática será una medida de la actividad o concentración del componente de la muestra retenido por el antígeno fijado a la placa de poliestireno (Figura 1). En general se incuba entre una y tres horas a temperatura ambiente o a 37°C en cámara húmeda. En cualquiera de sus variantes, la etapa del lavado es crítica para separar el componente específicamente unido al inmunorreactante inmovilizado a fase sólida, de componentes que pueden reaccionar en forma no específica (Margni, 1996).

### **Electroforesis en Gel de Poliacrilamida**

Es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida. Se ha descrito que el poro del gel desempeña un papel fundamental. En el caso de los geles de poliacrilamida pueden conseguirse poros de diferentes diámetros según las condiciones de polimerización: como consecuencia, para un gel de determinado poro, el tamaño molecular y la carga neta serán los factores determinantes de la separación de las moléculas de una mezcla.



**Figura 1.** Esquema General del Procedimiento ELISA.

Fuente: [www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm](http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm)

Los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización en largas cadenas de la acrilamida monomérica ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) y de su entrecruzamiento por intermedio de la N,N'-metilenbisacrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), comúnmente llamada bisacrilamida. El tamaño del poro formado, dependerá de las concentraciones relativas de ambos reactivos durante la polimerización.

La polimerización requiere de la presencia de iniciadores, los más utilizados son el persulfato de amonio o riboflavina y como acelerador se utiliza N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED).

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede desarrollarse también usando soluciones buffer que contienen sustancias disociantes, en especial detergentes iónicos como el SDS (Dodecilsulfato de sodio).

Las proteínas a analizar son hervidas a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  en presencia de un exceso de SDS y 2 –mercaptoetanol. En esas condiciones el tiol rompe los puentes disulfuro y el agente desnaturizante hace que la proteína se desdoble en sus polipéptidos constitutivos, estos fijan el SDS por lo que la carga de todas las moléculas será prácticamente idéntica. Su desplazamiento en un campo eléctrico, en el que el soporte de corrida es un gel de determinada porosidad, dependerá exclusivamente de su tamaño molecular, este procedimiento permite determinar la masa molecular relativa de los productos en análisis, por comparación de sustancias de masa molecular conocida que han sido corridas simultáneamente. Las bandas proteicas son reveladas mediante una tinción con colorantes como el azul de Coomassie, nitrato de plata o con ácido periódico de Schiff (PAS) (Margni, 1996).

### **Western Blot**

Es uno de los métodos más útiles con que se cuenta para el análisis antigénico, sirve para identificar antígenos específicos por su reconocimiento a través de anticuerpos policlonales o monoclonales. Esta metodología combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), en presencia o ausencia de detergentes

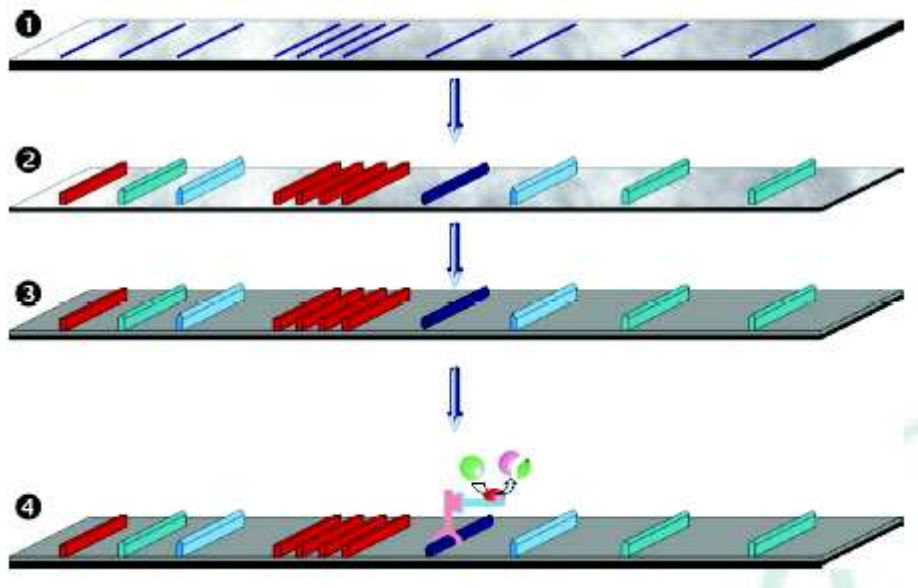
como el dodecil sulfato de sodio (SDS), con las reacciones inmunoenzimáticas en fase sólida.

En el primer paso, las proteínas se separan de acuerdo a sus masas moleculares, lo que permite su identificación. Posteriormente, son electrotransferidas a una membrana de celulosa (NC) o de Nylon, en donde se unen a los grupos reactivos de éstas, quedando inmovilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón obtenido sobre el papel de NC es una copia del patrón de separación obtenido en el gel. Posteriormente se bloquean los sitios reactivos del papel que quedan libres, con alguna proteína que no interfiera y a continuación se hace reaccionar con los anticuerpos problema, los cuales podrán unirse a sus antígenos correspondientes inmovilizados en el papel. La siguiente reacción corresponde a la primera interacción antígeno-anticuerpo, que se pone de manifiesto al agregar un segundo anticuerpo unido a una enzima cuya actividad se visualiza mediante la adición del sustrato y el cromógeno. El desarrollo de una banda de color indica resultado positivo (Figura 2) (Correa y col., 2000).

Retomando las evidencias descritas que demuestran una respuesta humoral contra *N. fowleri* en humanos y animales; actualmente, el significado que pueden representar los anticuerpos, aún es controversial.

Como factores importantes que justifiquen este proyecto de investigación que evalúe la respuesta humoral de una población exclusiva del sur de Sonora constituida por el Valle del Mayo y Valle del Yaqui se han descrito brevemente antecedentes de aislamientos de AVL, condiciones climáticas elevadas y un reporte de caso de MAP en el Valle del Yaqui. El punto de partida del mismo es nuestra hipótesis indicando que los sueros humanos del Valle del Mayo y Valle del Yaqui presentan el mismo título de anticuerpos IgG y reconocen las mismas bandas inmunorreactivas del lisado amebiano de *N. fowleri*, para llevar a cabo este estudio determinamos nuestros objetivos que nos permitirán efectuar este proyecto, mediante la técnica de Western Blot que se detalla en la Figura 2.





**Figura 2.** Fases de un Western Blot. 1. Transferencia de las proteínas a la membrana. 2. Bloqueo de la membrana no ocupada por las proteínas para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. 3. Unión del ligando específico (anticuerpo primario) a las proteínas transferidas. 4. Detección mediante un anticuerpo secundario conjugado con HRP o FA.  
Fuente: [www.cultek.com](http://www.cultek.com)

## **METODOLOGÍA**

### **Tipo de Investigación y Población de Estudio**

El presente proyecto de investigación es clasificado como: Transversal analítico y la población de estudio fue integrada por residentes del Valle del Yaqui y residentes del Valles del Mayo, representados por donadores de sangre (sexo masculino) que asisten a los Bancos de sangre del Hospital General de Zona No. 3 del IMSS de Navojoa y de la Unidad Médica de Alta Especialización del IMSS de Cd. Obregón, Sonora. El rango de edad de los participantes es 18 a 65 años.

### **Selección de Muestra**

Durante el proceso de selección de la población se llenó una ficha de identificación con los datos del donador y al mismo tiempo, se solicitó su consentimiento para participar en el proyecto firmando una carta de consentimiento informado. En este estudio sólo participaron donadores de sangre aptos (sin presencia de anticuerpos contra Hepatitis B, Hepatitis C, SIDA, Sífilis y/o Brucelosis), quienes fueron seleccionados bajo la NOM-003-SSA2-1993 que rige los procedimientos para el banco de sangre.

### **Criterios de Selección**

La aceptación de los participantes en el estudio fue determinada por los criterios de selección establecidos que a continuación se detallan:

### **Criterios de Inclusión:**

- Donadores aptos en entrevista clínica: Aquellos individuos que cumplan con los requisitos marcados por la norma oficial mexicana, en la selección médica.
- Residentes de las áreas en estudio (Valle del Yaqui y Valle del Mayo).

### **Criterios de Exclusión:**

- Donadores aptos con al menos una prueba positiva de los marcadores infecciosos.
- Donadores procedentes de otras regiones geográficas.

### **Recolección de Muestras Séricas**

La obtención de muestras sanguíneas se hizo recolectando en tubos sin anticoagulante a partir de una extracción venosa, y el procesamiento de las mismas para la separación del suero se obtuvo posterior a la centrifugación realizada a 3000 rpm durante 15 minutos. El volumen sérico obtenido fue aproximadamente 3 mL. Para evitar sesgos experimentales se eliminaron muestras lipémicas o hemolizadas que pudiesen alterar el resultado de las mediciones efectuadas.

El tipo de muestreo está clasificado como no probabilístico intencional y el universo de trabajo fue de 500 muestras séricas que cumplieron los criterios de selección, que correspondieron a 250 del Valle del Mayo y el resto al Valle del Yaqui. Posterior a este paso, el total de muestras séricas que se recolectaron fueron conservadas a  $-45^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador REVCO, hasta el momento de su uso.

## **Preparación de Antígeno**

Se prepararon antígenos de *N. fowleri* (Anexo I, II) para llevar a cabo el proceso de fijación a la microplaca de ELISA, mismos a los que se les midió la concentración de proteínas por el método de Bradford (Anexo III).

### **Curva Patrón de Proteínas**

Se construye a partir de una solución estándar de albúmina bovina sérica (1 mg/mL) a través del método Bradford (Anexo III). La concentración de proteínas presente en los extractos amebianos de *N. fowleri*, se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. Este procedimiento es indispensable para ajustar la cantidad de antígeno a fijar en la microplaca ELISA.

### **Selección de Concentración Óptima de Antígeno**

La descripción del procedimiento se detalla en el Anexo IV y consiste en hacer reaccionar distintas concentraciones de antígeno amebiano que se fija en la placa ELISA con un anticuerpo primario de suero hiperinmune anti-*N. fowleri* de conejo obtenido de investigaciones previas analizado a distintas diluciones. La elección de la concentración óptima de trabajo se determinó de acuerdo a la respuesta observada en cada una de las concentraciones y la utilidad de utilizar bajas concentraciones de antígenos.

## **Determinación del Título de Anticuerpos en Muestras Humanas**

A 500 muestras séricas se les determinó el título de anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* (Anexo V), procesadas a diluciones 1:100 y 1:500; utilizando la técnica de ELISA indirecta (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay). El análisis de las muestras se hizo por duplicado para asegurar la confiabilidad de los resultados. Un elemento esencial en todo ELISA cuantitativo es establecer el valor de discriminación entre una muestra positiva y negativa. El punto de corte fue definido por el valor de la media de la densidad óptica de los controles negativos más tres desviaciones estándar.

## **Análisis de PAGE y Western Blot**

Para el análisis de las bandas inmunorreactivas de sueros positivos, se realizó primero una electroforesis de extractos crudos de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *A. mauritaniensis* en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE). Finalizada la PAGE se obtuvo información acerca de las proteínas, a través del proceso de transferencia denominado blotting desde el gel a una membrana de nitrocelulosa. El proceso general del Western blot consiste en distintas etapas, que inicia con la transferencia de proteínas, le sigue el bloqueo de la membrana, posteriormente, la unión del ligando (primer anticuerpo) y la detección con el segundo anticuerpo marcado con peroxidasa (Anexos VI y VII). Por último, se determinaron las masas moleculares de las bandas proteicas inmunorreactivas de los distintos lisados de AVL, comparándolas con un marcador comercial de masas moleculares.

Seis muestras de sueros humanos con reactividades altas (medidas por ELISA) de anticuerpos IgG contra *N. fowleri* correspondientes al Valle del Mayo (N=2) y al Valle del Yaqui (N=4), fueron analizadas por Western Blot.

Este procedimiento se realizó en el laboratorio de investigación y posgrado de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional (IPN) de la Cd. de México, D.F., bajo la dirección del Dr. Saúl Rojas Hernández.

## **Análisis Estadístico**

La variable Residencia fue medida a través de un análisis descriptivo que mostró la proporción de los residentes participantes del estudio a las distintas poblaciones pertenecientes al Valle del Mayo y Valle del Yaqui de Sonora.

El análisis estadístico de los datos correspondientes a la medición de los anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* de las 500 muestras humanas se realizó con las lecturas de absorbancias obtenidas a 492 nm. La estimación de las diferencias entre los grupos se determinó a través de una prueba no paramétrica U de Mann Whitney, que utiliza como medida de tendencia central la mediana, debido a que el comportamiento de los datos presentó una distribución no normal. Se establecieron las hipótesis estadísticas para determinar el estudio comparativo de las reactividades de la inmunoglobulina G de los sueros humanos contra *Naegleria fowleri* que continuación se describen:

Hipótesis nula ( $H_0$ )= No existen diferencias significativas en el título de anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* entre el Valle del Mayo y Valle del Yaqui.

