

302827 6
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNAM

**PRUEBAS CITOQUIMICAS EN
TROFOZOITOS DE *Acanthamoeba
culbertsoni* PROCEDENTES DE CULTIVO
AXENICO.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

MARIA DEL SOCORRO ESTRADA SILVA

México, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Al Dr. Benjamin Noguera T.
por el apoyo y oportunidad
brindados
en la realización de la tesis.**

**Con gratitud al
M.en C. Fernando de la Jara y
QBP Lourdes Calvo
por su apoyo y conocimientos
brindados.**

El trabajo se realizó en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, en el departamento de Parasitología, bajo la dirección de: M.enC. Fernando de la Jara Alcocer y QBP Ma. Lourdes Calvo Méndez

La tesis está incluida en el proyecto: *"Estudio sobre biología de amibas de vida libre patógenas para el hombre"*. Clave D.E.P.I. No. 952061

Cada problema es una nueva oportunidad para hacer trabajar mas nuestra inteligencia para solucionarlo.

Cada dificultad es una buena ocasion para robustecer nuestra voluntad y tratar de salir adelante victoriosos.

Seneca

**DEDICO ESTA TESIS A MIS PADRES ADULFO Y SOCORRO POR EL APOYO
Y AMOR QUE ME BRINDARON, POR SU EJEMPLO DE SUPERACIÓN
CONTÍNUA.**

**AGRADEZCO TAMBIÉN A MIS HERMANOS ADULFO, LETY, EDITH, YULI Y
VERO POR SU COMPRENSIÓN, AYUDA Y BUEN HUMOR.**

**CON CARÍÑO A MIS ABUELITOS MANUEL Y ESPERANZA, EUTIMIO
(Q.P.D.) Y JULIA, POR SU CONFIANZA Y SABIDURÍA BRINDADOS.**

**A MIS TÍOS LUCY Y OCTAVIO, LIDIA Y MARY, ESTEHEL Y SOCORRO,
POMPEYA POR SU APOYO Y CARÍÑO.**

A MIS PRIMOS.

Y

POR SU GRAN AMISTAD A MIS AMIGOS.

**Mi agradecimiento a la
QFB Graciela Sosa,
M.en C. Ricardo Alejandro A.,
QBP Luis Isita Tomell
por su apoyo.**

**Con mucho cariño y en memoria
a los Profesores
Morales y Tortolero**

INDICE

CAPITULO I

Página

1.0 INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Objetivos	3
1.3 Hipótesis	3

CAPITULO II

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Características morfológicas de <i>Acanthamoeba</i> spp., <i>A. castellanii</i> en particular.....	5
2.2 Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	9
2.3 Composición química.....	11
2.4 Epidemiología, ecología y factores ambientales.....	12
2.5 Formas de infección y tratamiento	13
2.6 Clasificación taxonómica de <i>Acanthamoeba</i>	14

2.7 FUNDAMENTOS QUIMICOS DE LOS METODOS

2.7.1 Método del ácido peryódico de Schiff para carbohidratos (PAS).....	15
2.7.2 Método del Carmin de Best para glucógeno	16
2.7.3 Método de Bauer-Feulgen (polisacáridos)	16
2.7.4 Método de la acetilación de Lillie (prueba testigo para carbohidratos).....	17
2.7.5 Método de digestión con diastasa y amilasa de Lillie (prueba testigo para carbohidratos)	17
2.7.6 Método de McManus-Mowery y método de Spicer para mucopolisacáridos (proteín-polisacáridos).....	17
2.7.7 Método de Einarson de la galocianina-alumbre de cromo para ácidos nucleicos	18
2.7.8 Método del Azur II (azur tipo B) para ácidos nucleicos	19
2.7.9 Método de Feulgen para ácidos nucleicos (DNA)	19

2.7.10 Método de Lillie-Burtner para lípidos neutros	20
2.7.11 Método de Fradsen para extracción de lípidos.....	20
2.7.12 Método de Lillie del sulfato de azul de Nilo para ácidos grasos	20
2.7.13 Método de Holzinger para ácidos grasos	20
2.7.14 Método de Chapman del azul de bromofenol-mercurio para proteínas	21
2.7.15 Método de Alfert y Geschwind del verde rápido para proteínas básicas	21

CAPITULO III

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo.....	23
----------------------------	----

3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material biológico.....	24
3.2.2 Material de laboratorio	24
3.2.3 Reactivos	24
3.2.4 Equipos	25

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Método para la fijación de las amibas	26
---	----

3.3.2 METODOS PARA LA DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS Y TESTIGOS

3.3.2.1 Método del ácido peryódico de Schiff para carbohidratos (PAS)	26
3.3.2.2 Método de Carmín de Best para glucógeno.....	27
3.3.2.3 Método de Bauer-Feulgen para glucógeno.....	27
3.3.2.4 Método de la acetilación de Lillie para comprobar la presencia de glucógeno. Testigo.....	28
3.3.2.5 Método de digestión con diastasa para comprobar la presencia de glucógeno. Testigo	28
3.3.2.6 Método de McManus-Mowery para mucopolisacáridos	28
3.3.2.7 Método de digestión con β amilasa de Lillie para comprobar la presencia de mucopolisacáridos. Testigo	29
3.3.2.8 Método de Spicer para mucopolisacáridos	29

3.3.3 METODOS PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS

3.3.3.1 Método de galocianina-alumbre de cromo de Einarson	30
3.3.3.2 Método del Azur II	30
3.3.3.3 Método de Feulgen para ácidos nucleicos.....	30

3.3.4 METODOS PARA LA DETERMINACION DE LIPIDOS Y TESTIGOS

3.3.4.1 Método de Lillie-Burner para lípidos neutros	31
3.3.4.2 Método de Fradsen para la extracción de lípidos neutros con metanol-cloroformo. Testigo	31
3.3.4.3 Método del sulfato de azul de Nilo de Lillie para ácidos grasos	32
3.3.4.4 Método de la acetona para comprobar la existencia de ácidos grasos (Método sulfato azul Nilo). Testigo	32
3.3.4.5 Método de Holzinger para ácidos grasos.....	32
3.3.4.6 Método de la acetona para comprobar la presencia de ácidos grasos (Método Holzinger). Testigo.....	33

3.3.5 METODOS PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS Y TESTIGOS

3.3.5.1 Método de Chapman del azul de bromofenol-mercurio para proteínas	33
3.3.5.2 Método de Alfert y Geschwind del verde rápido para proteínas básicas	34

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados	36
4.2 Discusión	44

CAPITULO V

5.1	Conclusiones	47
	Bibliografía	48

APENDICES

I	"FOTOGRAFÍAS"	57
---	---------------------	----

II "SOLUCIONES"

COLORANTES

Azul alciano 8GX para el método de azul alciano-Schiff (PAS)	57
Azul alciano 8GX para el método de Spicer.....	57
Azul de bromofenol	57
Azur II (Azur tipo B)	57
Carmin de Best	57
Galocianina	58
Rojo oleoso	58
Sulfato azul de Nilo	58
Verde rápido	58

FIJADORAS

Alcohol-ácido (AA)	58
Carnoy-Jones (CJ)	58
Formol 10% (F10)	59
Formol-alcohol (FA)	59
Formol calcio (FCa).....	59
Formol neutro o amortiguado (FN)	59
Zenker	59

REGULADORAS

Solución reguladora de citrato-de fosfato pH 8-8.1 para preparar colorante verde rápido (proteínas)	60
Solución reguladora de fosfatos 0.02 M, pH 6, para preparar sol. amilasa-fosfato de sodio salino	60
Solución reguladora de fosfatos 0.02 M, pH 6.4, para el Método Chapman	60

Solución reguladora de Mc Ilvaine para preparar colorante Azur II 60

OTRAS SOLUCIONES

Diferenciador para el método de Carmin de Best	61
Reactivo de Schiff (de De Tomasi)	61
Solución acetato de cobre para el método de Holzinger	61
Solución ácido rubetánico-alcohol absoluto para el método Holzinger.....	61
Solución colorante de Carmin de Best.....	61
Solución de anhídrido acético-piridina para el método de acetilación.....	61
Solución de β amilasa fosfato de sodio salino para digestión	62
Solución E.D.T.A. disódico para el método de Holzinger	62
Solución de metabisulfito de potasio o sodio.....	62
Verde rápido para proteínas	62

III "LAVADO DE MATERIAL DE VIDRIO PARA EL MANEJO DE *Acanthamoeba*"

Método para lavar portaobjetos y cubreobjetos	62
Método para lavar tubos	63

IV "CULTIVO DE *Acanthamoeba*"

Medio de cultivo Bactocasitone Difco	63
Medio de cultivo NNE	63
Método de cultivo de amibas	63

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema

Se ha observado que las amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* causan amibiasis del sistema nervioso central (encefalitis amibiana granulomatosa) la cual suele ser mortal, también puede causar ulceraciones en piel y ojos en humanos y otros mamíferos. La infección se instala en sujetos inmunosuprimidos o inmunológicamente deficientes (16,17).

A nivel mundial se ha presentado una variedad de casos cuyos agentes etiológicos son varias especies de éste género de amibas. En México la literatura médica ha reportado casos de encefalitis granulomatosa por *Acanthamoeba* spp., aunque más tarde se ha comprobado que el agente etiológico era otra especie (*Balamuthia mandrillaris*); sin embargo, se conocen casos específicos de queratitis por *Acanthamoeba* spp. en nuestro país. La mayoría de los enfermos con encefalitis por estas amibas han muerto, ya que la posibilidad de sobrevivencia depende del pronto tratamiento que se aplique, para lo cual se necesita una rápida identificación de la amiba (17).

Los procedimientos actuales para la diferenciación e identificación de las amibas de vida libre de importancia médica que incluyen a *Naegleria fowleri*, varias especies de *Acanthamoeba* y a *Balamuthia mandrillaris*, se basan en su morfología, formas de las divisiones nucleares, tolerancia a la temperatura, análisis isoenzimático, serología y patogenicidad. También se usan anticuerpos monoclonales específicos, así como la obtención de patrones de restricción del DNA celular y mitocondrial (17).

Aunque la identificación y clasificación depende de las pruebas antes mencionadas, y debido a la gran cantidad de factores que influyen para un adecuado diagnóstico, sumado a la escasa información que existe en cuanto a diversas características biológicas específicas para cada género y especie de amibas de vida libre, se hace necesario investigar más sobre ellas, en especial las patógenas. En este estudio se efectuaron algunas pruebas citoquímicas de componentes celulares básicos haciendo uso de la microscopía óptica, pretendiendo aportar información sobre el particular, toda vez que se ha encontrado muy poca información en la literatura que se refiera a estudios citoquímicos *in situ* en este género de amibas. Creemos importante profundizar más sobre la bioquímica de estos organismos, realizando, entre otras, pruebas sistematizadas de ésta índole para dar a conocer la localización o distribución de los componentes celulares accesibles a las técnicas disponibles.

1.2 *Objetivos*

- 1. Determinar la presencia de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos mediante técnicas citoquímicas, para microscopía óptica, en trofozoitos de *Acanthamoeba culbertsoni* de cultivos axénicos.**
- 2. Aportar conocimientos referentes a la localización *in situ* de los componentes citados, en trofozoitos de *A. culbertsoni* de cultivos axénicos.**

1.3 *Hipótesis*

Si se han identificado carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba* spp. con diversos métodos, será posible demostrarlos en los trofozoitos de cultivos axénicos mediante pruebas citoquímicas, cuyas reacciones particulares podrán ser observadas por microscopía óptica.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

Las descripciones que hemos hallado en la literatura sobre la especie objeto de éste trabajo, son relativamente pobres, quizás porque otras como *A. castellanii* tienen mayor interés médico por ser agentes más frecuentes de encefalitis amibiana granulomatosa. Hemos recogido aquí características morfológicas y bioquímicas de ellas, para ilustrar lo que se conoce, a grandes rasgos, de tales especies hasta donde ha sido posible. Los hallazgos citoquímicos se describirán más adelante.

2.1 Características morfológicas de *Acanthamoeba* spp, y *Acanthamoeba castellanii* en particular.

Los trofozoitos de *Acanthamoeba*, se reconocen y diferencian de los de otras amibas de vida libre como *Naegleria* spp. por la presencia de acantopodios. Los acantopodios están compuestos de partículas granulares finas y de gránulos de glucógeno, claramente distinguibles del resto del citoplasma y no tienen organelos citoplasmáticos. Los trofozoitos miden de 20 a 40 μm aproximadamente. Las células al principio, antes de moverse, son planas, pero conforme se deslizan van cambiando su forma, su locomoción es lenta y el borde de la célula parece una fimbria (fleco) debido a un fino proceso hialino (20).

Cuando se encuentra en un substrato *A. castellanii* presenta un amplio pseudópodo locomotor, con finas proyecciones de 1-2 μm de diámetro (figura 1). Este pseudópodo y los acantopodios, están compuestos de citoplasma hialino, el cual carece de vacuolas y partículas que llenan la célula amibiana. La "corteza" de las células redondeadas, también está compuesta de citoplasma hialino (ectoplasma). Bajo microscopía electrónica de transmisión se observa que la región hialina contiene solamente los más pequeños de los elementos formados dentro de la célula, como son partículas de glucógeno, ribosomas libres y algunas pequeñas vesículas y túbulos. Otro componente principal del citoplasma hialino es el material fibroso fino, con fibrillas de un diámetro de 50 Å. En algunas regiones, las fibras parecen estar orientadas paralelamente, en otros casos al azar. Algunas veces aparecen apiladas y pueden hallarse penetrando el endoplasma. En la superficie de la amiba se pueden encontrar microproyecciones de 0.1 μm de diámetro, estas tienen una zona interna formada de algunas fibrillas que forman la "corteza" de la célula. La superficie de la amibas fijadas rara vez se observa lisa, y hay por lo menos una invaginación en su superficie, que es un túbulo de aproximadamente 650 Å de diámetro, que termina en una "fosa cerrada". Este túbulo puede ser muy corto o penetrar hasta 1 μm o más en la célula (2).

En *A. castellanii* la membrana es una estructura generalmente trilaminar, con una dimensión de 70-90 Å. Esta es frecuentemente asimétrica, y en ella se puede observar que la membrana externa es más densa que la interna. (2). *Acanthamoeba* posee una membrana citoplasmática delgada, densa a los electrones (20).

El citoplasma es finamente granular y contiene un sólo núcleo, con un diámetro aproximado de 6 µm en los trofozoítos, que generalmente está centrado; es largo, denso y pequeño, posee un nucleolo (endosoma o cariosoma) central de aproximadamente 2.4 µm de diámetro, rodeado por una zona clara, y que comunmente es denso, compacto y esférico, variando a veces su morfología, algunas veces pueden verse dentro del nucleolo vacuolas o vesículas. La membrana nuclear está formada por dos membranas densas a los electrones, separadas por un espacio que a intervalos regulares tiene puntos de unión o áreas conectadas, también densas a los electrones (20).

El trofozoíto de *Acanthamoeba* es típicamente uninucleado, pero pueden presentarse numerosos individuos multinucleados en cultivos que han sido agitados. En ejemplares fijados de *A. castellanii*, el núcleo es lobulado en diferentes grados. En algunos casos es ligeramente festoneado y en otros profundamente hendido por el citoplasma. Ha sido observado tanto en células fijadas como en fresco, que el núcleo es fácilmente deformable y algunas veces está severamente encogido, como sucede al estrecharse el citoplasma. No se ha visto revestimiento de la cubierta nuclear por una lámina fibrosa. Las membranas de la cubierta nuclear, están separadas por una distancia aproximada de 350 Å. Presenta numerosos poros nucleares, los cuales tienen un diámetro aproximado de 1040 Å y tienen un gránulo central denso. Se hallan ribosomas en la cubierta de la membrana externa. El nucleolo es grande, de un diámetro aproximado de 2.4 µm y ocupa un volumen aproximado de 1/8 del volumen nuclear. Su morfología es variable, y algunas veces aparece difuso, pero casi siempre se encuentra compacto y esférico. Frecuentemente es vesicular y su masa semeja la forma de un anillo visto transversalmente. No es común ver dos nucleolos por núcleo. El mayor componente es el nucleolonema, una red de material fibrilar que se tinte densamente. El intersticio (grieta) del nucleolonema, está lleno de una multitud de gránulos similares en tamaño y apariencia a los ribosomas citoplasmáticos. Al mismo tiempo los amorfos se observan dispuestos como una banda fibrosa amplia. La región nuclear externa del nucleolo se observa generalmente homogénea y consiste de material nuclear y fibrillas finas, uniformemente dispersas (2).

En los animales o en el hombre infectado, los trofozoítos pueden ser identificados dentro del tejido del Sistema Nervioso Central por el gran nucleolo central esférico, rodeado por un halo nuclear claro (20).

El citoplasma contiene ribosomas libres, algunas pequeñas vesículas, túbulos y grupos de fibrillas, que algunas veces aparecen formando haces; también contiene un número variable de sistemas de membranas citoplasmáticas u organelos tales como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y liso, vacuolas digestivas grandes caracterizadas por una membrana que tiene invaginaciones típicas, que contienen numerosas "formas mielínicas", precipitado floculento, estructuras espiraladas y diferentes tipos de cristaloides y material "englobado";

vesículas expulsoras de agua, (vacuolas pulsátiles) que generalmente tienen un borde desflechado, vacuolas que están llenas de gránulos finos dispersos y de partículas densas a los electrones, mitocondrias, gotas de lípidos, lisosomas y partículas de glucógeno. Puede presentarse endosimbiosis en el citoplasma (20).

A. castellani tiene aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y liso, un sistema vacuolar digestivo y una vacuola contráctil o vesícula expulsora de agua. El aparato de Golgi comprende dos o más apilamientos en situación polar, con 3 a 5 cisternas, separadas por un espacio de aproximadamente 200 Å. El espacio entre las membranas de una cisterna es también de aproximadamente 200 Å, excepto en los márgenes donde los sacos están ligeramente dilatados. Muchas vesículas pequeñas y túbulos orientados al azar, están concentrados en la parte cóncava de la pila de la cisterna. Las vesículas, con un diámetro de aproximadamente 300 Å, parecen derivarse tanto de la periferia de la pila de la cisterna como de los túbulos. Algunas vesículas parecen ser del tipo de las llamadas "recubiertas". Las vesículas y túbulos asociados parecen ser indistintas, ya sea porque las estructuras son demasiado pequeñas para quedar incluidas en el grosor de la sección, o porque hay un material filamentoso mal definido, que rodea y se extiende entre las estructuras de ésta área.

El retículo endoplásmico rugoso (RER) en muchas células, se presenta perfilado en su totalidad como secciones transversales circulares y tramos longitudinales cortos. Los túbulos están llenos de un material que se tinte densamente y que a una amplificación mayor aparece granuloso. El material no está distribuido homogéneamente dentro de la cavidad del RE, y en sección longitudinal algunas veces tiene el aspecto de un túbulo dentro de otro. En la configuración tubular, el RER parece ramificarse bastante uniformemente por toda la parte central de la célula. En otros casos aparecen muchos perfiles largos (más de 19 µm de largo), con muy pocas secciones transversales circulares. Las secciones tangenciales de las cisternas tienen arreglos de ribosomas en su superficie. En algunos casos las cisternas están apiladas paralelamente, mientras que en otros se observa orientada al azar. Aún hay ocasiones en que se observan circulares, generalmente encerrando a una mitocondria. Ninguna de las dos formas del RER, la tubular y la cisternal penetra la "corteza" de la célula, encontrándose frecuentemente los elementos de la cisterna alineados en el límite de la "corteza". Algunas veces, la forma apilada de la cisterna del RER rodea zonas de retículo endoplásmico liso (REL). El REL está en forma de finos túbulos, con un diámetro menor a 500 Å. Ocasionalmente se ha podido identificar al REL disperso entre otros constituyentes de la célula (2).

Las vacuolas son elementos sobresalientes en el citoplasma de *Acanthamoeba*, ya estén fijadas o no. Estas comprenden dos sistemas separados: la vesícula expulsora de agua que tiene el papel de regulación osmótica y las vacuolas digestivas que normalmente tienen la función de ingerir partículas. Con el microscopio óptico, la vesícula expulsora de agua (VEA), se observa descargando periódicamente en algunas posiciones de la célula, aunque no siempre descarga completamente, apareciendo entonces fragmentos colapsados, que posteriormente se unen para formar la vesícula. En resumen, la VEA generalmente está rodeada por un espongioma, compuesto de un sistema de túbulos, con un diámetro de unos 600 Å, que se unen con vesículas de aproximadamente 1300 Å de diámetro. Los túbulos están recubiertos con un material lábil que se extiende uniformemente a una distancia de aproximadamente 140 Å en el lumen. Este

materias es filamentosas y aparece como una línea fina densa, cruzando el diámetro del túbulo. El diámetro del túbulo mide 600 Å y la porción densa 500-800 Å.

Se ha observado que en ocasiones se encuentran pequeñas vesículas alrededor de la vesícula principal, aparentemente, sin conexión con ésta, pero si existe un sistema tubular entonces pueden observarse ocasionalmente túbulos individuales, que se abren en la vesícula principal en varios puntos dentro del espongioma. Este último, no está colocado uniformemente alrededor de la periferia de la vesícula expulsora, sino que más bien se ha observado distribuido en varias zonas al azar. La VEA comúnmente presenta pequeños circunvoluciones en el límite de la membrana. Estos pliegues parece que se derivan de la abertura de los túbulos del espongioma en senos poco profundos a medida de que los túbulos se unen a la superficie de la vesícula.

Las vacuolas grandes que corresponden morfológicamente a las vacuolas digestivas, son numerosas en el citoplasma de *A. castellanii*. El tamaño de las vacuolas va desde 0.1 µm de diámetro, hasta un tamaño mayor que el núcleo. Estas vacuolas están limitadas por una membrana, que se asemeja a la membrana plasmática en dimensiones y características de tinción y es asimétrica, ya que la cara interna se tinte más que la externa. Las vacuolas generalmente contienen un escaso precipitado floculante, así como ocasionalmente concentraciones densas de sustancias amorfas. La membrana de las vacuolas digestivas grandes presentan pliegues, conexiones tubulares y vesiculares con la vacuola que se extiende en el citoplasma circundante (2).

En las especies de *Acanthamoeba* las mitocondrias pueden tener diferentes formas: esférica, circular, en forma de bastón, de "mancuerna", oval o alargada. Las crestas están formadas por las ramificaciones de extensiones tubulares anastomosadas de las membranas internas mitocondriales. Algunas veces se pueden observar dentro de la mitocondria gránulos amorfos, densos a los electrones y otros paquetes intracristalinos densos (20).

En *A. castellanii* las mitocondrias presentan forma alargada o ligeramente parecida a "mancuernas". Las crestas tubulares tienen un diámetro de aproximadamente 600 Å, que se hallan en una densa matriz heterogénea, que contiene zonas filamentosas, áreas paracristalinas, y pequeños gránulos semejantes a ribosomas. Las mitocondrias comúnmente contienen uno ó más gránulos amorfos, de un diámetro aproximado de 800 Å, que se hallan en una ampliación del espacio tubular es decir, en el espacio que es continuo con el que se halla entre la membrana interna y la externa mitocondrial. Los gránulos de las mitocondrias varían en su densidad, tienen generalmente forma de anillo y su apariencia cambia durante el enquistamiento de la amiba (2).

Los microtúbulos se encuentran a través de todo el citoplasma. Tienen un diámetro aproximado de 250 Å y generalmente son bastante rectos. Frecuentemente irradian en el complejo del aparato de Golgi, de donde se originan del material denso, que tiene la misma textura que los satélites centriolares. No se encuentran microtúbulos en el citoplasma hialino (2).