Hipótesis alterna ( $H_a$ )= Existen diferencias significativas en el título de anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* entre el Valle del Mayo y Valle del Yaqui.

### **Nivel de significancia**

Para todo valor de probabilidad igual o menor que 0.05, se acepta Hipótesis alterna y se rechaza Hipótesis nula.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

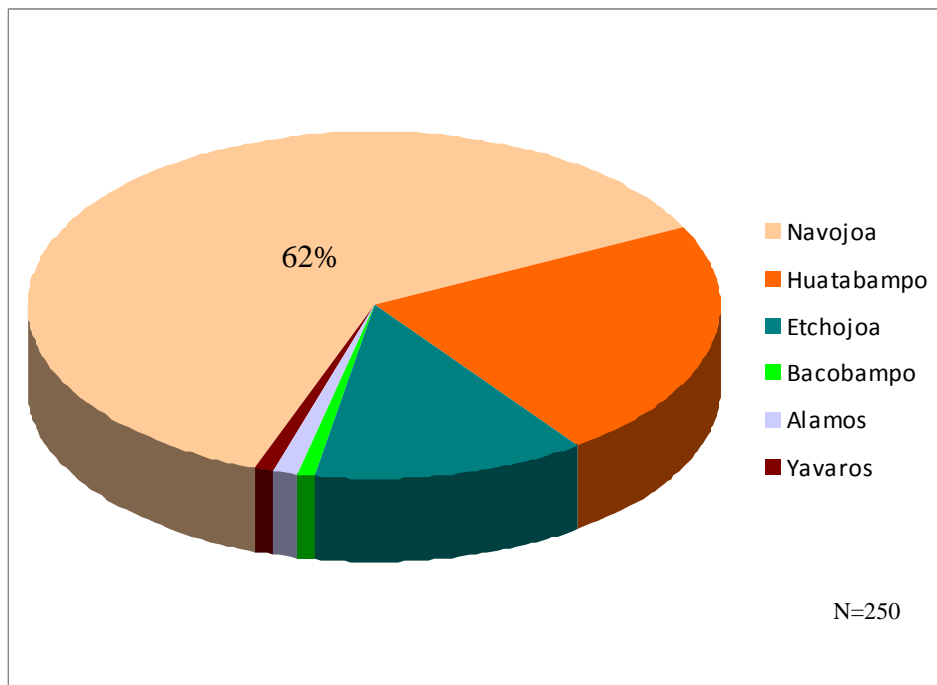
En la presente investigación se evaluó la respuesta humoral tipo IgG ante antígenos de *Naegleria fowleri* en 500 sueros humanos de personas saludables residentes del sur de Sonora, determinados a través del método ELISA. Los participantes del estudio fueron representados por una población exclusiva de disponentes sanguíneos del IMSS, de sexo masculino, que pertenecían al Valle del Mayo y Valle del Yaqui.

### Análisis Descriptivo de la Variable Residencia

La distribución de residencias de los participantes en la investigación, se midió de acuerdo a la frecuencia para cada entidad geográfica. El análisis de los datos indicó que para el Valle del Mayo, Navojoa representó un 62% de la población analizada, seguida de Huatabampo (22.4%) y Etchojoa (12.8%); mientras que el 2.8% representó a distintos municipios (Bacobampo, Álamos y Yavaros) como puede observarse en la Figura 3.

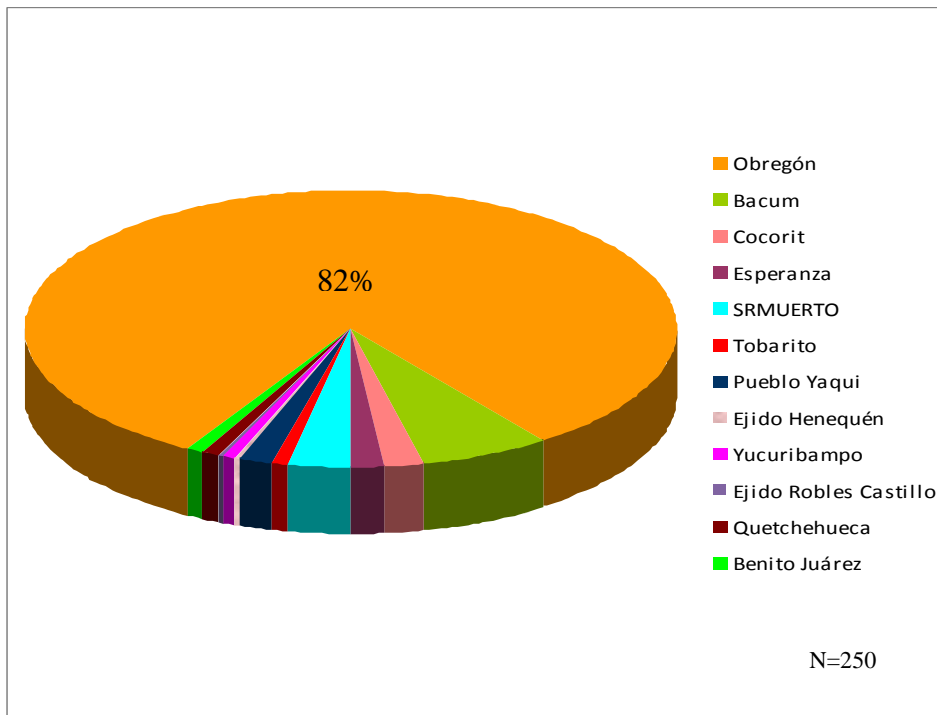
En la exploración de los datos correspondientes al Valle del Yaqui se observó que el 82% de los participantes analizados pertenecían a residentes de Cd. Obregón, Bácum representó el 6%, seguido de San Ignacio Río Muerto con un 3%, mientras que el resto de las comunidades representaron un 9% constituido por Cocorit, Esperanza, Tobarito, Pueblo Yaqui, Ejido Henequén, Yucuribampo, Ej. Robles Castillo, Quetchehueca y Benito Juárez (Figura 4).

La edad promedio de los participantes en el estudio de ambas poblaciones fue de 32 años. Es importante señalar, que al servicio de donación de sangre acuden con mayor frecuencia personas adultas jóvenes, con un rango de edad para donación que fluctúa entre 18 a 65 años. Al tomar en cuenta los criterios de inclusión en la selección de muestras, aseguramos que esta provenía de pacientes inmunocompetentes.



**Figura 3.** Distribución de residencia de los participantes del Valle del Mayo.





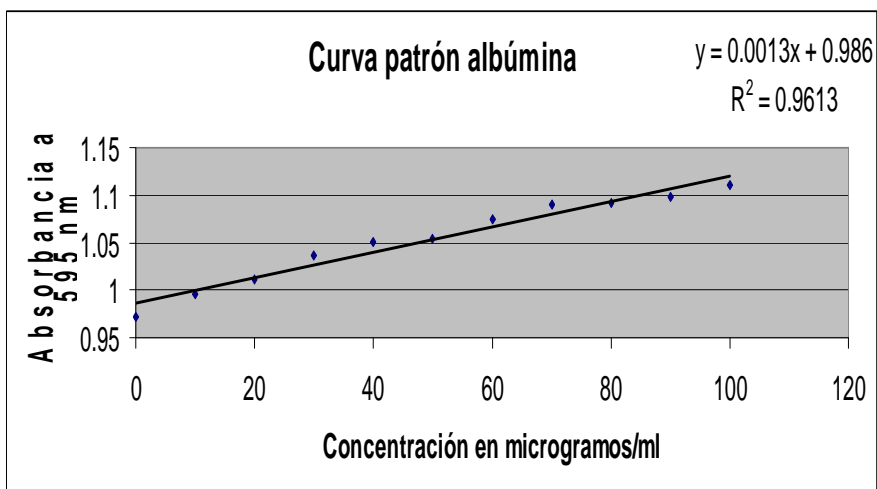
**Figura 4.** Distribución de residencia de participantes del Valle del Yaqui.

## Selección de Concentración Óptima de Antígeno

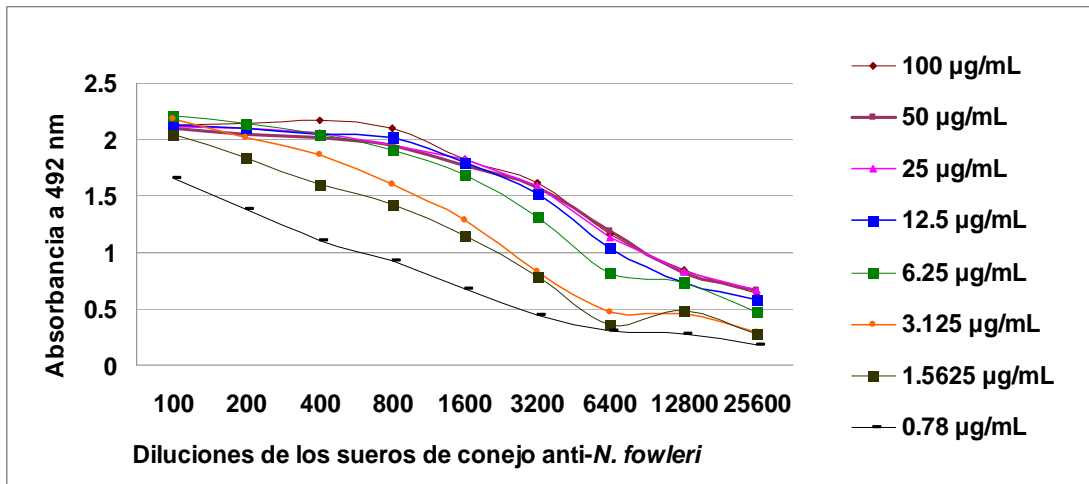
Para calcular la concentración de proteínas de los extractos amibianos de *N. fowleri* a utilizar durante los ensayos de ELISA, fue necesario establecer una curva patrón de proteínas determinada por el método de Bradford; la representación gráfica de la curva de referencia aparece en la Figura 5.

Una vez realizada la cuantificación de proteínas en los extractos de amibas utilizados para la técnica ELISA se establecieron los valores de antígeno a probar con las concentraciones que fluctuaron de 0.78 hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  y las diluciones seriadas del suero de conejo anti-*N. fowleri*. Los resultados de las correspondientes reacciones se aprecian en la Figura 6. Las reacciones antígeno-anticuerpo evidenciadas por la densidad óptica, indican que excepto las concentraciones proteicas de antígeno de 0.78 y 1.56  $\mu\text{g/mL}$ , las demás (3.125 a 100 $\mu\text{g/mL}$ ), presentaron reactividad con valores altos de absorbancia. Dicho resultado fue considerado como base para establecer una concentración de trabajo de 2  $\mu\text{g/mL}$  para los ensayos ELISA con los sueros humanos con el fin de disminuir los “fondos” de la reacción, que nos produzca resultados confiables y reproducibles, y que nos permita evidenciar el efecto de la dilución del suero a probar. Estudios previos realizados en el ITSON reportaron igualmente, una concentración óptima (2  $\mu\text{g/mL}$ ) de *N. fowleri* para la sensibilización de placas ELISA (Espinoza-Verdugo, 2004; Holguin, 2002).

Con base en un estudio realizado en Mexicali, Baja California que determinó la presencia de anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* en sueros humanos, se estableció una dilución de trabajo 1:100 y 1:500 para los sueros obtenidos en este estudio (Hernández-Martínez. y col., 2003). Asimismo, durante el proceso de estandarización, se estableció el punto de corte de la prueba para determinar qué sueros serían considerados positivos, esto es, qué sueros reconocen determinantes antigénicos de *N. fowleri* a través de anticuerpos IgG analizados por medio de la técnica inmunoenzimática, y cuáles serían considerados como negativos. El valor de la absorbancia para el punto de corte fue de



**Figura 5.** Curva patrón de Albúmina medida por Método Bradford.



**Figura 6.** Determinación de concentración óptima de antígeno por ensayo ELISA.

0.131, calculado a partir del valor de la media de la absorbancia de los testigos negativos que fue 0.0982, y la suma de tres desviaciones estándar determinada como 0.01097.