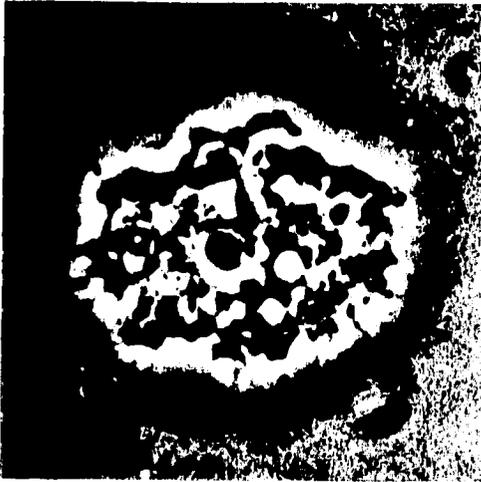


Figura No. 1 Trofozoito de *A. castellanii*
(Cultivo mixico. Microscopía por contraste de fase) (33)

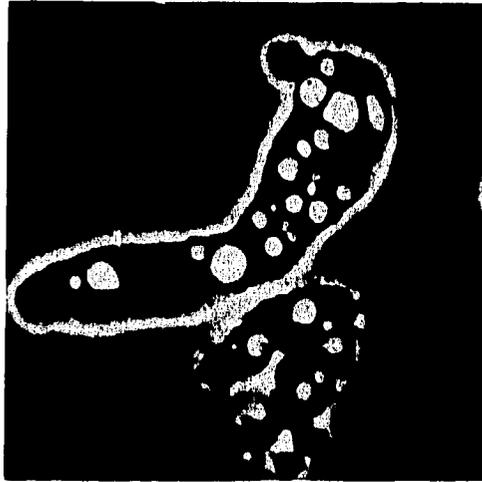


Figura No. 2 Trofozoito de *A. culbertsoni*
(Cultivo axénico. Microscopía por contraste de fase) (9)

Las formas quísticas son diferentes dependiendo de la especie. La pared de los quistes ésta compuesta generalmente de dos capas especializadas; una fibrosa, el exoquiste, arrugada, dentro de una cantidad variable de material matriz, que muestra claramente diversas capas paralelas, y la polihédrica o capa estrellada (interna), que está compuesta de finas fibrillas y que forma un opérculo sobre los ostiolos. Hay un espacio entre las dos capas excepto al nivel del opérculo, en el centro de los ostiolos. Los ángulos de la pared interna hacen contacto con la externa en un número de puntos, para formar poros (ostiolos). Los quistes de *Acanthamoeba* spp. tienen poros en un plano ecuatorial (20,31).

Las amibas patógenas de éste género pueden tener una acumulación de vesículas Golgi y tallos de retículo endoplásmico en forma paralela, cerca de la membrana plasmática.

El citoplasma es finamente granular, y con un solo núcleo central; es muy denso, con gotas de lípidos, mitocondrias esféricas, lisosomas y partes de citoplasma con forma convexa en cada poro. En la pared del quiste, pueden verse partículas citoplasmáticas derivadas de autolisosomas (20).

2.2 Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.

Las amibas de vida libre patógenas presentan un ciclo de vida relativamente simple. En el género de *Acanthamoeba* se observa un trofozoito o fase vegetativa, que se alimenta en su mayor parte de bacterias en la Naturaleza, y una fase de quiste (16). Los trofozoitos de *Acanthamoeba* spp. forman quistes cuando hay desecación o prevalecen condiciones adversas del medio, pudiendo regresar a su forma vegetativa (trofozoito), cuando las condiciones se tornan favorables. El enquistamiento puede ser inducido por la transferencia de los trofozoitos a un medio sin nutrientes, o añadiendo inhibidores metabólicos. Los quistes maduros pueden

pasar por un desenquistamiento cuando se les pone en un medio adecuado para desarrollarse (20).

Las amibas de vida libre se multiplican en el suelo y en el agua, y solo por accidente resulta infectado el ser humano. Los quistes de paredes gruesas soportan la desecación y pueden ser dispersados en el medio ambiente por el viento (33).

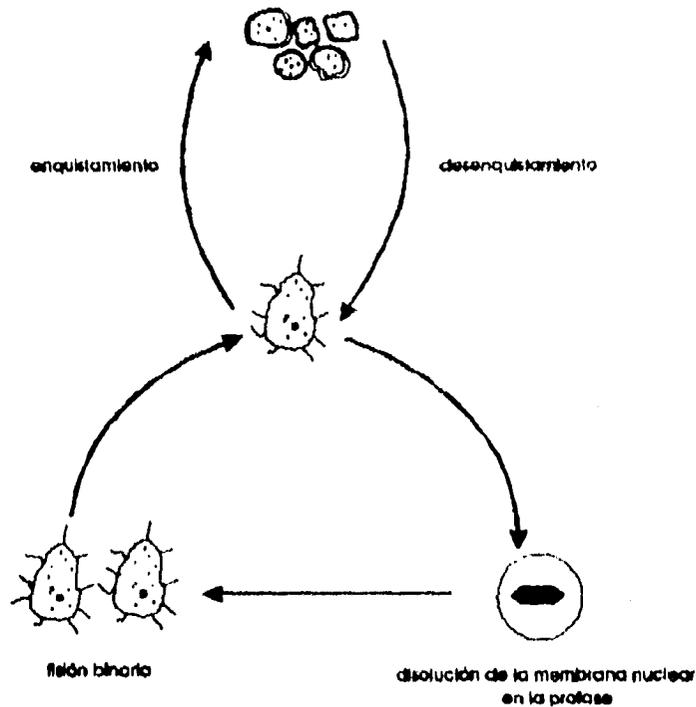


Figura 3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.

Las especies de *Acanthamoeba* no presentan centriolos durante la división y las figuras mitóticas son difíciles de describir. Presentan muchos cromosomas pequeños, y la cromatina del núcleo se observa aglutinada (20). Durante la mitosis hay pérdida de la membrana nuclear y desaparece el nucleolo (16).

2.3 Composición química de *Acanthamoeba* spp.

La bioquímica de las amibas en general, es un campo relativamente poco explorado. La facilidad de cultivar masivamente a las especies de *Acanthamoeba* en medios artificiales axénicos, proporciona un material óptimo para la determinación de componentes químicos de estas células animales (13).

En la literatura se reporta que la membrana plasmática de *A. castellanii* contiene proteínas, fosfolípidos, esteroles, material no lípido, fósforo orgánico y carbohidratos como glucosa, identificación que se realizó por medio de una técnica electroforética (15).

También se observó que al enquistarse *Acanthamoeba* spp. disminuyen los niveles de glucógeno, lípidos totales y fosfolípidos (22). En *A. castellanii* se vio que cuando el trofozoito se transforma en quiste las proteínas, fosfolípidos y glucógeno disminuyen, mientras que los lípidos neutros aumentan (3).

En particular, con respecto a los carbohidratos en amibas de vida libre, se han aislado de los trofozoitos de *A. castellanii*, glucosa y glucógeno. Este último, es el precursor de la celulosa encontrada en la pared del quiste, característica por la cual se diferencian de los trofozoitos (28). Así mismo, en otras investigaciones sobre carbohidratos se ha comprobado que se trataba de glucógeno celular al observar algunos productos de la reacción de este compuesto con alfa y beta amilasa. Además, se observó que disminuía el glucógeno celular paulatinamente, en un cierto lapso, al estar transformándose el trofozoito en quiste (32).

El material de reserva de tipo polisacárido es el glucógeno, el cual fue identificado en *Acanthamoeba* por un característico color rojo con I₂-KI, así como por digestión con α -amilasa, por medio de la identificación de glucosa como azúcar único después de la hidrólisis en H₂SO₄ 1 N por 1 hr a 100°C, y por el espectro infrarrojo que lo identificó como tal. El glucógeno se observa en el citoplasma como gránulos aislados o partículas β . Los gránulos más pequeños son difíciles de distinguir de los ribosomas libres a una amplificación baja. Los gránulos pueden ser tan grandes como de 400 Å de diámetro. Las partículas de glucógeno se hallan por toda la superficie, pero cuando están presentes en grandes cantidades se acumulan en regiones ausentes de otros materiales formados.

En células de cultivos agitados, 7 días después del subcultivo, los lípidos neutros y glucógeno representan aproximadamente el 10% de su peso en seco (2).

En cuanto al contenido en proteínas, se han aislado estas de la superficie de las membranas de dos cepas de *A. castellanii*, lo cual se comprobó por medio de la tinción con ácido peryódico de Schiff, técnica que indicó junto con la determinación de los pesos moleculares que la mayoría de las proteínas eran glucoproteínas (12).

Se ha observado que la cantidad total de ácidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, encontrados en *Acanthamoeba* sp. se mantiene constante, pero las concentraciones de ácidos

grasos específicos cambian. *Acanthamoeba* spp contiene un alto porcentaje de ácidos grasos no saturados y se conoce que la composición de los ácidos grasos se altera por la temperatura a la cual se desarrolla la amiba. Algunos de los derivados de ácidos grasos identificados en *Acanthamoeba* sp en cultivos axénicos de aproximadamente 14 días con nutrientes solubles, son el miristrato, palmitato y estearato entre otros (13). Por otra parte, parece ser que *Acanthamoeba* tiene la capacidad de convertir oleato a linolato y sintetizar a partir de linolato ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono (14).

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* contienen reservas de lípidos y polisacáridos. Los lípidos se encuentran como gotas esféricas, con un diámetro promedio de 0.5 μ m. Estas gotas son osmiofílicas, porque el 80% de los ácidos grasos encontrados en éste género de amiba de vida libre son insaturados. Las gotas no están rodeadas por una membrana trilaminar, pero algunas veces muestran un delgado borde denso a su alrededor. Frecuentemente las gotas están cercanas, unas de otras, pero ocasionalmente se funden formando una gota muy grande (2).

En lo relativo a los ácidos nucleicos se han aislado genomas de DNA de algunas especies de amibas de vida libre, entre ellas *Acanthamoeba* patógena y no patógena, en las que por medio de una digestión y un proceso electroforético y tinción, se han encontrado gran cantidad de bandas de DNA (21). En otro estudio hecho en 5 especies diferentes de *Acanthamoeba*, entre ellas *A. culbertsoni* y *A. castellanii*, se midió la cantidad de DNA en la fase log de crecimiento, hallándose que el contenido de DNA oscilaba entre 2.0-5.0 pg por célula (7). Este género de amibas tienen, ya sea, gran número de cromosomas pequeños o una compleja red de material cromosómico (20). Respecto al RNA, se ha identificado éste como constituyente de un rRNA (26s r RNA) con un peso molecular bajo en *A. castellanii* (27).

2.4 Epidemiología, ecología y factores ambientales

Las amibas de vida libre en general, y las de interés médico en particular (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*) se han encontrado en colectores de aguas termales, descargas de aguas termales contaminadas procedentes de plantas industriales, lagos, albercas y otras colecciones de agua, incluso en aguas marinas.

El agua, a una temperatura relativamente alta, puede ser un reservorio potencial para la proliferación y mantenimiento de las amibas de vida libre termofílicas y patógenas. *Acanthamoeba* spp. se desarrolla a temperaturas entre 25 y 35°C. Apparently las cepas de *Acanthamoeba* de baja virulencia, son capaces de tolerar temperaturas máximas más bajas que las patógenas (20).

Los países en los que se han reportado casos de encefalitis amibiana granulomatosa en el hombre confirmados por autopsia, biopsia, cultivo y aislamiento de las amibas producida por

Acanthamoeba spp. son: Estados Unidos de America, Australia, Sur de Korea, Honduras, Japón, Peru, Venezuela, India, Zambia, Nigeria, México, Puerto Rico y Panamá. Casos presumibles, no confirmado por ninguno de los procedimientos citados, se han reportado en Brasil, Cuba, Gran Bretaña, Hungría, India y Uganda (20).

Se ha visto que las amibas patógenas (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri*) se desarrollan y multiplican mejor durante los meses calientes del año y por temporadas. Estas especies son raras y transitorias, pero por su agresividad, los meses de verano son considerados de alto riesgo, ya que es cuando hay más actividad deportiva en el agua y, además, es el mejor período de desarrollo de las amibas patógenas (20).

Se ha observado que la temperatura y la edad del cultivo (días, semanas, meses o número de fases), tienen una influencia directa en la patogenicidad de las amibas. El desarrollo, la multiplicación y mantenimiento de las diferentes especies, es dependiente de la composición del medio de cultivo (20).

2.5 Formas de infección, enfermedades y tratamiento

Las vías de entrada de *Acanthamoeba* al organismo pueden ser el tracto respiratorio inferior, ulceraciones en la piel y mucosas o heridas abiertas (17).

El período de incubación no se conoce aún, pero se cree que son necesarias varias semanas o meses para el establecimiento de la enfermedad. El curso clínico puede ser prolongado (17).

Las especies de *Acanthamoeba* producen meningoencefalitis, granulomas, inflamación aguda de órganos internos, ulceraciones corneales, gastritis y diarrea transitoria (16). La infección del Sistema Nervioso Central es llamada Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG).

La EAG produce al principio signos neurológicos focales, hemiparesia y convulsiones, dependiendo de la zona del cerebro afectada, alteraciones mentales como irritabilidad, confusión, alucinaciones, letargo, somnolencia y cambios en la personalidad. El dolor de cabeza es persistente, hay fiebre y rigidez de nuca (17).

A. polyphaga, *A. culbertsoni* y *A. castellanii* causan en particular, queratitis y uveitis severas, con algunos casos que han sido sensibles a la terapia de medicamentos, mientras que los casos de encefalitis terminan casi todos con la muerte. *A. castellanii*, *A. culbertsoni* y *A. astronyxis* se han hallado en infecciones de Sistema Nervioso Central (24), esta última se ha aislado de lesiones de piel. La infección ocular puede tener lugar por contaminación de lesiones provocadas por lentes de contacto u otra vía, como agua contaminada, en sujetos inmunocompetentes. La encefalitis se adquiere por vía hematógena, a partir de heridas contaminadas o por vías respiratorias, particularmente en sujetos inmunodeficientes (17,24).

El tratamiento de casos humanos de EAG con sulfadiazina ha sido ineficaz. La polimixina B, la anfotericina B, hidroxistilbamida, la 5-fluorocitosina, el clotrimazol, la pentamidina, el sulfisoxazol, el ketoconazol y otros son efectivos *in vitro*, aunque no se han hecho pruebas *in vivo*. La acriflavina y el clotrimazol han provado ser eficaces en las infecciones oculares, aunque suelen ser muy resistentes al tratamiento (17).

2.6 Clasificación

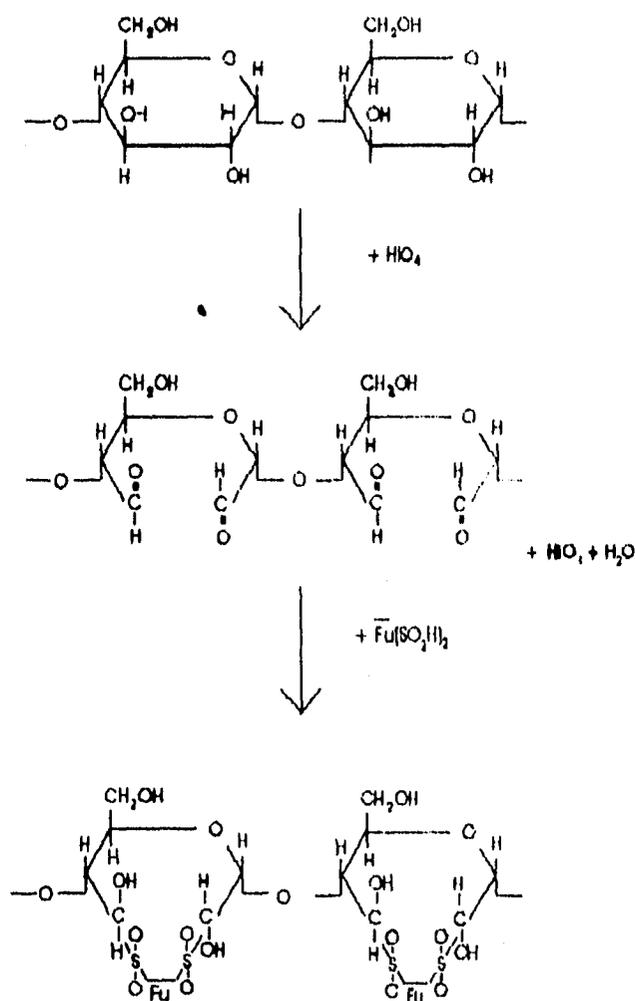
Clasificación taxonómica de las amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* (17).

REINO	PROTISTA
SUBREINO	PROTOZOA
PHYLUM	SARCOMASTIGOPHORA
SUBPHYLUM	SARCODINA
SUPERCLASE	RHIZOPODIA
CLASE	LOBOSEA
SUBCLASE	GYMNAMOEBIA
ORDEN	AMOEBIDA
SUBORDEN	ACANTHAPODINA
FAMILIA	ACANTHAMOEBIDAE
GENERO	<i>Acanthamoeba</i>
ESPECIE	<i>A. castellanii</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. astronyxis</i> <i>A. hatchetti</i> <i>A. palestinensis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. rhysodes</i>

FUNDAMENTOS QUIMICOS DE LOS METODOS

2.7.1 Método del ácido peryódico de Schiff para carbohidratos (PAS)

McManus ideó una reacción, basada en la oxidación de los grupos glicólicos 1-2 de los polisacáridos, por medio del ácido peryódico, produciéndose la liberación de grupos aldehídicos, que dan positiva la reacción de Schiff (8).



Secuencia de la reacción (9).

La cantidad de color desarrollado por la reacción, depende principalmente de la cantidad de estructuras tipo glicol presentes en tejidos, en los azúcares glucosa, galactosa, manosa y en las metilpentosas y fucosas (11).

2.7.2 Método del Carmin de Best para glucógeno

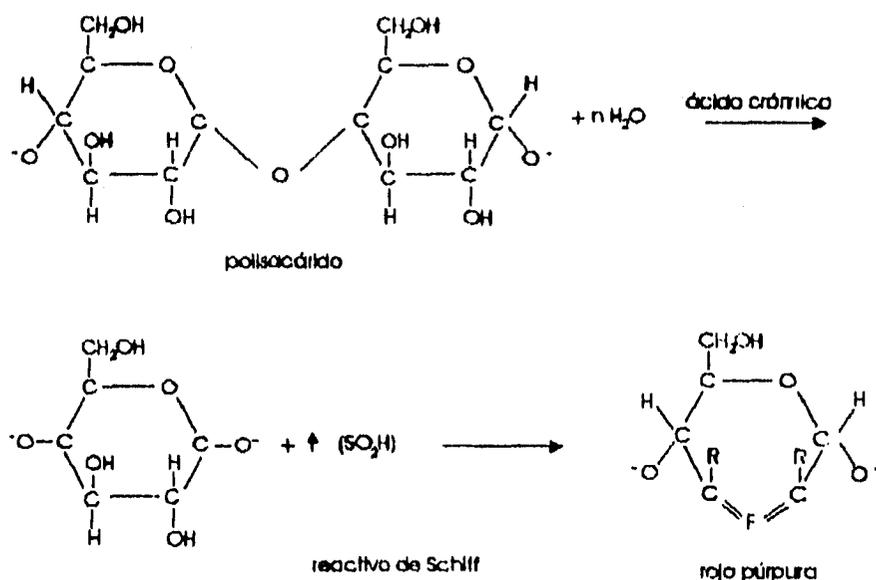
El carmin es un colorante natural que se extrae de insectos (cochinillas). Se trata de un quelato metálico (4). Esta es una tinción empírica para el glucógeno (5). El mecanismo de tinción no se conoce; se supone que en tal coloración juegan un importante papel los enlaces de hidrógeno en la tinción del glucógeno. Se sabe que es una tinción selectiva del glucógeno. La mucina también se tinte, pero más pálidamente que el glucógeno (1).

El pH de la solución colorante oscila entre 9 y 11, y a este pH los grupos fenólicos del colorante se ionizan a aniones $-O^-$, los que a su vez pueden unirse a los grupos glicol del glucógeno por enlaces de hidrógeno (25).

La substancia colorante no posee carga eléctrica definida: si el pH es alcalino adquiere una carga negativa, y positiva si el pH es inferior a 4. Por lo tanto, para coloraciones de los núcleos se utilizan soluciones ácidas, con las que se obtiene un color particularmente nítido y duradero (4).

2.7.3 Método de Bauer y Feulgen para polisacáridos

El método original descrito por Bauer Feulgen, emplea la hidrólisis y la oxidación del glucógeno por medio del ácido crómico durante un breve lapso. Los polialdehídos formados, se muestran con la solución de Schiff:



En donde exista una coloración rojo púrpura, nos indica que hay polisacáridos en esa área teñida (11). Esta técnica da buenos resultados para el glucógeno, ya que otras substancias de tipo carbohidrato se sobreoxidán y no se tñen (1).

2.7.4 Método de la acetilación de Lillie como prueba testigo de los carbohidratos

Esta es una técnica útil en el estudio de los polisacáridos. Se funda en el uso de agentes bloqueadores que se combinan químicamente con los grupos reactivos, para evitar la reacción normal que tendría lugar con el método citoquímico de ensayo. En éste método, la piridina en combinación con el anhídrido acético ejercen este bloqueo, según la reacción (19).



grupo anhídrido acético acetilación (bloqueo) ácido acético
aldehído

2.7.5 Método de digestión con diastasa o amilasa de Lillie como prueba testigo para carbohidratos

Los polisacáridos de la D-glucosa, como el glucógeno o la amilopectina, presentes como material energético de reserva en muchos protozoarios parásitos, (como las amibas que estudiamos aquí), tienen enlaces α 1,4 que son fácilmente hidrolizados con α y β amilasas, rindiendo glucosa y maltosa, respectivamente. Por este medio se rompe la cadena polimérica del polisacárido dejando libres a monómeros o dímeros de glucosa, que escapan de la célula, y que no reaccionarán ya con los reactivos del método de PAS. En ocasiones pueden substituirse las enzimas mencionadas por saliva que contiene diastasas, método simple para el hidrolizado de polisacáridos (18).

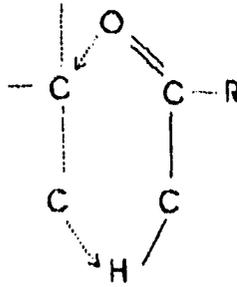
2.7.6 Método de McManus-Mowery y Spicer para mucopolisacáridos

El compuesto azul de alciano es un colorante del tipo de las ftalocianinas de cobre, clorometil substituidas, en donde los grupos clorometilo se hacen reaccionar con tiourea o alquiltioureas, dando lugar a derivados del isotiouronio que son muy solubles en agua (11).

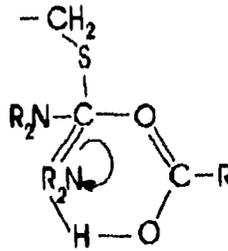
En éste método del azul del alciano, los mucopolisacáridos (proteín-polisacáridos) son teñidos, no así las mucoproteínas (1).

De acuerdo con Spicer (26), la tinción de los ácidos urónicos pudiera atribuirse a la formación de uniones amida. Esto raramente puede ocurrir, a menos que los grupos amino del colorante se dealquilaran espontáneamente. Otra hipótesis sugiere que la coloración pudiera deberse a uniones del hidrógeno del carboxilo no ionizado al cobre y al nitrógeno de la ftalocianina para formar una estructura de seis elementos (23).