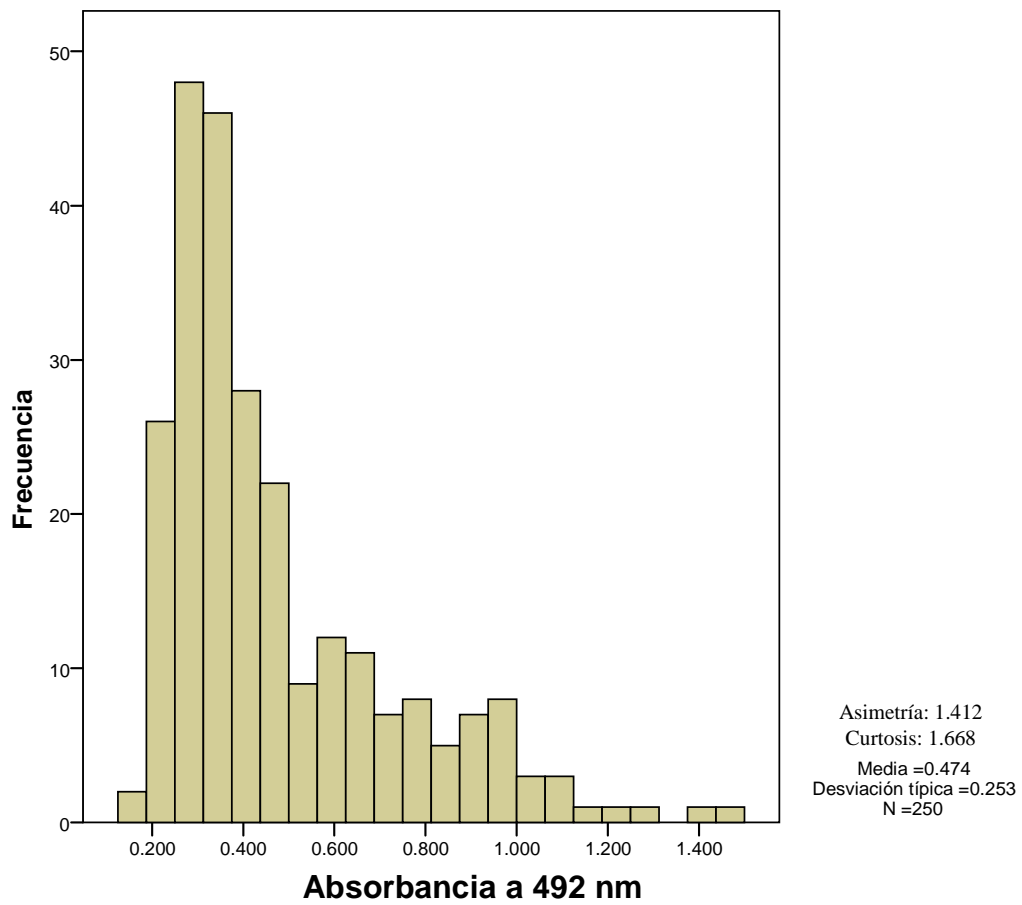
### **Respuesta Humoral IgG contra *N. fowleri* en Sueros Humanos del Valle del Mayo**

Las mediciones de las reactividades antígeno-anticuerpo de los sueros del Valle del Mayo diluidos 1:100, manifestaron valores de densidad óptica de 0.159 hasta 1.498 (Figura 7). Estos resultados reflejan que el 100% de los sueros presentaron absorbancias por arriba del punto de corte, lo que significa que dichos sueros presentan anticuerpos IgG anti-*N. fowleri*.

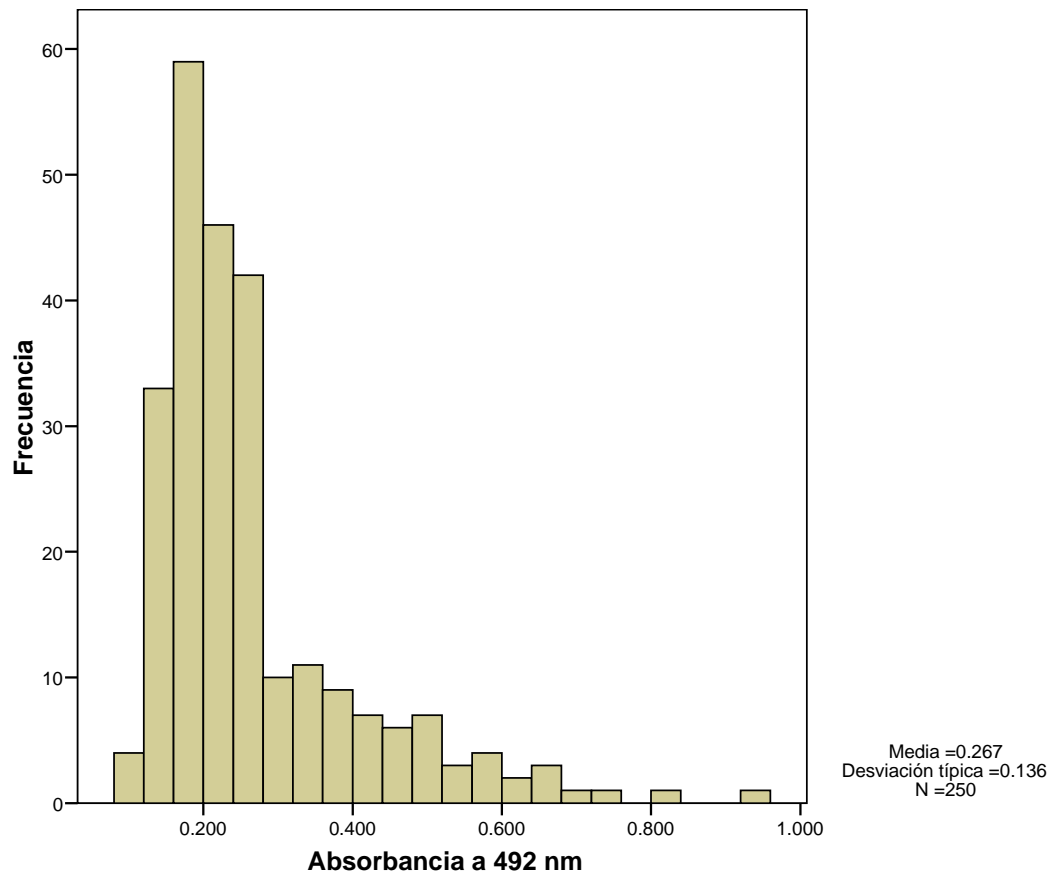
La medición de los anticuerpos presentes en los sueros humanos diluidos 1:500 contra el ameboflagelado correspondientes al Valle del Mayo, señaló una reactividad de IgG hacia el antígeno de *N. fowleri* en un 97.6% con valores de absorbancia superiores al punto de corte establecido (0.131). La distribución de las absorbancias que reflejan la reactividad de los anticuerpos IgG contra el extracto de *N. fowleri* fue 0.104 hasta 0.96 (Figura 8).

Las gráficas de distribución de frecuencias de los sueros diluidos 1:100 y 1:500, nos permiten observar que la mayoría de los sueros poseen absorbancias bajas en ambos casos, mostrando gráficas asimétricas con curtosis y sesgo hacia la derecha, acentuándose para las frecuencias de los sueros diluidos 1:500. El promedio de las absorbancias para los sueros diluidos 1:100 fue de 0.474, mientras que para los sueros analizados en dilución 1:500 éste bajó a 0.267. De cualquier manera es importante resaltar que hubo algunos sueros que mostraron reactividades por arriba o cercanas a uno de absorbancia, revelando una fuerte respuesta de anticuerpos contra los extractos de *N. fowleri*.

La presencia de anticuerpos anti-*N. fowleri* detectados en los sueros estudiados, puede ser explicada por la amplia distribución de las AVL demostrada por un estudio realizado por Lares-Jiménez y Lares-Villa (2009), quienes identificaron a distintos géneros de AVL en aguas superficiales del Valle del Mayo. En dicho estudio se



**Figura 7.** Reactividad de anticuerpos IgG contra *N. fowleri* en sueros humanos (1:100) del Valle del Mayo.



**Figura 8.** Reactividad de anticuerpos IgG contra *N. fowleri* en sueros humanos (1:500) del Valle del Mayo.

analizaron diferentes medios acuáticos de origen natural pertenecientes a Navojoa (Río Mayo, canales de Comisaría Rosales, Pueblo Viejo, Buiyacusi) y en Bacobampo (2 Bombas de riego utilizadas por la población cercana para bañarse en temporadas cálidas). Entre los aislamientos de amibas termofílicas, destacó el género *Naegleria*, que aunque en este muestreo no se identificó a *N. fowleri*, no se descarta la presencia de este microorganismo patógeno dado que se tienen las condiciones óptimas para su crecimiento (Marciano-Cabral, 1988).

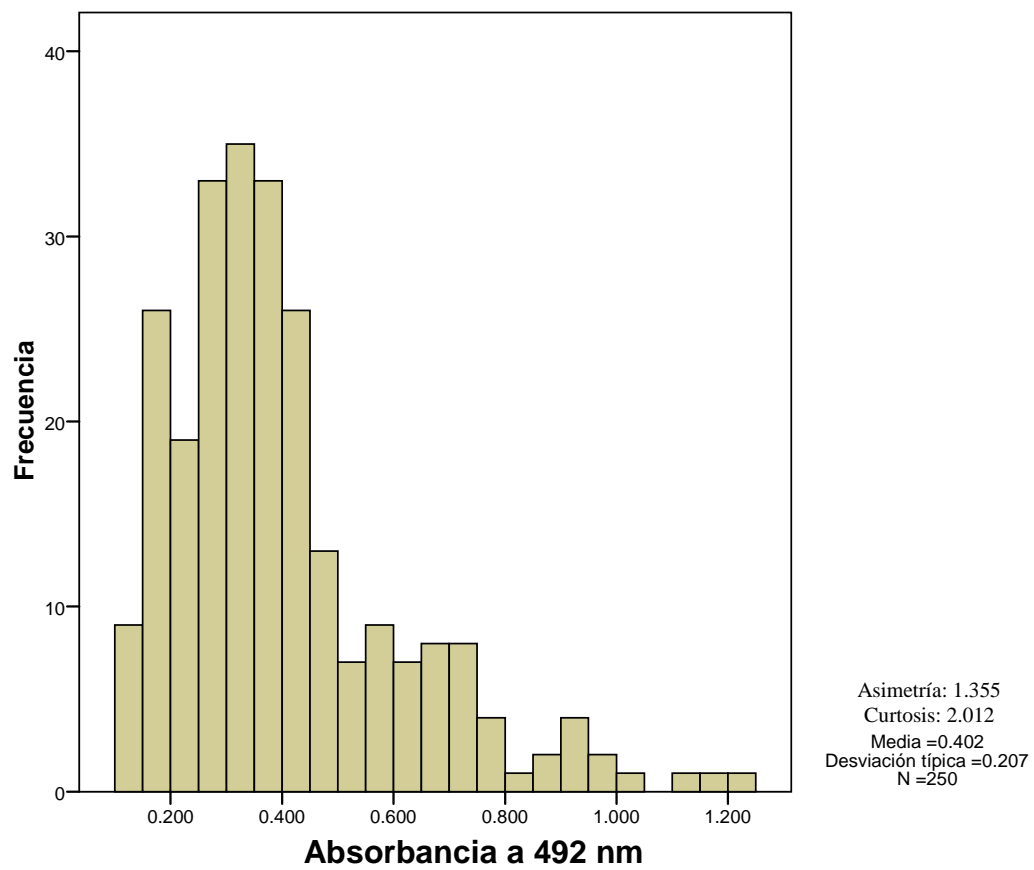
### **Respuesta Humoral IgG contra *N. fowleri* en Sueros Humanos del Valle del Yaqui**

La medición de anticuerpos IgG contra el agente causal de la MAP en los 250 sueros humanos procedentes del Valle del Yaqui, se distribuyeron con una absorbancia mínima de 0.130 a una absorbancia máxima de 1.239 para la dilución de trabajo 1:100, con una absorbancia media de 0.402 (Figura 9). Los resultados indicaron que en el 99.6% de las muestras séricas de la población del Valle del Yaqui se encuentran presentes anticuerpos de tipo IgG que reaccionan con extractos antigénicos de *N. fowleri*.