El método con el nombre de Mc Manus-Mowery para mucopolisacáridos ácidos y neutros es citado por Clark (6).

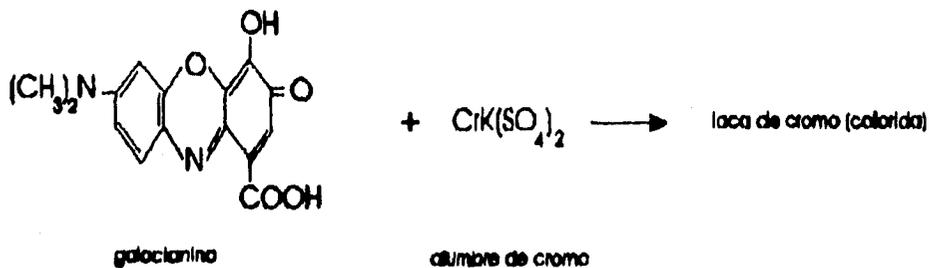


o bien uniéndose con el grupo tiouronio (11)



2.7.7 Método de Galocianina-alumbre de cromo de Einarson para ácidos nucleicos

La galocianina es un colorante básico perteneciente al grupo de las oxacinas. Tíñe de manera selectiva los núcleos, pues es utilizada como taca de cromo. Colorea específicamente el ADN y estructuras constituidas por ARN (4). El mecanismo es debido a la combinación, en un pH ácido, del residuo del ácido fosfórico del ácido nucleico con la galocianina. La reacción debe ser llevada a un pH de 1, porque un valor alto (pH 2, ó arriba de éste), teñirá otros componentes (1).



taca de cromo + grupos fosfato de ácidos nucleicos → taca salina estable de color azul (23).

2.7.8 Método del azul II (azur B) para ácidos nucleicos

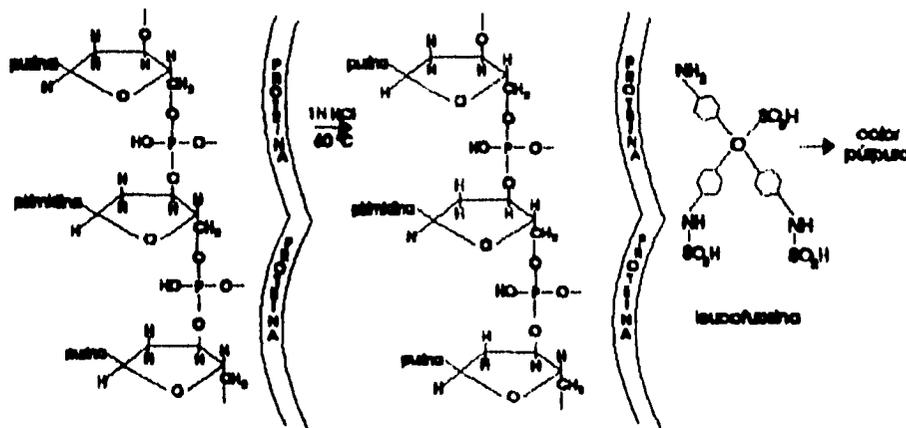
El azul B es un colorante básico. Swift (29) indica que el factor más importante para la unión del colorante con la nucleoproteína es la carga electrostática que se halla sobre ambas moléculas. Los colorantes básicos son generalmente sales de bases coloreadas y su grupo combinante común, o auxocromo, es el grupo amino que existe en forma disociada positiva ($-\text{NH}_3^+$), excepto a pH alto.

Respecto a su especificidad, existen algunos grupos ácidos además de los ácidos nucleicos que son capaces de unirse a colorantes básicos. Los grupos carboxilo de las proteínas se unen a colorantes a pH alto.

La diferenciación se logra al enjuagar con alcohol después de la tinción, lo que separa el colorante libre del unido, siendo particularmente importante la solubilidad del colorante en ése disolvente. El azul B puede ser removido rápida y completamente por alcohol etílico, por tal razón es preferible usar alcoholes de mayor peso molecular como el alcohol terbutílico, en donde el colorante tiene una baja solubilidad en el enjuague. Este tipo de diferenciación evita que se elimine todo el colorante (29)

2.7.9 Método de Feulgen para DNA

La reacción nuclear de Feulgen depende de la hidrólisis ácida suave del ADN con HCl a 60°C . Feulgen muestra que hay una liberación de grupos aldehídos del azúcar desoxipentosa del ADN. Una vez efectuada la hidrólisis se procede a lavar y tratar con el reactivo de Schiff (fucsina-ácido sulfuroso) que reacciona con los grupos expuestos, dando un color púrpura únicamente en la cromatina nuclear. Químicamente, es probable que la hidrólisis ácida suave transforme a la desoxirribosa en el aldehído de la hidroxi levulina, lo que sugiere que el aldehído lábil es el responsable del color púrpura desarrollado (11).



Esquema químico de la reacción de Feulgen. La hidrólisis ácida extrae las purinas y deja en libertad los grupos aldehídos, que reaccionan con la leucofucsina (reactivo de Schiff) para dar el color púrpura. En el esquema, el tamaño de la desoxipentosa está muy exagerado en relación con el de la proteína (8).

2.7.10 Método de Lillie-Burner para lípidos neutros

Esta técnica se basa en el proceso de difusión y solubilidad del colorante, rojo oleoso, en los lípidos más que en otros tipos de disolventes, acumulándose en el interior de las gotas de lípido (8,11). El color que se desarrolla es rojo (11).

2.7.11 Método de Frøden para extracción de lípidos

La extracción es un procedimiento de importancia en la identificación de lípidos, donde los resultados deberán ser interpretados con precaución.

La solubilidad de material lípido puro en disolventes orgánicos es bien conocida, pero para aplicarse en histoquímica y citoquímica se deben tener en cuenta ciertas consideraciones. Los lípidos son frecuentemente mezcla de más de un componente, por lo que se debe tener cuidado con el otro u otros compuestos en la mezcla, ya que pueden evitar la extracción adecuada por el disolvente, que de otro modo sería efectiva (1).

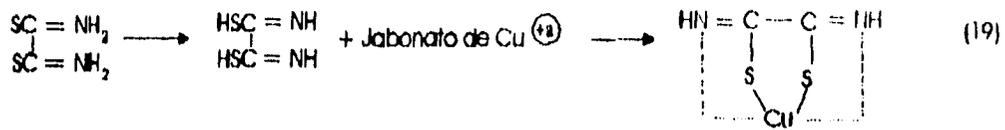
2.7.12 Método del azul de Nilo de Lillie para ácidos grasos

La solución acuosa de azul de Nilo A, contiene el colorante catiónico azul, el producto de oxidación rojo espontáneo llamado rojo Nilo y la base imino naranja-rojo del azul de Nilo. El rojo Nilo disuelve los componentes de todos los lípidos grasos y actúa como un colorante general de lípidos. Ambos, el catión azul de Nilo y la base imino, pueden reaccionar con los grupos ácidos uniéndose de esta manera al color azul. Consecuentemente, los fosfolípidos y ácidos grasos se tñirán de azul (porque los componentes de la solución de azul de Nilo cubrirán y enmascararán cualquier efecto del rojo Nilo) ya que el color azul es específico para ácidos grasos y fosfolípidos. Por otra parte, las grasas neutras se tñirán de rojo (5).

2.7.13 Método de Holzinger para ácidos grasos

Este método es una derivación del propuesto por Fischler en 1904 (10) y de otros métodos similares, de los que Holzinger seleccionó el del ácido rubetánico, que recomendó para la demostración de ácidos grasos (1). Usa acetato de cobre y ácido rubetánico. Se generan jabones de cobre que forman un complejo con el ácido rubetánico, de rubenato de cobre, que es un pigmento de color negro verdusco (19).

Los ácidos grasos obtenidos por hidrólisis pueden ser de 2 tipos: insaturados o saturados. Dos ácidos grasos saturados son el ácido palmítico ó el ácido esteárico y un ácido graso insaturado es el ácido oleico (1).



ácido rubedónico

forma dimerizado
del ácido rubedónico

rubeanato de cobre

2.7.14 Método de Chapman del azul de bromofenol-mercurio para proteínas

Este método fué usado por Durrum en 1950 para la demostración de proteínas con métodos colorimétricos en papel filtro. Fué adaptada para proteínas celulares por Mazia y colaboradores en 1954. Citado por Troyer (30).

Estos autores hallaron que las preparaciones teñidas con sus procedimientos seguan las Leyes colorimétricas de Lambert y Beer, ya que la intensidad de coloración de la muestra era proporcional a la cantidad de proteínas presentes (11).

El mecanismo de acción no es conocido, pero probablemente depende de la afinidad del colorante con una proteína simple (30).

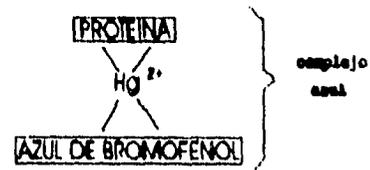


esp. tiol
residualmente

y



(RS)₂Hg azul de bromofenol → complejo azul



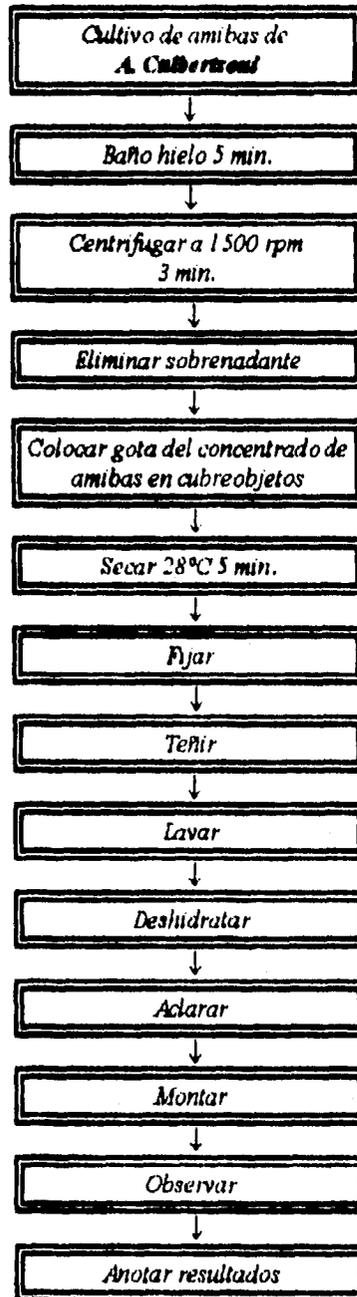
2.7.15 Método de Alfert y Geschwind del verde rápido para proteínas básicas

Este método se fundamenta en la reacción que ocurre entre el verde rápido y las proteínas básicas que contienen arginina, lisina e histidina que hidrolizadas con ácido tricloroacético, desarrollan color verde brillante a un pH de 8.0-8.1. Las proteínas básicas, histonas y otras proteínas, están asociadas a los ácidos nucleicos, de ahí que esta técnica se use en la identificación de nucleoproteínas (11).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material biológico

1. *Acanthamoeba culbertsoni* de cultivos axénicos. (Donada por el Dr. Lares V.)

3.2.2 Material de laboratorio

Agitadores de vidrio	Pinzas rectas de acero inoxidable
Agujas 22 x 32 mm, 25 x 16 mm Plastipack (Becton-Dickinson)	Pipetas graduadas de 2 ml, 5 ml y 10 ml
Algodón	Pipetas Pasteur tallo corto
Anillo metálico para soporte	Portaobjetos estandar
Cristalizador 100 x 50 y 190 x 100, Pyrex	Probetas 100 ml y 250 ml, Pyrex
Cubreobjetos 18 x 18 mm, No. 1	Soporte universal
Embudo talle corto de 8 cm diámetro, Pyrex	Tela de asbesto
Espátula de acero inoxidable	Termómetro -20 a 120°C
Gradilla metálica	Tubos con tapón de rosca de 12.5 x 1.5 y 10 x 1.5 Pyrex
Jeringas 1, 5 y 10 ml, Plastipack	Vasos de Columbia
Matraces aforados 50 ml y 100 ml, Pyrex	Vasos de precipitado 20 ml, 50 ml, 250 ml y 1000 ml, Pyrex
Matraces Erlenmeyer 125 ml y 250 ml, Pyrex	Viales de plástico de 2 ml con tapón de rosca
Mechero Bunsen	
Papel filtro Whatman No. 42	

3.2.3 Reactivos

Acetato de calcio (a)	Alcohol etílico absoluto (b)
Acetato de cobre (a)	Alcohol isopropílico absoluto (b)
Acetona anhidra (b)	Alumbre de cromo (c)
Acido acético glacial (a)	Anhidrido acético (a)
Acido cítrico monohidratado (a)	Azul alciano 8GX (a)
Acido clorhídrico concentrado (a)	Azul de bromofenol (a)
Acido peryódico (a)	Azur II (Azur tipo B) (a)
Acido rubeánico (b)	Bactocasitone (d)
Acido sulfúrico concentrado (b)	β amilasa (b)
Acido tricloroacético (a)	Biotriptasa (e)
Alcohol etílico de 96° (b)	Butanol terciario (b)
	Carbonato de potasio (a)

Carbón activado (c)	Glicerina (a)
Carmín de Best (a)	Glucosa (b)
Cloroformo anhidro (b)	Hemalum de Mayer
Cloruro de calcio anhidro (a)	Hipoclorito de sodio (b)
Cloruro mercúrico (a)	Hidroxido de amonio concentrado (a)
Cloruro de potasio (a)	Metabisulfito de potasio (c)
Cloruro de sodio (a)	Metanol absoluto (b)
Dicromato de potasio (a)	Piridina anhidra (a)
E.D.T.A. disódico (b)	Regulador de referencia pH 7 (a)
Formol (b)	Resina sintética (a)
Fosfato de potasio dibásico anhidro (a)	Rojo oleoso (a)
Fosfato de potasio monobásico anhidro (a)	Suero fetal estéril de bovino
Fosfato disódico anhidro (a)	Sulfato de azul de Nilo (a)
Fosfato monosódico anhidro (a)	Sulfato de sodio (a)
Fosfato monobásico de sodio monohidratado (a)	Trióxido de cromo (ácido crómico) (a)
Fosfato monobásico de potasio anhidro (a)	Tween 80
Fucsina básica (a)	Verde rápido FCF (a)
Galocianina (a)	Verde rápido (a)
Gelatina (b)	Xileno (b)

Marcas de reactivos utilizados:

- (a) Sigma Chemical Co. USA
- (b) Merck México, S.A.
- (c) Mallinckrodt Chemical Works, USA
- (d) Difco Laboratories, USA
- (e) Bioxon de México, S.A. de C.V.

3.2.4 Equipos

Balanza granataria Ohaus
 Balanza analítica Sartorius
 Cámara fotomicrográfica de 35 mm modelo 1053 F
 Centrifuga Sol-Bat, modelo J 12
 Estufa para incubación de 28°C-37°C Riossa
 Fotomicroscopio American Optical Microstar XH110TU-1-serie one-ten. Con control de exposición Expo Star
 Reloj cronómetro General Electric

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Método para la fijación de *A. culbertsoni*.

1. Introducir durante 5 minutos en agua fría el tubo que contiene las amibas sembradas en el medio de cultivo bactocasitone (ver apéndice IV) (cuando estén en su óptimo desarrollo, aproximadamente 7 días de incubación) con el fin de desprenderlas de las paredes del tubo.
2. Centrifugar a 1500 rpm durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante, pero conservando una mínima cantidad de líquido.
4. Con una pipeta Pasteur colocar una pequeña gota del sedimento en el centro de un cubreobjetos desengrasado y limpio (ver apéndice III).
5. Secar en estufa a 28°C aproximadamente 5 min. evitando exceso de secado, (conservar húmedo el frotis).
6. Introducir en el fijador apropiado, dependiendo de la técnica a utilizar, durante el tiempo óptimo, generalmente alrededor de 25 minutos, inmediatamente después del secado.
7. Enjuagar la preparación con agua destilada.

NOTA: El proceso de la fijación debe realizarse lo más rápido y continuo posible para evitar que se redondeen las amibas. Al colocar la gota en el centro del cubreobjetos, debe permitirse que durante el proceso de secado, los trofozoítos se sedimenten y se adhieran a aquél. Conviene tener una buena cantidad de amibas en un área relativamente pequeña para facilitar su localización durante las tinciones y en las preparaciones terminadas.

3.3.2 METODOS PARA LA DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS Y TESTIGOS

3.3.2.1 Método del ácido peryódico de Schiff para carbohidatos (PAS) (34).

1. Fijar en metanol absoluto.
2. Lavar preparación con agua destilada.
3. Oxidar en solución peryódica al 1%, 10 minutos.
4. Lavar con agua de la llave, 5 minutos.
5. Lavar con agua destilada, durante 1 minuto.
6. Sumergir en reactivo de Schiff (ver apéndice II, soluciones colorantes) 15 minutos, en la oscuridad.
7. Lavar con agua de la llave, 5 minutos.
8. Deshidratar con alcoholes del 30°, 50°, 70°, 80°, 96 y 100° 5 minutos cada vez.
9. Pasar a una mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol 50:50, durante 5 minutos.

10. Aclarar en xilol, 5 minutos.

11. Montar en resina sintética.

Resultado: Glucógeno, proteína-polisacáridos, glucolípidos y débilmente las glucoproteínas, en varios matices de rojo púrpura. El glucógeno se tñe en tono más profundo.

3.3.2.2 Método del Carmín de Best para glucógeno (34).

1. Fijar en metanol absoluto, formol neutro ó formol-calcio (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Pasar preparación por alcohol etílico absoluto.
3. Pasar a solución Carmín de Best fresca (ver apéndice II, otras soluciones) por 30 minutos.
4. Pasar a diferenciador de Best (ver apéndice II, otras soluciones) aproximadamente 10 segundos
5. Lavar en alcohol 80°.
6. Pasar a alcohol absoluto, 5 minutos.
7. Pasar a una mezcla de alcohol absoluto-xilol 50:50, durante 5 minutos.
8. Pasar a xilol, 5 minutos.
9. Montar en resina sintética.

Resultado: Glucógeno en rojo, más o menos labioso.

3.3.2.3 Método de Bauer-Feulgen para glucógeno (1).

1. Fijar en frío (4°C), con metanol absoluto o formol-alcohol (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Pasar preparación por agua destilada.
3. Pasar a una solución de ácido crómico (trióxido de cromo) al 4%, durante 30 minutos.
4. Lavar bien con agua de la llave.
5. Pasar a una solución de ácido peryódico al 1%, durante 10 minutos.
6. Lavar con agua de la llave, 5 minutos.
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Sumergir en reactivo de Schiff (ver apéndice II, soluciones colorantes) 15 minutos, en la obscuridad.
9. Lavar con agua de la llave, 5 minutos.
10. Realizar 3 cambios de 2 minutos cada uno, en solución recién preparada de metabisulfito de potasio (ver apéndice II, otras soluciones).
11. Lavar con agua de la llave, durante 5 minutos.
12. Pasar por alcoholes del 30°, 50°, 70°, 80°, 96° y 100° 5 minutos cada vez.
13. Pasar a una mezcla de alcohol 100°-xilol 50:50, durante 5 minutos.
14. Aclarar en xilol, 5 minutos.

15. Montar en resina sintética.

Resultado: Glucógeno y algunas mucinas en rojo púrpura.

3.3.2.4 Método de acetilación de Lillie para comprobar la presencia de glucógeno. (Testigo) (19).

1. Fijar de acuerdo al método que se vaya a utilizar después de la acetilación.
2. Sumergir la preparación en una mezcla de anhídrido acético-piridina anhidra (ver apéndice II, otras soluciones) a 60°C, 4 horas.
3. Lavar con agua destilada, al menos 3 veces, 2 minutos cada una.
4. Proseguir con el método de Schiff.
5. Deshidratar y aclarar de acuerdo al método de Schiff.
6. Montar en resina sintética.

Resultado: Una reacción negativa después de la acetilación indica que la reacción original se debió a grupos 1,4 glicol.

3.3.2.5 Método de digestión con saliva (diastasa) para comprobar la presencia de glucógeno. (Testigo) (35).

1. Fijar según indique la técnica que se vaya a utilizar después de la digestión.
2. La preparación se cubre durante 1-2 horas con saliva.
3. Lavar bien con agua destilada.
4. Seguir el método de Schiff.
5. Deshidratar y aclarar de acuerdo al método de Schiff.
6. Montar en resina sintética.

Resultado: La reacción negativa después de la digestión, indica presencia de carbohidratos hidrolizables como el glucógeno o amilopectina.

3.3.2.6 Método de McManus-Mowery para mucopolisacáridos (35).

1. Fijar con formol-calcio o Carnoy-Jones (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Pasar la preparación por agua destilada.
3. Tefir con solución acética de azul de alciano 8GX recién preparada (ver apéndice II, soluciones colorantes), 40 minutos.
4. Lavar con agua.
5. Pasar a una solución de ácido peryódico al 1%, durante 5 minutos.
6. Lavar con agua de la llave, por 5 minutos.

7. Enjuagar con agua destilada.
8. Sumergir en reactivo de Schiff (ver apéndice II, soluciones colorantes) durante 30 minutos, en la oscuridad.
9. Lavar con agua de la llave, durante 10 minutos.
10. Deshidratar con alcoholes del 70°, 96° y 100°, 5 minutos cada vez.
11. Introducir en una mezcla de alcohol absoluto-xilol 50:50, 5 minutos.
12. Aclarar en xilol durante 5 minutos.
13. Montar en resina sintética.

Resultado: Mucopolisacáridos ácidos en azul, mucopolisacáridos neutros en magenta.

3.3.2.7 Método de Lillie de digestión con β amilasa para comprobar la presencia de mucopolisacáridos. (Testigo) (1).

1. Fijar según indique la técnica a utilizar después de la digestión.
2. Introducir en una solución de amilasa en fosfato de sodio salino (ver apéndice II, otras soluciones), a 37°C, durante 1 hora.
3. Enjuagar en agua destilada.
4. Seguir el método del Carmin de Best.
5. Deshidratar y aclarar según el método del Carmin de Best.
6. Montar en resina sintética.

Resultado: Las mucosubstancias que contienen hexosos se hidrolizan y no se teñirán con el Carmin.

3.3.2.8 Método de Spicer para mucopolisacáridos (26).

1. Fijar con formol-calcio o Carnoy-Jones (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Teñir en azul de alciano 8GX-ácido clorhídrico 0.1 N (ver apéndice II, soluciones colorantes) por 60 minutos.
3. Enjuagar brevemente en ácido clorhídrico 0.1 N.
4. Deshidratar en alcoholes del 30°, 50°, 70°, 96° y 100°, 5 minutos cada vez.
5. Sumergir en una mezcla de alcohol 100°-xilol 50:50, 5 minutos.
6. Aclarar en xilol, durante 5 minutos.
7. Montar en resina sintética.

Resultado: Únicamente las mucosubstancias sulfatadas se teñen en azul.

3.3.3 METODOS PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS

3.3.3.1 Método de Einarson de la galocianina-alumbre de cromo (34).

1. Fijar con formol 10%, Carnoy-Jones o Zenker (ver apéndice, soluciones fijadoras).
2. Pasar las preparaciones por agua destilada.
3. Introducir en una mezcla de galocianina-alumbre de cromo (ver apéndice II, soluciones colorantes) a temperatura del laboratorio, 48 horas.
4. Lavar ligeramente con agua destilada.
5. Deshidratar en alcoholes de 70°, 96° y 100°, 5 minutos en cada uno.
6. Deshidratar en alcohol absoluto-xilol 50:50, durante 5 minutos.
7. Pasar a xilol 5 minutos.
8. Montar en resina sintética.