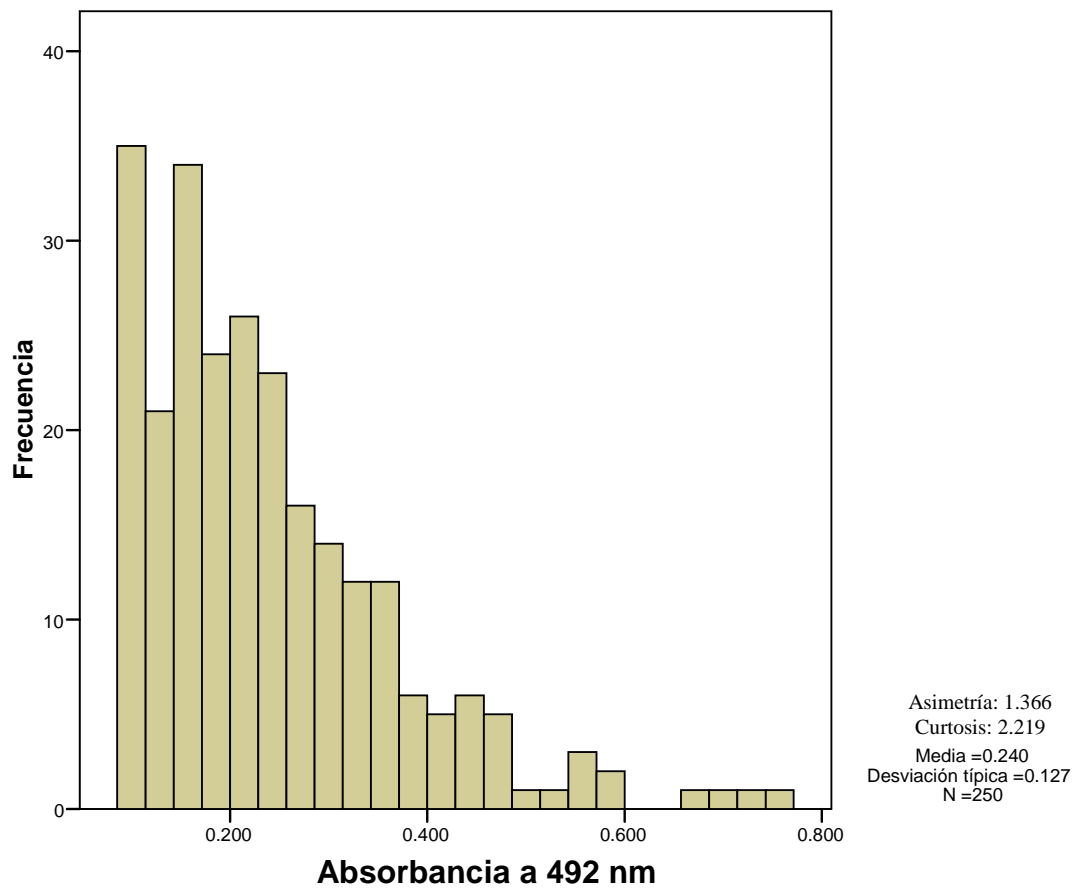
La medición de la respuesta humoral en la población residente saludable del Valle del Yaqui reveló que el 81.6% de los sueros analizados (1:500) presentaron anticuerpos IgG contra *N. fowleri*. El rango obtenido de las reactividades de IgG anti-*N. fowleri* de los sueros humanos fue 0.086 a 0.753 representado por un valor medio de 0.240. A pesar de que la concentración de anticuerpo fue disminuida con esta dilución de trabajo, se observó que aún se puede medir la respuesta humoral, misma que puede ser analizada con diluciones de trabajo más grandes (Figura 10).

La presencia de anticuerpos anti-*N. fowleri* en los sueros de los donadores del Valle del Yaqui, puede ser explicada por los diversos estudios sobre amibas de vida libre realizados en la región, en donde se ha reportado la existencia de la amiba responsable





**Figura 9.** Reactividad de anticuerpos IgG contra *N. fowleri* en sueros humanos (1:100) del Valle del Yaqui.



**Figura 10.** Reactividad de anticuerpos IgG contra *N. fowleri* en sueros humanos (1:500) del Valle del Yaqui.

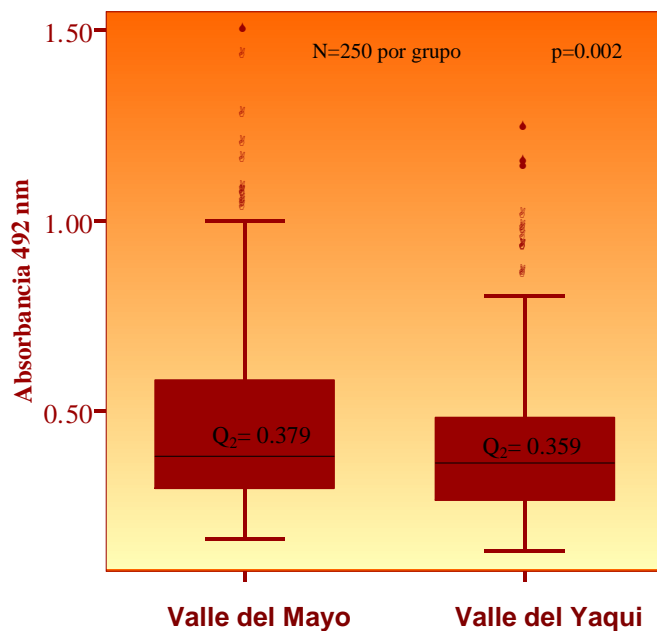
de la MAP en varias ocasiones, además de las especies *N. lovaniensis*, *N. tihangensis*, *N. australiensis*, *N. americana*, *N. byersi* y *N. gruberi* (Lares-Villa y col 1997; Guzmán-Fierro y col., 2008; Lares-Villa y Hernández-Peña (2010). Schuster y cols, (2004) señalan que las amibas del género *Naegleria* son de los protozoarios a los que los humanos están expuestos en el curso de sus vidas a través del contacto directo con el suelo, agua o por quistes transportados por el viento, siendo capaces de inducir una respuesta inmune. El papel que estos anticuerpos pueden desempeñar aún se desconoce, pero se le atribuye que su presencia es la responsable de la baja incidencia de casos fulminantes de MAP. Es importante señalar que en San Ignacio Río Muerto perteneciente al Valle del Yaqui se presentó un caso de MAP en un niño que afortunadamente tuvo un tratamiento adecuado y oportuno contra *N. fowleri* (Vargas-Zepeda y col., 2005).

Al igual que en el caso del Valle del Mayo, la distribución de los datos de las mediciones de anticuerpos IgG séricos contra proteínas de *N. fowleri* de los residentes del Valle del Yaqui, presentaron una distribución no normal, con curtosis y sesgo hacia la derecha, reflejando que la mayoría de los casos presentaron absorbancias bajas, y en algunos casos con absorbancias altas.

### **Comparativo de Reactividades Anti *N. fowleri* de Sueros del Valle de Yaqui y Mayo**

Para el análisis comparativo de las mediciones de la respuesta inmune humoral IgG de los sueros del Valle del Yaqui y Valle del Mayo se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, que emplea la mediana, esto es, debido al comportamiento de los datos obtenidos que no presentaron una distribución normal que justifique la media como medida de tendencia central.

De acuerdo a los resultados de la Prueba U de Mann-Whitney de la distribución de las medianas de los sueros humanos de ambas regiones diluidos 1:100, indicó que existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en las reactividades antígeno-anticuerpo de los sueros humanos del Valle del Mayo y Valle del Yaqui (Figura 11), por tanto se acepta la



**Figura 11.** Comparativo de reactividades contra *N. fowleri* de sueros humanos del Valle de Yaqui y Mayo (1:100).

hipótesis alterna de que existen diferencias en el título de anticuerpos IgG séricos en humanos contra las proteínas de *Naegleria fowleri* entre los dos grupos de estudio.

Es importante destacar que este es el primer estudio realizado en el estado de Sonora que muestra la presencia de anticuerpos contra la AVL patógena; sin embargo el resultado manifiesta una diferencia significativa ( $p=0.002$ ) en los niveles de anticuerpos IgG que fueron superiores para el Valle de Mayo donde actualmente no se han reportado casos de la enfermedad fatal que produce (MAP), quizás este acontecimiento podría ser explicado por la reactividad mayor de los niveles de anticuerpos IgG séricos de esta población.

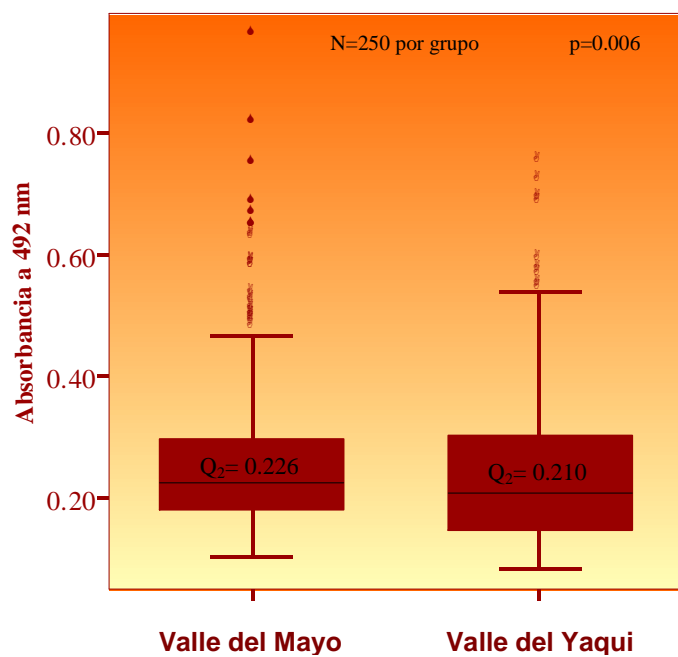
La comparación de los grupos entre sí en los niveles de anticuerpos IgG contra *N. fowleri* de los sueros humanos analizados en una dilución 1:500, mostró también diferencia significativa ( $p=0.006$ ), por tanto de acuerdo al nivel de significancia obtenido, se acepta la hipótesis alterna de que existen diferencias significativas en el título de anticuerpos IgG séricos en humanos diluidos 1:500, contra las proteínas de *Naegleria fowleri* entre los dos grupos de estudio (Figura 12).

La variación en la exposición pudiera reflejar la distribución de antígenos de *Naegleria* en el ambiente o diferencias en los contactos entre los humanos y reservorios de antígeno (Marciano-Cabral, 1988).

Los resultados presentados, quizás puedan explicar la falta de antecedentes de MAP en el Valle del Mayo, porque la población de ésta entidad presenta mayor reconocimiento de anticuerpos IgG que representen protección del individuo hacia la amiba de vida libre, aunque actualmente no se comprueba una correlación de MAP y el título de anticuerpos. El papel que representa la inmunidad humoral contra las infecciones por AVL, aún no se ha establecido de manera completa.

Sin embargo, los eventos exactos asociados con la exposición antigénica o inducción de los anticuerpos en nuestra investigación no pueden ser determinados.

Una de las mayores dificultades para el estudio de las interacciones antígenos-anticuerpos es la gran heterogeneidad de éstos. El advenimiento de los anticuerpos



**Figura 12.** Comparativo de reactividades contra *N. fowleri* de sueros humanos del Valle de Yaqui y Mayo (1:500).

monoclonales homogéneos, facilita los hechos. No obstante, esos resultados sólo son válidos para estudios experimentales, ya que la homogeneidad no es la característica de la población total de anticuerpos séricos de una respuesta inmune, donde la población molecular, de origen policlonal, está formada por anticuerpos de diferente afinidad, que a su vez pueden reconocer diferencias en los epítopes para los cuales se tiene especificidad (Margni, 1996).

### **Inmunoblots de IgG séricos contra proteínas de *Naegleria* y *Acanthamoeba***

Reilly y cols. (1983), señalan que los humanos están expuestos periódicamente al inmunógeno de *Naegleria* en cantidades suficientes para obtener y sostener rápidamente una respuesta inmunológica medible. Además, se ha sugerido que la exposición a cepas no patogénicas de AVL que son antigénicamente relacionadas a cepas patogénicas puede inducir protección contra amibas más virulentas. Tomando como principio lo anterior, y para cumplir los últimos objetivos específicos del trabajo, seleccionamos nueve sueros para identificar la bandas inmunorreactivas de extractos amebianos reconocidas por anticuerpos IgG anti-*N. fowleri* a través de análisis Western Blot. Cuatro sueros del Valle del Yaqui, cuatro sueros del Valle del Mayo y un suero que presentó una reactividad muy baja, fue utilizado como control.

El proceso inició con la preparación de geles de poliacrilamida al 10% para la separación electroforética simultánea de antígenos de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *A. mauritaniensis*. El gel teñido con azul de Coomassie brillante demostró la presencia de varias bandas proteicas de tamaño similar en los distintos extractos antigénicos. Una vez realizada la electrotransferencia al papel de nitrocelulosa, se cortaron los carriles correspondientes a cada extracto de amiba y se procedió a teñirlos utilizando como primer anticuerpo los sueros de los residentes de los Valle del Yaqui y del Mayo a probar, y se utilizó una anti-IgG humana marcada con peroxidasa. La comparación de la separación de las bandas inmunorreactivas se hicieron con un marcador de pesos moleculares. El número de masa molecular se indica a la derecha del carril expresado en

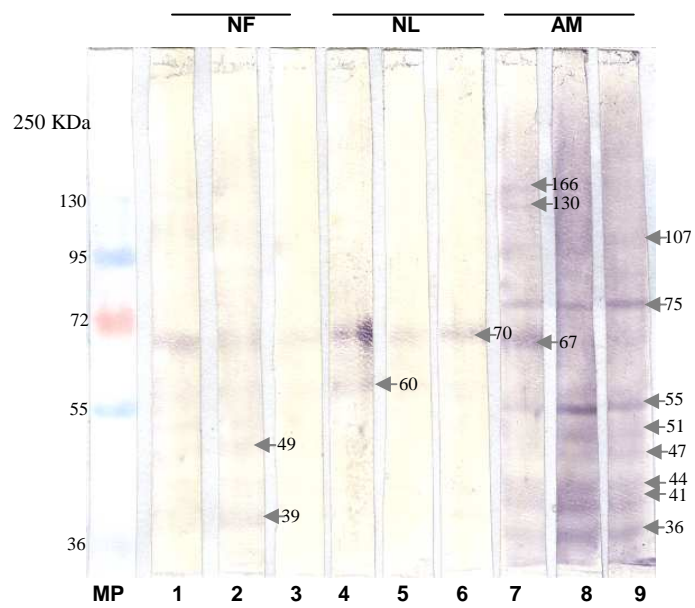
Kilodaltons de los principales componentes, sólo una vez, se señalará la banda inmurreactiva de un mismo tamaño molecular de los distintos extractos para cada figura. La dilución de los sueros a probar fue de 1:50 y la dilución de trabajo para el segundo anticuerpo fue de 1:1000.

En las Figuras 13 y 14 se muestran los inmunoblots de 6 de los 9 sueros utilizados. Los sueros marcados como 1, 2, 3 y 4 pertenecen al área del Yaqui, mientras que los marcados como 5 y 6 pertenecen al área del Mayo. Los resultados de los otros sueros no se muestran por presentar mala resolución de las bandas.

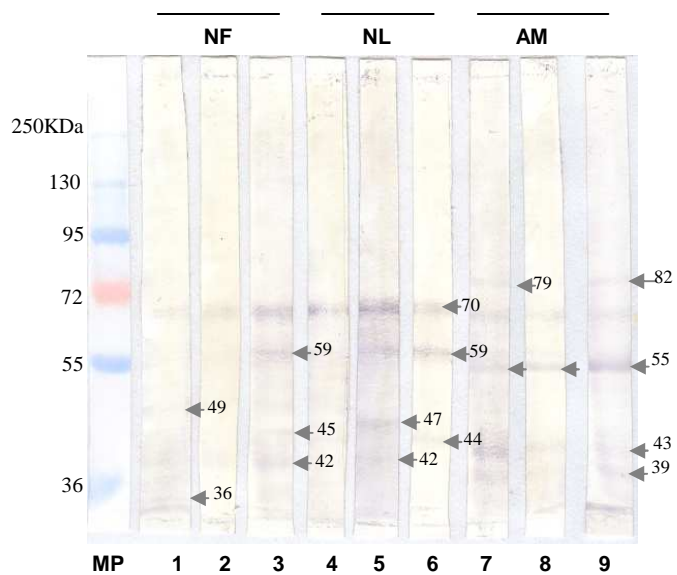
En la Figura 13 aparecen los resultados de los sueros 1, 2 y 3, reaccionando con las diferentes especies. En los carriles 1, 2 y 3 de la Figura 13, se muestran las bandas inmunorreactivas contra *N. fowleri*, mientras que en los carriles 4, 5 y 6, aparecen las bandas contra los antígenos de *N. lovaniensis* y finalmente en los carriles 7, 8 y 9 aparecen las bandas que los sueros 1, 2 y 3 del área del Yaqui, identifican en los extractos antigénicos de *A. mauritaniensis*. En la Figura 14 aparecen los inmunoblots de los sueros 4, 5 y 6, éstos dos últimos del área del Valle del Mayo, y los carriles de las bandas inmunorreactivas para cada especie, siguen el mismo orden que en la Figura 13.

En las Figuras 13 y 14 se pueden observar las bandas inmunorreactivas producidas por los sueros y los extractos de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *A. mauritaniensis*, que nos indica la presencia de un grupo heterogéneo de proteínas que fluctúan entre 37 y 166 KDa de peso molecular. En dichas figuras se señalan aquellas bandas inmunorreactivas que son reconocidas por los anticuerpos IgG en las tres especies y otras bandas proteicas que sólo aparecen para cierta especie o para algún suero. Estos resultados nos permiten deducir que, a diferencia de aquellos resultados donde se usan sueros hiperinmunes de animales dirigidos contra una especie de amiba en particular y donde esperaríamos un patrón regular y repetido de bandas, los sueros humanos presentan reacciones que son el resultado de constantes exposiciones a diferentes antígenos, incluyendo a las diferentes especies de amibas de vida libre que abundan en la naturaleza. En ambas figuras se puede apreciar claramente la existencia de bandas que son comunes entre el género





**Figura 13.** Inmunoblots de proteínas de *N. fowleri*, *N. lovaniensis*, *A. mauritaniensis* y sueros del Valle del Yaqui y Valle del Mayo. Sueros 1, 2 y 3.



**Figura 14.** Inmunoblots de proteínas de *N. fowleri*, *N. lovaniensis*, *A. mauritaniensis* y sueros del Valle del Yaqui y Valle del Mayo. Sueros 4, 5 y 6.

*Naegleria*, como es el caso de las bandas de 42, 59, 60 y 70 KDa. Otras bandas parecen ser exclusivas de *N. fowleri* (36, 39, 45 y 49) y de *N. lovaniensis* (44 y 47), y cuando se comparan con *A. mauritaniensis*, ésta presenta mayor diferencias en número y pesos moleculares de bandas que las de *Naegleria*. Este mayor número de bandas refleja el hecho de que *Acanthamoeba* es considerada como la amiba de vida libre más abundante en la naturaleza (Page, 1988).

En la Tabla I se presentan los resultados de los pesos moleculares de las bandas inmunorreactivas detectadas por especie y para los sueros del 1 al 6. Se observan los pesos moleculares de las bandas inmunorreactivas obtenidas en nuestro estudio, y al comparar nuestros resultados con los trabajos de Shin y col, (2004), que reportaron por lo menos nueve bandas proteicas 97, 81, 66, 53, 40, 39, 28, 25 y 23 KDa en lisados de *N. fowleri*; con el trabajo de Powell y col, (1994), que encontró cuatro bandas entre 32.5 a 106 KDa; y el trabajo realizado en Mexicali, Baja California, México, por Hernández-Martínez y col, (2003), que reportaron un grupo heterogéneo de proteínas de *N. fowleri* con pesos moleculares aproximados de 120, 95, 45, 36, 20, 6.5 KDa, encontramos que algunas de éstas bandas coinciden en algunos estudios, pero otras difieren o no están reportadas.

Se puede decir, que *N. fowleri* posee una gran cantidad de proteínas inmunógenas y que el inmunoblot puede ser utilizado para detectar la seroconversión en individuos infectados con amibas de vida libre patógenas; que no se puede definir con claridad cuál de todas las proteínas identificadas sea la responsable de la virulencia e infectividad de la amiba, pero sigue el interés para poder elaborar pruebas diagnósticas y rápidas (Su-Yeon, y col., 2005). Distintos estudios han enfatizado que varias moléculas antigénicas pudieran ser preparadas para su uso como antígeno especie-específicos, pero la búsqueda por mucho tiempo, de moléculas antigénicas, ha sido sin éxito (Shin y col., 2001).

**Tabla I.** Pesos moleculares de las proteínas de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *A. mauritaniensis* reconocidas por anticuerpos IgG de sueros sonorenses.

Suero anti- <i>N.f.</i>	Origen	Bandas Proteicas PM aproximado (KDa)		
		<i>N. fowleri</i>	<i>N. lovaniensis</i>	<i>A. mauritaniensis</i>
1	V. Yaqui	70, 60	70, 60	166, 130, 75, 67, 55, 44, 41, 36
2	V. Yaqui	70, 60, 49, 39	70	75, 55, 51, 47, 44, 41, 36
3	V. Yaqui	70	70	107, 75, 55, 51, 47, 44, 41, 36
4	V. Yaqui	70, 49, 36	70	70, 67, 55, 43, 39
5	V. Mayo	70	70, 59, 47, 42	67, 55, 43, 39
6	V. Mayo	70, 59, 45, 42	70, 59, 44	82, 67, 55, 43, 39

## CONCLUSIONES

La detección de anticuerpos IgG contra *N. fowleri* en el 99.8% de los sueros de residentes del Valle del Mayo y Valle del Yaqui del Estado de Sonora, y el amplio rango de absorbancias que indicaron las inmunoreactividades que presentaron los sueros hacia los extractos de *N. fowleri* nos permite concluir que la población del sur de Sonora ha recibido cantidades antigénicas específicas por *N. fowleri* o por otros microorganismos que comparten determinantes antigénicas, es decir, no específicos representados por anticuerpos de reacción cruzada, con capacidad de inducir una respuesta inmune contra este organismo. El origen de los anticuerpos IgG se desconoce.

La comparación de la respuesta de anticuerpos IgG anti-*N. fowleri*, medidos por la distribución de las medianas, reveló que el título de anticuerpos fue mayor en los residentes del Mayo, siendo ésta diferencia estadísticamente significativa.

Los sueros del Valle del Yaqui y del Valle del Mayo no manifestaron un reconocimiento total a las mismas proteínas de *Naegleria fowleri* reveladas por Western blot, quedando demostrada la individualidad de la respuesta inmunológica y la variedad de epítopes representados por diferentes amibas de vida libre que pueden ser reconocidos por sueros humanos adultos; sin embargo, una correlación entre el título de anticuerpos y la meningoencefalitis amibiana primaria, aún no se ha podido establecer. En la actualidad, la respuesta del huésped generada ante la infección por *N. fowleri* no ha sido entendida claramente, por ello, el papel protector que los anticuerpos pudieran desempeñar aún es controversial.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ávila, I., Rodríguez, M., Infante, D., Llovera, V., Álvarez, O., Briceño, M. 2006. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”, Maracay, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop.* 58(1): 19-24.
- Beltrán, M., Uyema, N. 1997. Amebas de vida libre en muestras de agua de piscinas del Departamento de Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 14(1): 29-33.
- Bonilla-Lemus, P., Ramírez-Flores, E., Ortiz-Ortega, R., Eslava-Campos, C.A. 2005. Ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. En *Microbiología Ambiental*. INE (Ed.), pp. 67-81. México.
- Cursons, R.T.M., Brown, T.M., Keys, E.A., Moriarty, K.M., Till, D. 1980. Immunity pathogenicity free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun.* 29(2): 401-407.
- Cerva, L. 1989. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol.* 33. 99-103.
- Correa, D., Mandujano, A., Medina, Y. 2000. Manual de técnicas modernas en inmunología. Teoría y Práctica. SSA, INDRE (Ed.), pp. 15-24. México.
- Chappell, C.L., Wright, J.A., Coletta, M., Newsome, A. 2001. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(4): 724-730.
- De Jonckheere, J.F. 2002. A century of research on the amoebaflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica.* 41: 309-342.
- Dubray, B.L., Wilhelm, W.E., Jennings, B.R. 1989. Serology of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* from a hospital survey. *J Protozool.* 34: 322-327.
- Espinoza-Verdugo, A. 2004. Evaluación de la respuesta a la producción de anticuerpos policlonales contra *N. fowleri* por ratones BALB/C. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 21, México.

- Espinoza-Verdugo, A. 2006. Determinación cuantitativa de *Naegleria* spp. Termofílicas en aguas naturales de uso recreativo. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Sonora, México.
- Ferreira-Guerrero, E., Lares-Villa, F., Fernández-Quintanilla, G., Nieburg, P., Ruiz-Matuz, C. 1997. Meningoencefalitis amibiana primaria: dos brotes en Mexicali, Baja California, México. ITSON-DIEP. II (5): 43-52.
- Ferrante, A., Rowan-Kelly, B. 1988. The role of antibody in immunity against experimental naegleria meningoencephalitis ('amoebic meningitis'). Immunol. 64: 241-244.
- Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: Pathogenicity and immunity. Parasite Immunol. 13(1): 31-47.
- Gomez-Infante, E.A., Lares-Villa, F., Ibarra-González, J. 2002. Acciones de vigilancia y control sanitario de *N. fowleri* en Sonora, temporada 2001. ITSON-DIEP. III (11): 35-43.
- Guzmán-Fierro, E., De Jonckheere, J. F., Lares-Villa, F. 2008. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. Rev Mex Biodiv. 79: 1-5.
- Haggerty, R.M., John, D.T. 1978. Innate resistance of mice to experimental infection with *Naegleria fowleri*. Infect Immun. 20(1): 73-77.
- Hernández-Martínez, M.D., Bonilla-Lemus, P., Campos-Rodríguez, R., Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., Ontiveros, D. 2003. Detection of antigenic proteins of *Naegleria fowleri* by seric antibodies of inhabitants of the Mexicali Valley, Mexico. Xth Internacional meeting on the Biology and pathogenicity of free-living amoebae proceedings. ITSON DIEP. 201-207.
- Holguín-Soto, R. 2002. Estandarización del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la identificación de *Naegleria fowleri*. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Sonora, México.
- Huang, Z.H., Ferrante, A., Carter, R.F. 1999. Serum antibodies to *Balamuthia mandrillaris*, a free-living amoeba recently demostred to cause amoebic encephalitis. JID. 179: 1305-1308.