Resultado: Los ácidos nucleicos se tiñen en azul oscuro. Las variaciones de pH pueden dar lugar a tinciones inespecíficas.

3.3.3.2 Método del Azur II (6).

1. Fijar con formol 10%, metanol absoluto, formol neutro o alcohol-ácido (*) (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Teñir a 37°C en la solución de Azur II (ver apéndice II, soluciones colorantes), 2 horas.
3. Lavar 3 veces con agua destilada.
4. Introducir a butanol terciario durante 1 hora.
5. Aclarar en xileno 5 minutos.
6. Montar en resina sintética.

(*) Para fijar con alcohol-ácido:

Introducir la preparación a la solución de alcohol-ácido durante 30 minutos, pasar a alcohol de 30° y 10° por 5 minutos cada vez. Enjuagar con agua destilada.

Resultado: Los ácidos nucleicos se tiñen en color azul-violáceo.

3.3.3.3 Método de Feulgen para ácidos nucleicos (34).

1. Fijar en formol 10% o Carnoy-Jones (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Sumergir en agua destilada durante 2 minutos.
3. Pasar brevemente a ácido clorhídrico 0.1 N a temperatura ambiente.

4. Introducir en ácido clorhídrico 0.1 N a 60°C, durante 8 minutos.
5. Introducir en reactivo de Schiff (ver apéndice II, soluciones colorantes), 30 minutos, en la oscuridad.
6. Escurrir el exceso.
7. Contrastar con verde rápido (ver apéndice II, soluciones colorantes), 5 segundos.
8. Deshidratar en alcohol del 70°, 96°, 100°, 5 minutos en cada uno.
9. Sumergir en una mezcla de alcohol 100°-xilol 50:50, por 5 minutos.
10. Aclarar en xilol, 5 minutos.
11. Montar en resina sintética.

Resultado: El ADN se tñe en tonos púrpura-rojizo. El citoplasma, en verde.

3.3.4 METODOS PARA LA DETERMINACION DE LIPIDOS Y TESTIGOS.

3.3.4.1 Método de Lillie-Burtner para lípidos neutros (19).

1. Fijar con formol 10% (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Pasar la preparación por agua destilada, durante 2 minutos.
3. Tñir con solución isopropilica de rojo oleoso recientemente filtrado (ver apéndice II, soluciones colorantes) a 37°C, 2 horas.
4. Sumergir en Hemalum de Mayer sin diluir 3 minutos. (puede omitirse).
5. Lavar en agua corriente (si se tñe con Hemalum de Mayer).
6. Diferenciar brevemente en isopropanol de 60° recién preparado.
7. Enjuagar en agua destilada 10 minutos.
8. Montar en gelatina-glicerina.

Resultado: Lípidos en rojo. Si se usa el colorante de contraste (hemalum) los núcleos se tñirán de azul.

3.3.4.2 Método de Fradsen para la extracción de lípidos neutros con metanol-cloroformo. (Testigo) (36).

1. Fijar en formol 10% (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Sumergir la preparación en una mezcla de metanol absoluto-cloroformo anhidro 50:50, a 60°C por 30 minutos.
3. Seguir la técnica de Lillie-Burtner a partir del paso 2.

Resultado: La extracción será completa y no habrá reacción positiva a lípidos.

3.3.4.3 Método de Lillie del sulfato de azul de Nilo para ácidos grasos (19).

1. Fijar en formol 10%, formol calcio o formol neutro (ver apéndice II, soluciones fijadoras) a 4°C.
2. Lavar la preparación en agua destilada.
3. Tefir en la solución de sulfato de azul Nilo (ver apéndice II, soluciones colorantes), 20 minutos.
4. Lavar bien en agua corriente por 10 minutos.
5. Montar en gelatina-glicerina.

Resultado: Ácidos grasos en azul obscura. Grasas neutras de rosa a roja.

3.3.4.4 Método de la acetona para comprobar la existencia de ácidos grasos. (Testigo) (19).

1. Fijar de acuerdo al método del sulfato de azul de Nilo.
2. Pasar a acetona a 4°C por 60 minutos.
3. Seguir el método del sulfato de azul de Nilo a partir del paso 2.

Resultado: La extrucción evitará una reacción colorida.

3.3.4.5 Método de Holcinger para ácidos grasos (34).

1. Fijar en formol calcio a 4°C, o formol 10% (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Tratar las preparaciones con solución de acetato de cobre (ver apéndice II, otras soluciones) 3 horas a temperatura ambiente (20°C aproximadamente).
3. Lavar no más de 10 segundos dos veces en solución de EDTA disódico a pH 7.1 (ver apéndice II, otras soluciones).
4. Lavar en agua destilada, 10 minutos.
5. Sumergir en solución de ácido rubeánico-alcohol absoluto (ver apéndice II, otras soluciones), 30 minutos.
6. Lavar en alcohol de 70°, 3 minutos.
7. Lavar en agua destilada.
8. Montar en gelatina-glicerina.

Resultado: Los ácidos grasos se tñrán en color verde negruzco. Si se usa como fijador el formol-calcio, se requiere un tratamiento previo con HCl 1 N, 1 hora a 22°C.

3.3.4.6 Método de la acetona para comprobar la presencia de ácidos grasos. (Testigo) (34).

1. Fijar de acuerdo a la técnica de Holzinger.
2. Sumergir en acetona anhidra a 4°C, 60 minutos.
3. Seguir la técnica de Holzinger a partir del paso 2.

Resultado: La extracción con acetona evitará una reacción colorida.

3.3.5 METODOS PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS Y TESTIGOS.

3.3.5.1 Método de Chapman del azul de bromofenol-mercurio para proteínas (34).

1. Fijar en formol 10% o Carnoy-Jones (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Pasar la preparación a agua destilada.
3. Tefir en solución de azul de bromofenol-cloruro mercúrico (ver apéndice II, soluciones colorantes) 15 minutos a temperatura de laboratorio.
4. Lavar en ácido acético al 0.5%, 20 minutos.
5. Sumergir en solución reguladora de fosfatos a pH 6.4 (ver apéndice II, soluciones reguladoras) durante 3 minutos.
6. Deshidratar en alcohol 80°, 5 minutos.
7. Deshidratar en alcohol 100°, 5 minutos.
8. Introducir en una mezcla de alcohol absoluto-xilol 50:50, 5 minutos.
9. Aclarar en xileno, 5 minutos.
10. Montar en resina sintética.

Resultado: La mayoría de las proteínas aparecen en azul claro (intenso) o azul grisáceo. Puede haber variaciones del rojo, dependiendo de la concentración de proteínas.

3.3.5.2 Método de Alfert y Geschwind del verde rápido para proteínas básicas (37).

1. Fijar en Carnoy-Jones o formol neutro (ver apéndice II, soluciones fijadoras).
2. Lavar las preparaciones en agua destilada.
3. Sumergir en solución de ácido tricloroacético al 5% en baño María hirviendo, 10 minutos.
4. Lavar en alcohol del 70°, 3 veces, 10 minutos cada vez.
5. Lavar en agua destilada.
6. Pasar a verde rápido recién preparado (ver apéndice II, otras soluciones), al 0.1% durante 30 minutos.
7. Lavar en agua destilada 5 minutos.
8. Lavar en alcohol 95° rápidamente.
9. Deshidratar en alcohol 100°, 5 minutos.
10. Pasar a una mezcla de alcohol absoluto-xilol 50:50, 5 minutos.
11. Aclarar en xilol 5 minutos.
12. Montar en resina sintética.

Resultado: El núcleo se tiñe específicamente (cromosomas). Las proteínas básicas se tiñen en verde o verde azulado.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

Las fotomicrografías se realizaron con fotomicroscopio American Optical Microstar (XH110TU-1-serie one-ten), con control de exposición Expo Star y cámara fotomicrográfica de 35 mm modelo 1053 F.

Carbohidratos

Método de: Schiff del ácido peryódico (PAS).

Resultados obtenidos: Fijación en metanol absoluto. Citoplasma vacuolado, con gránulos de color rojo violáceo intenso, gruesos y finos, numerosos, distribuidos en todo el citoplasma. En algunos trofozoitos se observaron ocupando la periferia del citoplasma y muy rara vez acumulados en alguna región localizada en el contorno de éste. En otros, los gránulos eran muy gruesos, escasos y casi nunca se encontraron invadiendo los acantopodios; en general, en la periferia.

Se apreció un fondo de color rosa en el citoplasma que se extendía a los pseudópodos; las vacuolas y la zona nuclear situada generalmente en la región central del trofozoito, sin tefir (ver foto No. 1).

Método de: Carmin de Best.

Resultados obtenidos: Fijación en metanol absoluto. Citoplasma vacuolado teñido en rojo carmin. Las vacuolas confluyen unas con otras dejando entre sí travéculas finas de citoplasma de color rojo. En ocasiones se observó una gran vacuola y una masa circular citoplasmática densa de unas 5-8 micras, algo más colorida que el resto del citoplasma y granulaciones. En los trofozoitos en los que no se vió el citoplasma tan profusamente vacuolado, se apreciaron algunas granulaciones dispersas, pero en número muy reducido, en tono rojo y más intenso que el citoplasma. Algunas amibas lisadas, mostraron el citoplasma disperso con granulaciones uniformes esféricas. Los acantopodios se tifieron también del mismo color que el citoplasma (ver foto No. 2).

Método de: Bauer Feulgen.

Resultados obtenidos: La fijación a temperatura ambiente en metanol, mostró a los trofozoítos con citoplasma muy vacuolado, con vacuolas de distinto tamaño, algunas grandes, teñidas de color rojo violáceo recortando las vacuolas más pálidas y apreciándose granulaciones medianas y finas en la trama citoplasmática, más numerosas en la periferia, algunas muy gruesas, pero no formando una banda granular tan distinta como en el caso de la fijación con FA en frío, ya que éste fué mas bien raro. Los acantopodios se observaron de color rosa violáceo. En el citoplasma rara vez se distinguió una o dos estructuras circulares, más densamente teñidas que el resto del citoplasma (ver foto No. 3).

Resultados obtenidos: En la fijación con FA a 4°C los trofozoítos se observaron vacuolados, con las zonas intervacuolares de color rojo violáceo muy pálido, destacándose en la periferia del citoplasma una banda de numerosas granulaciones circundantes, densamente teñidas de color violeta, bastante uniformes en tamaño, de grosor medio, que invadían el interior del citoplasma en número muy reducido. Los acantopodios se apreciaron de color violeta y algunos mostraron granulaciones en su parte basal. En ciertas amibas notamos algunas granulaciones violetas muy gruesas; en éste caso, angulosas, polihédricas, que fueron muy evidentes en partes del citoplasma en que se observara este extendido, formando lóbulos.

Método de: ACETILACION de Lillie para la determinación de carbohidratos por PAS. Testigo

Resultados obtenidos: Fijación en metanol absoluto. Los trofozoítos se mostraron negativos a la reacción de carbohidratos por el método de Schiff. Se observó el citoplasma vacuolado, incoloro y los acantopodios hialinos. En el citoplasma se apreciaron algunas granulaciones que se presentaron como cuerpos de pequeño tamaño, refringentes y transparentes (ver foto No. 4).

Método de: DIGESTION de Lillie con saliva para la demostración de carbohidratos (PAS). Testigo.

Resultados obtenidos: Fijación en metanol absoluto. En los trofozoítos tratados con saliva durante 1 hr, el citoplasma se observó ligeramente rosado, prácticamente sin granulaciones, vacuolado, con acantopodios muy pálidos. En otros se distinguieron estas características, pero destacó una estructura circular teñida en rosa intenso, en otras rosa pálido, que pudiera corresponder a una vacuola o quizá al núcleo, con un contenido positivo al Schiff, pero resistente a la acción de la ptialina. Esta estructura no se advirtió en las amibas teñidas (sin tratar con saliva). El citoplasma de los trofozoítos mostró una matriz esponjosa vacuolada,

cuyas travéculas aparecieron del color rosa mencionado y, desde luego, desnudos de granulaciones (ver foto No. 5).