- Huizinga, H.W., McLaughlin, G.L. 1990. Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Appl Environ Microbiol.* 56(7): 2200-2205.
- Kyoung-Ju, S., Kyung-Hui, S., Byoung-Kuk, N., Jong-Hyun, K., Daeho, K., Sun, P., Jhang-Ho, P., Kyung-Il, I., Ho-Joon, S. 2007. Molecular cloning and characterization of a cytosolic heat shock protein 70 from *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res.* 100:1083-1089.
- Lares-Villa, F. 2001. Free-living amoebae infections in Mexico. In *Ixth International meeting on the biology and pathogenicity of free-living amoebae proceedings*. Jonh Libbey Eurotext. pp.13-18. Paris, Francia.
- Lares-Villa, F., Ayala-Montenegro, I.T., Verdugo-Escoboza, E. 2001. Amibas de vida libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. *ITSON DIEP. III* (10): 39-48.
- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J.F., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C., Visvesvara, G.S. 1993. Fives cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali: study of the isolates. *J Clin Microbiol.* 31(3): 685-688.
- Lares-Villa, F., Guerrero-Dumas, A.M., López-Osorio, A. 1997. Estudio protozoológico (subphylum Sarcodina clase Lobosea), en ambientes acuáticos de la Región del Valle del Yaqui, Sonora, México. *ITSON DIEP II* (6): 47-55.
- Lares-Jiménez, L.F.; Lares-Villa, F. 2009. “Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora”. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales.* 5(2): 159-165.
- Lares-Villa, F.; Hernández-Peña, C. 2010. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007–October 2008). *Experimental Parasitology.* 126: 33-36.
- Marciano-Cabral, F., Cline, M.L., Bradley, G. 1987. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J Clin Microbiol.* 25(4): 692-697.
- Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev.* 52(1): 114-133.



- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agent of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16: 273-307.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G.A. 2007. The immune response to *Naegleria fowleri* and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 243-259.
- Margni, R.A. 1996. *Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos*. 5ta.ed. Médica Panamericana (Ed.). pp.152, 809, 907. Argentina, Buenos Aires.
- Myoung-Soo, C., Suk-Yul, J., Sun, P., Kyonmin, H.K., Hyung-Il, K., Seonghyang, S., Hap-Jip, K., Kyung-Il, I., Ho-Joon, S. 2003. Immunological characterizations of a cloned 13.1-kilodalton protein from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 10(5): 954-959.
- Oh, Y.H., Jeong, S.R., Kim, J.H., Song, K.J., Kim, K., Park, S., Sohn, S., Shin, H.J. 2005. Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nfa1 antibody. *Parasite Immunol*. 27: 453-459.
- Oddó, D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Rev Chil Infect*. 23(3): 200-214.
- Page, F.C. 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association (Ed.) Ambleside, Cumbria*. p.122.
- Powell, E.L., Newsome, A.L., Allen, S.D., Knudson, G.B. 1994. Identification of antigens of pathogenic free-living amoebae by protein immunoblotting with rabbit immune and human sera. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1(5): 493-499.
- Reilly, M.F., Marciano-Cabral, F., Bradley, D.W., Bradley, S.G. 1983a. Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. *J Clin Microbiol*. 17 (4): 576-586.
- Reilly, M.F., White, K.L., Bradley, S.G. 1983b. Host resistance of mice to *Naegleria* infections. *Infect Immun*. 42(2): 645-652.

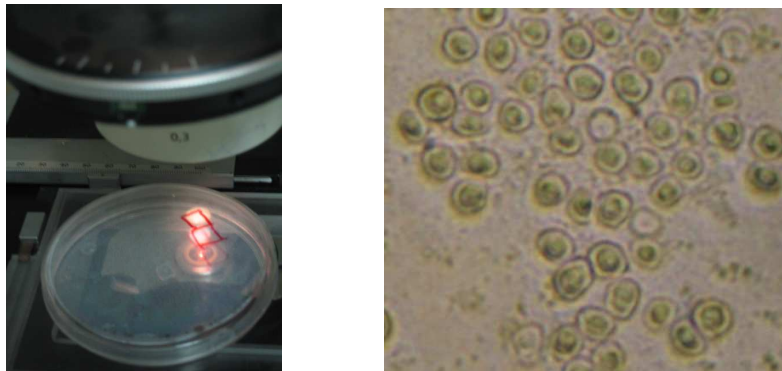
- Réveiller, F.L., Suh, S.J., Sullivan, K., Cabanés, P.A., Marciano-Cabral, F. 2001. Isolation of a unique membrana protein from *Naegleria fowleri*. J Eukaryot Microbiol. 48 (6): 676-682.
- Rivera, V., Hernández, D., Rojas, S., Oliver, G., Serrano, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., Campos, R. 2001. IgA and IgM anti-*Naegleria fowleri* antibodies in human serum and saliva. Can J Microbiol. 47: 464-466. (1)
- Rivera-Aguilar, V., Hernández-Martínez, D., Rojas-Hernández, S., Oliver-Aguillón, G., Tsutsumi, V., Herrera-González, N., Campos-Rodríguez, R. 2000. Immunoblot análisis of IgA antibodies to *Naegleria fowleri* in human and serum. Parasitol Res. 86:775-780. (2).
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A.A., Moreno-Fierros, L. 2004. Intranasal coadministration of the CryIc protoxin with amoebal lisates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. Infect Immun. 72(8): 4368-4375.
- Schuster, F.L. 2002. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. Clin Microbiol Rev. 15(3): 342:354.
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 34: 1001-1027.
- Shenoy, S., Wilson, G., Prashanth, H.V., Vidyalakshmi, K., Dhanashree, B., Bharath, R. 2002. Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: first reported case from Mangalore, south India. J Clin Microbiol. 40(1): 309-310.
- Shin, H.J., Cho, M.S., Jung, S.Y., Kim, H.I., Park, S., Kim, H.J., IM, K.I. 2001. Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 Kda antigenic protein of a *Naegleria fowleri*. J. Eukaryot Microbiol. 48(6): 713-717.
- Shin, H.J., Im, K.I. 2004. Pathogenic free-living amoebae in Korea. Korean J Parasitol 42(3): 93-119.
- Su-Yeon, K., Kyoung-Ju, S., Seok-Ryoul, J., Jong-Hyun, K., Sun, P., Kyongmin, K., Myoung-Hee, K., Ho-Joon, S. 2005. Role of Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. Clin Diagn Lab Immunol 12(7): 873-876.

- Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A.V., Vázquez-Morales, J.A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J.F., Lares-Villa, F. 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. Arch Med Res. 36: 83-86.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinea diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol XX : 1-26.

## ANEXOS

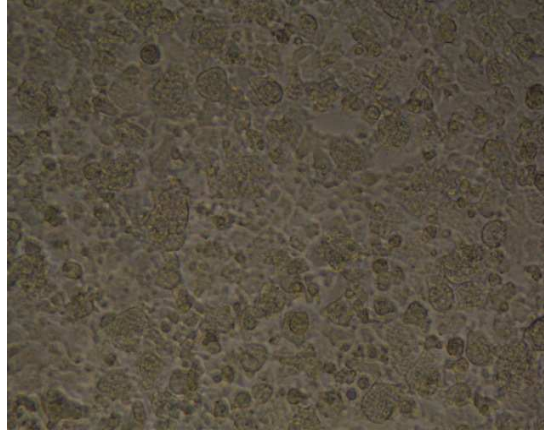
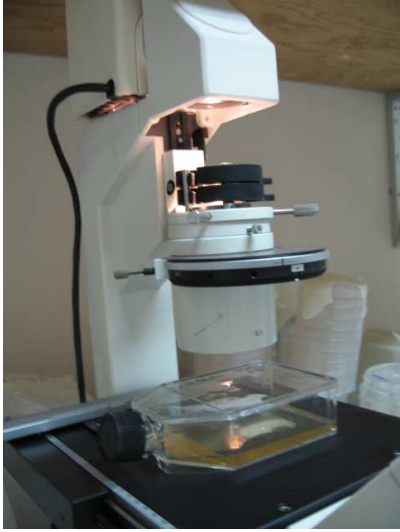
### ANEXO I. Cultivos Axénicos de *N. fowleri*

Quistes de *N. fowleri* de la cepa NF aislados de un caso clínico de MAP y conservados en medio NNE, fueron observados en un microscopio invertido para seleccionar una porción de la población en la placa, y transferirlos a medio nuevo incubándose a 45°C por un período de 24 a 48 horas con el fin de obtener trofozoítos. Una vez en estado trofozoítico fueron utilizados para la obtención de cultivos axénicos del protozooario (Figura 15).



**Figura 15.** Selección de la población masiva de quistes de *N. fowleri*.

La transferencia de los trofozoítos de la placa de NNE a una botella de cultivo celular con medio Cerva (45 mL de bactocasitona al 2% y 5mL de suero bovino fetal al 10% con antibiótico), se realizó para la obtención masiva de los trofozoítos que se utilizarían como antígenos. La temperatura de incubación fue de 37°C, verificando el crecimiento cada 24 horas, para realizar recambios de medio y controlar posibles contaminaciones bacterianas. El crecimiento masivo en condiciones axénicas se obtuvo aproximadamente en 72 horas (Figura 16). La posición de la botella en la incubadora es horizontal.



**Figura 16.** Observación del cultivo axénico de trofozoítos de *N. fowleri*.

## ANEXO II. Obtención del extracto de *N. fowleri*

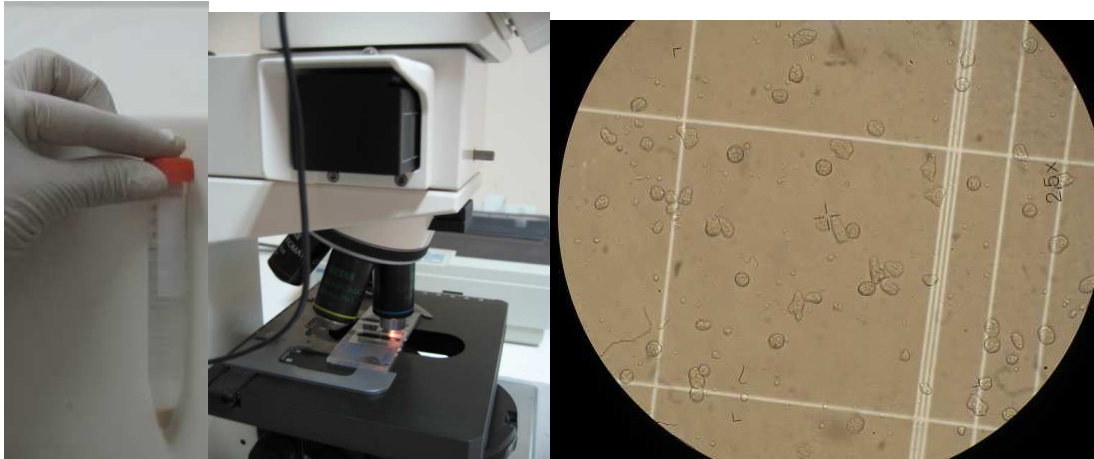
Las botellas de cultivo celular sembradas se colocaron en hielo 5 minutos y se agitaron fuertemente para despegar las amibas que se encontraban adheridas a las paredes y fondo de la botella (Figura 17).



**Figura 17.** Proceso en frío para despegar amibas.

50 mL de cada botella se transfirieron por separado a un tubo cónico con capacidad de 50 mL, posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga HERMLE Z513K. Se eliminó el sobrenadante en un recipiente que contenía cloro para inactivar a las AVL que pudieran ir en él. Mientras tanto, los botones celulares se juntaron en un tubo cónico de 15 mL, se agitaron en un vortex hasta homogenizar el extracto, al cual se le añadió PBS pH 7.4 hasta completar 10 mL. Se realizaron tres lavados bajo las mismas condiciones señaladas. Posteriormente se realizó la cuenta de trofozoítos en una cámara Neubauer Bright Line, utilizando la cuadrícula correspondiente a células leucocitarias (Figura 18). Se volvió a centrifugar y se retiró el sobrenadante. El botón celular se colocó en un tubo eppendorf, al cual se le añadió 1500  $\mu$ L de PHMB como inhibidor de proteasas, se homogenizó la mezcla en un vortex, y al tubo se le aplicó 4 ciclos de congelación ( $-44^{\circ}\text{C}$ ) en el ultracongelador REVCO y descongelación  $45^{\circ}\text{C}$  en la incubadora. El tiempo de duración para cada ciclo fue 10

minutos. Los extractos amebianos se congelaron a  $-44^{\circ}\text{C}$  y se le cuantificó la concentración de proteínas.



**Figura 18.** Cuenta de trofozoítos en una cámara Neubauer Bright Line.

### ANEXO III. Cuantificación de proteínas por Método Bradford

Se basa en la reacción de las proteínas presentes en la muestra, con una solución Azul de Coomassie Brillante G-250.

La técnica inició con la preparación de una curva estándar, partiendo de una solución stock de albúmina de bovino de [1mg/mL] y posteriormente, se determinó la densidad óptica de la reacción del reactivo de Bradford con las proteínas en un espectrofotómetro (Figura 19).

Procedimiento:

1. Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de usarse.
2. Preparación de una curva estándar por duplicado (Tabla II). Utilizar celdas de vidrio.
3. Procesamiento de extracto proteico por duplicado.
4. Reposo durante 5 minutos para desarrollar color y tomar las lecturas de absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.
5. Graficar los resultados obtenidos e interpolar las absorbancia de la muestra a la curva.



**Figura 19.** Equipo GENESYS 20 ThermoSpectronic para lectura de proteínas.



**Tabla II.** Preparación de una curva estándar de albúmina.

Tubo	Albúmina 1mg/mL	Extracto N.f.	H <sub>2</sub> O dest.	Bradford	Lectura a 595 nm
<b>1 B</b>	-----	-----	1000 $\mu$ L	5 mL	
2	10 $\mu$ L	-----	990	"	
3	20	-----	980	"	
4	30	-----	970	"	
5	40	-----	960	"	
6	50	-----	950	"	
7	60	-----	940	"	
8	70	-----	930	"	
9	80	-----	920	"	
10	90	-----	910	"	
11	100	-----	900	"	
12	130	-----	870	"	
<b>13 P</b>	-----	100	900	"	
<b>14 P</b>	-----	100	900	"	
<b>15 P</b>	-----	100	900	"	

## **ANEXO IV. Determinación de Concentración Óptima de Antígeno por Ensayo ELISA**

Para la estandarización del método ELISA se realizaron ensayos con concentraciones distintas de antígeno utilizando como primer anticuerpo suero inmune de conejo anti- *N. fowleri* realizado con la finalidad de medir la reactividad para cada titulación y por ende, establecer la concentración óptima de antígeno para su fijación en la microplaca de poliestireno. Se analizaron distintas concentraciones de antígeno obtenidas a través de diluciones dobles seriadas de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 y 0.78  $\mu\text{g/mL}$  a partir de un extracto de concentración conocida. Las diluciones dobles seriadas del suero de conejo anti-*N. fowleri* (PLC2) fue 1:100 hasta 1:25,600 (Tabla III).

Una vez fijadas las concentraciones mencionadas utilizando 100  $\mu\text{L}$  del extracto antigénico previamente en la placa ELISA, se dejó reposar durante 24 horas a 4°C, que se lavaron 2 veces con 200  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS-Tween 20 al 0.05% (con un reposo con la solución de 5 minutos por cada lavado), se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso sobre una gasa.

Posteriormente fueron bloqueadas con 200  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%-leche al 5% (preparada al momento de su uso) incubándose 1 hora a 37°C. Se le realizaron 2 lavados seguidos a este paso y se les añadió el primer anticuerpo (PLC2) diluidas a través de la dilución doble seriada, iniciando en 1:100 en la columna 1 hasta la columna 9 (1:25,600) como diluyente se utilizó PBS-Tween 20 al 0.05%-leche al 5%. Como control negativo se utilizó suero humano (1:100).

Después de 1 hora en incubación a 37°C, las placas se lavaron tres veces; posteriormente se añadió 100  $\mu\text{L}$ /pozo del segundo anticuerpo anti- IgG de conejo marcado con peroxidasa producido en cabra (Sigma 057k4802), preparado a una dilución 1: 2,000. Nuevamente se incubaron las placas 1 hora a 37°C y se realizaron 5 lavados al término del tiempo. El control de suero humano se hizo reaccionar con 100  $\mu\text{L}$ /pozo del segundo anticuerpo anti- IgG de conejo (1:2,000), debido a que no hay controles negativos disponibles.

**Tabla III.** Esquema de trabajo para la obtención de la concentración óptima de antígeno.

Concentración de Ag µg/mL													
100													
50													
25													
12.5													
6.25													
3.125													
1.5625													
0.78													
Dilución doble seriada del suero de conejo inmune	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	Sin Ac	Suero humano CONTROL NEG	Sin Ag	

Las placas de poliestireno fueron reveladas en una mezcla de 4 mg de ortofenilendiamina en 10 mL de buffer de citratos pH=5.6, mismas que se le adicionó 6 µL de peróxido de hidrógeno por cada pozo (preparado al momento de su uso y almacenado en un recipiente ambar). Se adicionó de manera inmediata, 100 µL/pozo de esta solución sustrato-cromogénica. Se mantuvo en reposo y obscuridad durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 100 µL de ácido sulfúrico 2N y las lecturas de las placas de ELISA (Multiskan Ascent de Labsystem) a una longitud de onda de 492 nm.

**ANEXO V. Determinación de Anticuerpos IgG humana contra *N. fowleri* por  
Técnica ELISA**

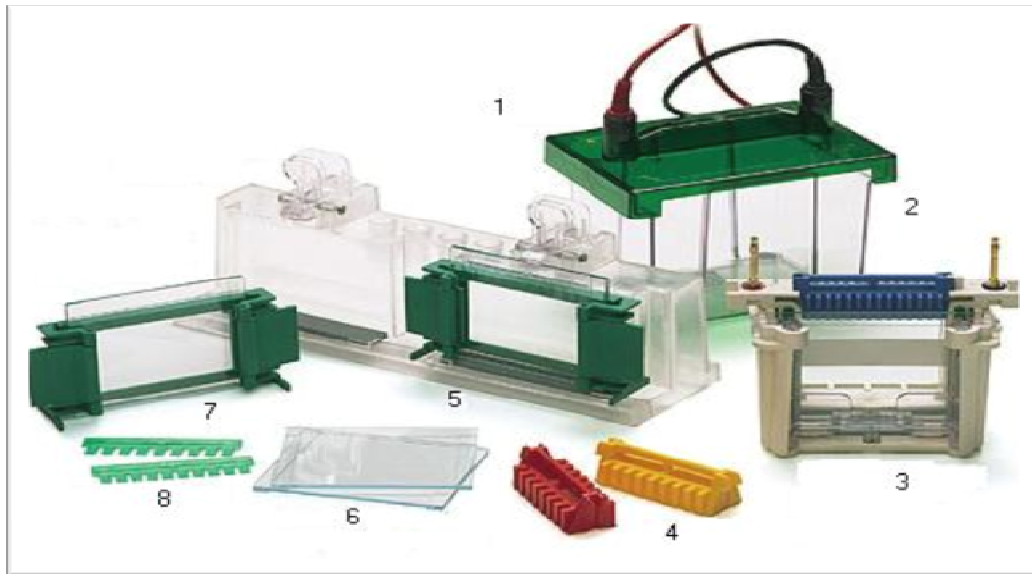
1. El antígeno se diluye en una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 para tener una concentración de 2 µg/mL (obtenido de acuerdo a los resultados previos). Se sensibiliza los pozos de poliestireno con un volumen de 100 µL de la solución de antígeno.
2. Se incuba la placa ELISA a 4°C durante 24 horas.
3. Se elimina la solución vertiendo el contenido de los pozos y se seca el exceso sobre una gasa.
4. La placa se lava tres veces con 200 µL/pozo con PBS-Tween 20 al 0.05%, durante cinco minutos cada lavado, entre cada uno se sigue el paso 3.
5. Agregar a la placa 200 µL/pozo la solución de bloqueo PBS-Tween 20 al 0.05%-leche descremada al 5% e incubar durante una hora a 37°C.
6. Se repiten los pasos 3 y 4.
7. Hacer una dilución adecuada del suero 1:100 y 1:500 (probada previamente) en PBS-Tween 20.
8. Cada suero diluido es agregado en un volumen de 100 µL/pozo y se incuba una hora a 37°C. El control negativo de suero humano 1:100 fue adicionado en la última columna.
9. Se repiten los pasos 3 y 4.
10. En cada pozo se colocan 100 µL del conjugado anti-Ig G humana marcado con peroxidasa (Sigma 087k4768) a una dilución previamente titulada (1:20,000). Para el control negativo se hizo reaccionar con un segundo anticuerpo anti- IgG de conejo marcado con peroxidasa (1:20,000) debido a que no hay controles negativos anti-*N. fowleri* disponibles de sueros humanos siendo utilizado como Blanco control.
11. Se incuba a 37°C durante una hora y se procede a los pasos 3 y 4.

12. En cada pozo se colocan 100  $\mu\text{L}$  de la solución de cromógeno/sustrato (para conjugados de peroxidasa).
13. Dejar incubar en la oscuridad durante 30 minutos.
14. Detener reacción enzimática añadiendo 100  $\mu\text{L}$ /pozo de ácido sulfúrico 2N.
15. Leer la absorbancia inmediatamente en un lector de ELISA (Figura 20) a 492 nm.



**Figura 20.** Lector ELISA (Multiskan Ascent de Labsystem).

## ANEXO VI. Electroforesis de Proteínas SDS-PAGE



**Figura 21.** Componentes del equipo para electroforesis SDS-PAGE.

- 1.- Tapa.
- 2.- Cámara de electroforesis.
- 3.- Electrodo. Consta de: ánodo de color rojo y cátodo de color negro), empaque en forma de U, electrodo de montaje, cassette de gel para sandwich, plato de presión y marco de contención, pestañas de presión.
- 4.-Guías de carga.
- 5.-Soporte para preparar geles.
- 6.-Vidrios de electroforesis con separadores.
- 7.-Marco con el sandwich de gel.
- 8.-Peines.

## Procedimiento

1. Lavar las placas de vidrio con abundante agua y alcohol al 70%.
2. Para la preparación del gel separador y concentrador de acrilamida al 10% (Tabla IV y V), se colocó el juego de placas de vidrio y separadores en el soporte para las placas, con las gomas inferiores para evitar derrames de las soluciones.

**Tabla IV.** Mezcla de soluciones para preparar el gel separador al 10%

	Gel separador	10%
1	Acrilamida-Bis 30%-0.8%	3.33 mL
2	Amortiguador del gel separador pH 8.8	2.5 mL
3	SDS al 10%	100 $\mu$ L
4	Agua bidestilada	4 mL
5	*TEMED	6.5 $\mu$ L
6	*Persulfato de amonio (APS) AL 10%	100 $\mu$ L
*	Estos reactivos se agregan al final	

3. Una vez preparada la mezcla para el gel separador (Tabla IV), se adicionó la mezcla entre dos placas de vidrio dejando un borde de 3 cm del borde superior y se deja polimerizar (20 minutos aproximadamente). Añadir 100  $\mu$ L de propanol.
4. Realizar 10 lavados con agua destilada y con ayuda de papel filtro se eliminó el excedente.
5. Preparar la mezcla de soluciones para el gel concentrador (preparado al momento de su uso, Tabla V), agregándose sobre el gel separador hasta llenar totalmente el espacio entre los dos cristales. Rápidamente se incluye el peine con cuidado de que no se formen burbujas. Se polimeriza en unos 10 minutos aproximadamente.

**Tabla V.** Mezcla de soluciones para preparar el gel concentrador al 10%

	<b>Gel concentrador</b>	<b>10%</b>
1	Acrilamida-Bis 30%-0.8%	0.67 mL
2	Amortiguador del gel concentrador pH 6.8	1.25 mL
3	SDS al 10%	100 $\mu$ L
4	Agua bidestilada	3 mL
5	*TEMED	5 $\mu$ L
6	*Persulfato de amonio (APS) AL 10%	80 $\mu$ L
*	Estos reactivos se agregan al final	

6. Cuando la polimerización del gel concentrador haya terminado, se retiró el peine con cuidado de no romper el gel y fueron lavados los carriles con agua destilada.
7. Se ponen las placas en el electrodo y se colocó dentro de la cámara de electroforesis, llenando la cámara inferior con amortiguador de electroforesis en los carriles del gel concentrador. Se verificó la ausencia de burbujas en el espacio que se genera entre los vidrios en la parte inferior, entre el gel y la solución de electroforesis.
8. Posterior a la preparación de los geles las muestras a analizar se trataron con una misma proporción con el buffer 2X y se homogenizó muy bien la mezcla. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos en baño María. Se colocaron 10  $\mu$ g de antígeno amebiano en su carril correspondiente, incluyendo en cada gel un carril estándar de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder).
9. Llenar la cámara superior con amortiguador de electroforesis.
10. Conectar los electrodos rojo y negro con su propio color a la fuente de alimentación y ajustar la corriente a 80 volts constantes en un tiempo aproximado 3 horas (Figura 22). Mantener la electroforesis hasta que la línea azul de bromofenol 2X llegue al final del gel.
11. Al terminar la electroforesis sacar el gel.





**Figura 22.** Electroforesis de antígenos proteicos de *N. fowleri*.

## **ANEXO VII. Electrotransferencia**

1. Colocar las fibras scotch y papel Whatman (grosor 0.16 mm) en un recipiente con suficiente amortiguador de transferencia 30 minutos antes de transferir.
2. Cortar la membrana de nitrocelulosa (NC) de acuerdo al tamaño del gel (utilizando guantes) y colocarla en otro recipiente que contenga amortiguador de transferencia. Colocar dos fibras Scotch en un “cassette” para transferencia, sobre las cuales se colocan dos porciones de papel filtro teniendo cuidado de que no queden burbujas atrapadas entre los papeles; colocar el gel y sobre éste la membrana de NC; eliminar burbujas.
3. Con un lápiz marcar el frente de electroforesis del gel, sobre el papel de NC y señalar el carril número uno de acuerdo a la colocación de las muestras, colocar otros dos papeles filtros sobre la NC y otras dos fibras. Cerrar el cassette e insertarlo en el contenedor.
4. Colocar el contenedor en la cámara y llenarla de amortiguador de transferencia hasta el límite superior, agregar un magneto y recipiente con hielo que se debe cambiar en los primeros 20 minutos transcurridos. Mantenerse en agitación.
5. Tapar y conectar los electrodos de tal manera que el ánodo quede del lado del gel y el cátodo del lado NC; conectar a la fuente poder y transferir durante una hora a 0.40 A (Figura 23).
6. Al terminar la transferencia tomar la membrana de NC con guantes y colocarla en un recipiente con Rojo de Ponceau (10 minutos) para verificar que las proteínas fueron transferidas a la NC; esto se observa con la aparición de bandas de color rojo, momento en el cual debe quitarse el exceso de colorante y lavar con PBS-Tween 20 al 0.05%, aproximadamente de 4 a 5 veces. Este procedimiento se debe hacer en agitación vertical de 80 rpm.



**Figura 23.** Electrotransferencia de extractos amibianos a membrana de NC.

7. Dejarla secar y colocarlo en la superficie para corte de la membrana NC.



8. Realizar los cortes de los carriles con extremo cuidado y colocarlo en una base para carriles (Figura 24).



**Figura 24.** Cortes de las membranas NC teñidas con Rojo de Ponceau.

### **Reacción Inmunoenzimática.**

1. Las tiras de NC son bloqueadas con 1 mL de PBS-Tween 20 al 0.05%-leche svelty descremada al 6% por cada carril, mismas que son incubadas durante 24 horas a 4°C cubiertas con aluminio, ó a 2 horas a temperatura ambiente en agitación continua.
2. Se elimina el exceso de solución de bloqueo por decantación y hacer 3 lavados con PBS-Tween de 5 minutos cada uno en agitación continua.
3. Agregar 1 mL de suero humano reactivo a *N. fowleri* en una dilución 1:50, incubar la membrana a 4°C durante 12 horas. Agitarlo 1 hora antes de conservarlo en refrigeración.
4. Eliminar el exceso y lavar como en el paso 2.
5. Posteriormente se agrega el conjugado correspondiente (anti-IgG humana marcado con peroxidasa en la dilución apropiada con PBS-Tween. Se incuba 3 horas a temperatura ambiente con agitación continua (Figura 25).
6. Se procede como en el paso 4.



**Figura 25.** Incubación de las tiras de NC con IgG anti-humana.

7. Por último se agrega 1 mL de solución cromógeno/sustrato con 4-cloronaftol (preparada al momento de su uso) y se espera que aparezcan las bandas, después se enjuaga con PBS-Tween 20 y se deja secar (Figura 26).



**Figura 26.** Revelado de bandas proteicas de *N. fowleri*.

8. Se determina el PM aproximado del antígeno utilizado por comparación con el marcador de PM.

## **ANEXO VIII. Preparación de reactivos y soluciones**

### **OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE *N. fowleri***

#### **Suero bovino fetal al 10%**

50 mL de suero bovino fetal filtrado

500µL Estreptomicina-Pen Gsod de concentración 1'000,000 U

Preparar por separado cada antibiótico diluyendo con 2 mL de agua inyectable estéril cada uno. Tomar el contenido del antibiótico de Estreptomicina y agregarlo a la botella que contiene Pen Gsod, mezclarlos y agregar 1 mL de agua estéril.

#### **Bactocasitona al 2%**

2 g Bacto Casitone Peptone Pancreat Digest of Casein

100 mL H<sub>2</sub>O destilada

Esterilizar a 121°C, 115 Lb de presión durante 15 minutos en autoclave.

Conservar en refrigeración.

#### **Medio Cerva**

45 mL Bactocasitona al 2%

5 mL Suero bovino fetal al 10%

#### **Inhibidor de Proteasas:**

##### **Preparación de TRIS BASE**

1.81 g TRIS BASE (150 mM PM= 121.1 g) aforar a 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada

##### **Preparación de PHMB (p-hidroximercurobenzoico) 10mM PM=360.7 g (Sigma)**

0.07 g PHMB

20 mL TRIS BASE

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS BRADFORD

### **Albúmina [ 1mg/mL]**

10 mg Albúmina bovina

10 mL H<sub>2</sub>O destilada

### **Reactivo Bradford 5X**

100 mg Azul de Coomassie Brillante G250

50 mL Etanol al 95%

100 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

-----  
Aforar a 200 mL con H<sub>2</sub>O destilada

Dejar en reposo en un recipiente oscuro durante 24 horas. Para su utilización se requiere hacer una dilución 1:5 con H<sub>2</sub>O destilada.

## REACTIVOS PARA ENSAYOS ELISA

### **Buffer de Carbonatos 0.15 M pH 9.6**

Pesar 3.18 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> más 5.86 g de NaHCO<sub>3</sub>. Disolver los carbonatos en 800 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1000 mL. Mantener a 4°C.

### **PBS (Solución salina de fosfatos) 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.2**

Medir 800 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Agregar 100 mL de \*PB 10X y 8.75 g de NaCl. Disolver las sales, ajustando el pH a 7.2 y aforar a 1000 mL con H<sub>2</sub>O destilada. Guardar a 4°C.

**\*PB 10X.** 2.62 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  más 11.5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Disolver en 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

**Solución de Lavado. PBS-Tween 20, 0.05%**

A un litro de PBS pH 7.2 añadir 500  $\mu\text{L}$  de Tween 20. Guardar a 4°C.

**Solución de Bloqueo.**

Pesar 5 g de leche svelty descremada y aforarlo a 100 mL con PBS-Tween 20 al 0.05%. Prepararse antes de utilizarse.

**Solución de Cromógeno/sustrato para Peroxidasa**

\*Buffer de citratos pH 5.6

29 g de citrato de sodio más 4.1 g de ácido cítrico. Disolver en 900 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Ajustar el pH a 5.6 y aforar a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Almacenar a 4°C.

A 10 mL del buffer de citratos agregar 4 mg de OPD (orto-fenilendiamina) y 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta solución se prepara inmediatamente antes de usarla y mantener en la oscuridad antes y durante su uso. Verificar las condiciones de almacenamiento de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Solución de Ácido Sulfúrico 2N**

Tomar 98 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Añadir cuidadosamente a 850 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y aforar a 1000 mL.

## REACTIVOS PARA WESTERN BLOT

**Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%**

Pesar 30 g de acrilamida (99.9% pureza) más 0.8 g de bis-acrilamida.

Disolver en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada y aforar a 100 mL. Filtrar con papel Whatman. Guardar en un frasco color ambar a 4°C.

Nota: manejar con cuidado este reactivo porque es neurotóxico.

**Buffer del Gel separador: Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8**

Disolver 18.15 g de Tris-base (Hidroximetil aminometano o Trizma-base) en 85 mL de



H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar el pH poco a poco con HCl 4N hasta que se alcance un pH de 8.8 y aforar a 100 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada. Guardar a 4°C.

**Buffer del Gel concentrador: Tris-HCl 0.5M, pH 6.8**

Pesar 3 g Tris-base (PM=121.1 g) en 40 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada. Ajustar el pH con HCl 4N hasta que el pH sea de 6.8 y aforar a 50 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada. Guardar a 4°C.

**Solución SDS al 10% (Lauril Sulfato de Sodio)**

Pesar 1 g de SDS y aforarlo a 10 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada. Mantenerlos a 4°C hasta su uso.

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

Pesar 0.1 g de Persulfato de amonio y disolver en 1 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada contenida en un tubo eppendorf.

NOTA: Se prepara al momento de usarse.

**TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina):** listo para usarse.

**Buffer 2X utilizado para el tratamiento de la muestra.**

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	2.5 mL
SDS al 10%	4 mL
Glicerol	2 mL
2-mercaptoetanol al 2%	0.2 mL
(ó Ditiotretiol DTT)	
Azul de Bromofenol	0.2 mg

---

Aforar a 10 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada

Dividir en alícuotas de 1 mL. Almacenar entre -40 a -80°C.

### **Amortiguador Tris-glicina para Electroforesis, pH 8.3**

Tris- base 0.025 M	3.025 g
Glicina 0.192 M	14.4 g
SDS	1 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	1 Lt aforar

Nota: este amortiguador se puede usar hasta 3 veces en la cámara inferior. Después de cada uso se filtra con papel Whatman 1. No ajustar pH.

### **Buffer de transferencia de proteínas (Tris-base 0.025 M, Glicina 0.192 M, metanol)**

Tris- base 0.025 M	3.03 g
Glicina 0.192 M	14.4 g
Metanol	200 mL
H <sub>2</sub> O bidestilada	1000 mL aforar

Nota: No ajustar el PH. El amortiguador oscila entre 8.1 y 8.4, dependiendo de la calidad del Tris, glicina y el metanol. El metanol debe ser de grado analítico, de lo contrario contiene contaminantes metálicos que interfieren con las láminas de los electrodos. Este amortiguador se puede usar hasta 3 veces, después de cada uso se filtra con papel Whatman. Guardar a 4°C.

### **Solución de Bloqueo: PBS-Tween 20 al 0.05%-leche svelty al 6% pH 7.2**

Agregar 6 g de leche svelty descremada a 100 mL de PBS-Tween 20 al 0.05%. Homogenizar. Prepararse al momento de uso. No almacenarse.

### **Rojo de Ponceau**

Ácido acético 5.7 mL

Rojo de Ponceau 0.1 g

Mezclar la solución y disolverlas en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mantener a 4°C en frasco color ambar.

### **Solución de tinción Coomassie**

Azul de Coomassie R-250 0.25 g

Metanol 400 mL

Ácido acético (99%) 70 mL

H<sub>2</sub>O destilada 1000 mL aforar

Guardar en frasco color ámbar. Mantener a temperatura ambiente.

Nota: Esta solución debe dejarse madurar una semana y filtrarse a través de papel Whatman 1 antes de usarse.

### **Solución Decolorante para Geles de Poliacrilamida**

450 mL de Metanol absoluto

450 mL de H<sub>2</sub>O destilada

100 mL de Ácido acético glacial

Mantener en frasco color ámbar a temperatura ambiente.

### **Solución de revelado sustrato-cromogénico.**

En un vaso de precipitado sostenido en una parrilla eléctrica adicionar 3.5 mL de metanol más 10 mg de 4-cloronaftol y 16.5 mL de PBS 1X, también agregar un magneto para mantener una agitación constante y homogenizar la solución. Por último adicionar 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El volumen total es 20 mL. Por cada carril se adiciona 1 mL en agitación hasta la aparición de bandas proteicas.

**ANEXO IX.** Carta de consentimiento bajo información de procesamiento de muestras de donadores del Banco de sangre para búsqueda de anticuerpos anti-*Naegleria fowleri*.



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

HOSPITAL GENERAL DE ZONA No. 3

Pesqueira Prolongación Sur Col Juárez

01 642 42 2 07 04 Ext. 119

**Navojoa, Sonora a** \_\_\_\_\_

**Donador:** \_\_\_\_\_ **Identificado con:** \_\_\_\_\_

**No. Bolsa:** \_\_\_\_\_ **Grupo Rh:** \_\_\_\_\_

**Domicilio:** \_\_\_\_\_

**Teléfono:** \_\_\_\_\_ **Ciudad:** \_\_\_\_\_

**Por medio de la presente manifiesto haber sido informado sobre el tipo de procedimientos que se realizarán en mi persona, de sus beneficios, riesgos y complicaciones, y autorizo al personal de salud de este hospital para efectuar a partir de mi suero, el proyecto de investigación titulado:**

**“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*Naegleria fowleri* EN RESIDENTES DEL SUR DE SONORA”**

Fundamentados en los Aspectos éticos de la investigación en seres humanos en Capítulo I del Artículo 14 fracción V de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud.

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del donador**

\_\_\_\_\_  
**Q. Alejandra Retana Cruz (Tesisista)**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Fernando Lares Villa**  
Asesor de Tesis, ITSON

\_\_\_\_\_  
**Dr. Carlos Mendiola Yañez**  
Comité local de investigación en Salud

\_\_\_\_\_  
Testigo

Nota: La presente Carta será modificada de acuerdo a las Reformas de la Ley Correspondiente.