Método de: DIGESTION de Lille con saliva para demostración de glucógeno por el método de Carmin de Best. Testigo.

Resultados obtenidos: Fijación en metanol absoluto. El tratamiento con ptialina de la saliva durante 1:30 hr, mostró una digestión parcial. Los trofozoítos se apreciaron generalmente vacuolados, destacándose una gran vacuola. La tinción citoplásmica se observó más o menos uniforme, extendiéndose a los acantopodios, que se apreciaron más bien de color rosa pálido. En ocasiones se distinguió una masa central o excéntrica, redonda, ligeramente más teñida que el resto del citoplasma que quizá corresponda al núcleo. No se vieron granulaciones en la mayoría de las células ambianas (ver foto No. 6).

Mucopolisacáridos

Método de: McManus-Mowery.

Resultados obtenidos: Fijación en CJ. Los trofozoítos se observaron de contorno irregular, algunos con filopodios bien definidos, largos y en otros cortos. En algunos de ellos se destacó una zona citoplásmica periférica teñida de rosa pálido. Citoplasma vacuolado, con fondo rosáceo, granulaciones citoplásmicas finas, gruesas y muy gruesas, redondas u ovales, éstas últimas de color magenta. Algunas granulaciones en azul claro, color que apreciamos en algunos casos bordeando la célula y los acantopodios. Las granulaciones magenta, de acuerdo con el método, corresponden a mucopolisacáridos neutros y las azules a los ácidos (ver foto No. 7).

Método de: Spicer.

Resultados obtenidos: Fijación en CJ. Trofozoítos ovales, redondeados, con bordes angulares, mostraron en su mayoría los acantopodios típicos teñidos, en algunos ejemplares, en azul muy pálido en el extremo terminal y algo más oscuro en el extremo de su origen, dándole a ese borde el aspecto aserrado. El citoplasma muy vacuolado se observó teñido de un color azul turquesa brillante, a veces exhibiendo una vacuola grande, incolora o muy débilmente

coloreada de azul con el borde teñido un poco más que el resto, dejando ver la iniciación de los pseudópodos filiformes como zonas triangulares, sin que se presentasen granulaciones u otro tipo de estructuras. En algunos trofozoitos se vió diferente densidad del color, generalmente mayor hacia la periferia y en algunas áreas internas del cuerpo amibiano. El núcleo no fué visible (ver foto No. 8).

Método de: DIGESTION de Lillie con β -amilasa para demostración de mucosubstancias (MacManus-Mowery). Testigo

Resultados obtenidos: Algunos trofozoitos fijados con Carnoy-Jones y digestión con β -amilasa, se observaron redondeados y otros con pseudópodos filiformes. El citoplasma en las amibas más grandes se vió vacuolado, en forma de una retícula teñida de color rosa pálido, con los pseudópodos y el contorno azul muy pálido. De acuerdo con lo visto, interpretamos que hubo un efecto digestivo en materiales con componentes carbohidrato, aunque ésta digestión no fué total, por hallarse en algunas tinción rosácea, que indica persistencia de dicho material (ver foto No. 9).

Acidos nucleicos

Método de: Einarson de la galocianina-alumbre de cromo.

Resultados obtenidos: La fijación con Zenker, dió lugar a trofozoitos circulares u ovals, de contornos irregulares, donde se pudo apreciar bien el punto de partida de los acantopodios como zonas triangulares, que rodeaban a las amibas para luego alargarse y hacerse delgados. El citoplasma se observó granuloso, vacuolado, aunque no se distinguieron en todos los casos los límites de las vacuolas, algunas de las cuales eran muy grandes. Citoplasma teñido de violeta azulado, con granulaciones más o menos finas, del mismo color que el citoplasma, algo más densas en la periferia del núcleo o, incluso en la del endosoma, éste en tono violeta oscuro, redondo, grande, rodeado de una zona circular anista azul. A veces se vió alrededor del nucleolo un anillo pálido que lo bordeaba. Algunas células se notaron binucleadas.

Resultados obtenidos: Con fijación en F10, los trofozoitos se presentaron redondeados, ovals, con contornos irregulares, citoplasma vacuolado grumoso, teñido de violeta-grisáceo, con algunas granulaciones citoplasmáticas de color violeta oscuro. Acantopodios violeta oscuro en su inicio, pálidos en su longitud. Núcleo grande con un tono violeta, más oscuro que el resto del citoplasma, con una zona perinuclear clara y difusa, violeta-grisácea. La masa

obscura nuclear correspondió al endosoma, que está embebido en la zona más pálida, pero que tiene contorno circular. Algunas amibas se observaron binucleadas (ver foto No. 10).

Resultados obtenidos: Los trofozoítos fijados con CJ se observaron redondeados u ovoides, con derredor irregular, los acantopodios teñidos de violeta-grisáceo pálido; citoplasma del mismo color, vacuolado, reticulado, con algunas zonas citoplasmáticas periféricas granuladas, difusas, y otras más densas, con gránulos escasos, generalmente entre las vacuolas o el contorno. El núcleo se observó violeta-grisáceo, más intenso que el resto del citoplasma, con una zona perinuclear clara y difusa.

Método de: Azur II.

Resultados obtenidos: Fijación en F10. Trofozoítos con citoplasma azul violeta, vacuolado, algunos con una o dos vacuolas muy grandes ligeramente teñidas. Se observaron granulaciones generalmente finas, algunas gruesas en color violeta intenso (como el endosoma) en el citoplasma, rodeando a las vacuolas y perfilando al núcleo. No se diferenció claramente entre ectoplasma y endoplasma. Los filopodios se encontraron finos y generalmente cortos, sin ninguna otra estructura, salvo en el punto de emergencia del citoplasma, en donde estaban ligeramente más teñidos que en el resto, que se vió prácticamente incoloro. El núcleo, claramente visible, estaba bien limitado del citoplasma, con posición central o subcentral, con un endosoma grande densamente coloreado en violeta, de contorno circular en la mayoría de las amibas, ovalado, arrinconado, ó con derredor ondulado. Entre la membrana y el nucleolo se apreció un halo claro en violeta muy pálido, que permite destacar claramente al nucleolo o endosoma. Algunas células se presentaron binucleadas.

Los trofozoítos mostraron marcadas diferencias en su tamaño, los más pequeños con periferia circular o polihédrica pero en general fué circular u oval (ver foto No. 11).

Método de: Feulgen.

Resultados obtenidos: Fijación en F10. Trofozoítos de formas irregulares, polihédricas, contornos en algunos aserrados, con citoplasma vacuolado teñido de azul verdoso con unas zonas más densas que otras. Núcleos en color magenta muy pálido, algo más densos hacia la periferia; contorno circular (ver foto No. 12).

Lípidos

Método de: Lillie-Burner para lípidos neutros.

Resultados obtenidos: Fijación en F10. Los trofozoítos se observaron de forma oval, irregular, con un citoplasma granuloso fino, teñido de anaranjado verdoso, con gotitas finas y gruesas de color rojo intenso dispersas en el citoplasma. Algunas de estas gotas mostraron refringencia anaranjada. En varias amibas se apreciaron numerosas gotillas, si bien en otras fueron escasas o carecieron de ellas; otras, en cambio, presentaron cúmulos de las gotitas de lípidos, formando así una masa grande en color rojo característico del colorante. En algunas células el borde se vio aserrado, que suponemos corresponde al punto de partida de algunos acantopodios, ya que estos no fueron aparentes (ver foto No. 13).

Método de: Fradsen para la extracción de lípidos neutros con metanol-cloroformo por el método de Lillie-Burner. Testigo.

Resultados obtenidos: Fijación en F10. Los trofozoítos se observaron redondeados, ovales, con bordes angulosos, ligeramente aserrados. El citoplasma se presentó sin estructuras definidas, refringente y sin las gotitas de lípidos que se apreciaron en las preparaciones positivas (ver foto No. 14).

Método de: Sulfato de azul de Nilo de Lillie para ácidos grasos.

Resultados obtenidos: Fijación en F10. Los trofozoítos se observaron en forma ovalada, con contorno redondeado, anguloso, aserrado. Citoplasma teñido en azul muy pálido, con vacuolas que se apreciaron débilmente. En otros, no en todos, se distinguieron gránulos de diferente diámetro, finos y gruesos, irregulares en la periferia, de color azul oscuro (ver foto No. 15).

Método de: Acetona para comprobar la existencia de ácidos grasos por el método sulfato azul de Nilo de Lillie. Testigo.

Resultados obtenidos: Fijación en F10. No se apreciaron diferencias entre la prueba original y el testigo, ya que ambas se tifieron por igual en color azul muy pálido, por lo que consideramos negativa la prueba.

Método de: Holczinger para ácidos grasos.

Resultados obtenidos: Fijación en F10. Las amibas se observaron ovales, redondeadas, con contornos lobulados y algunos aserrados. No se apreciaron los acantopodios, el citoplasma se mostró vacuolado con zonas intervacuolares más oscuras a veces algo más claras hacia el derredor, presentándose como reticulado, de color verde negruzco. El núcleo teñido más intensamente indicó una zona periférica circular no continua, con apariencia granulosa dejando ver una zona central algo más densamente teñida.

En algunos trofozoitos con una tinción algo más pálida, pudimos distinguir bien esta morfología del núcleo, formando una fina banda circular alrededor más o menos regular, a veces en forma continua, y una masa circular anista, difusa en torno al núcleo, coloreada más intensamente que éste, de verde negruzco (ver foto No. 16).

Método de: Acetona para comprobar la presencia de ácidos grasos por el método de Holczinger. Testigo

Resultados obtenidos: Fijación en F10. Los testigos de las amibas se observaron con un citoplasma teñido muy pálidamente, prácticamente incoloro, dejando ver solamente la textura granulosa y vacuolada del citoplasma sin coloración (ver foto No. 17).

Proteínas

Método de: Chapman del azul de bromofenol-mercurio.

Resultados obtenidos: Los trofozoitos fijados con CJ se presentaron con el contorno redondeado, oval, irregular, con citoplasma teñido de azul con algunas zonas más claras que otras, generalmente menos intensas hacia la periferia del trofozoito. Se observaron numerosas granulaciones dispersas en el citoplasma finas y gruesas, redondas, en color azul oscuro (ver foto No. 18).

Resultados obtenidos: Los trofozoitos fijados con F10 se observaron redondeados u ovales, algunos con contornos ligeramente aserrados sin que se apreciaran claramente los acantopodios. El citoplasma se mostró en azul pálido, vacuolado, a veces con 1 o 2 vacuolas muy grandes y en algunos con granulaciones gruesas y finas de color azul oscuro localizadas más hacia la periferia en algunas áreas del citoplasma. Estas granulaciones no se vieron en todos los trofozoitos, aunque el citoplasma en muchos de ellos indicó zonas más coloreadas que

otras. Se hallaron amibas binucleadas en muy baja proporción (menos del 1%). El núcleo se presentó en la mayoría de las células como una mancha redonda u oval y en ocasiones con derredor irregular en azul intenso, en muchos casos uniforme en toda el área del núcleo pero también exhibiendo una zona central algo más teñida, difusa hacia la periferia. En otros casos esta zona más teñida era más concreta dejando ver un halo más claro en su alrededor. Todavía distinguimos algunas células en las que el perfil del núcleo estaba bien delineado como una banda delgada azul más oscura que el citoplasma, pero menos densa que el cuerpo central redondeado, correspondiente posiblemente al endosoma o nucleolo. En algunos trofozoítos apreciamos ésta disposición del contorno nuclear con una masa central pequeña teñida con la misma intensidad que dicha banda.

Método de: Alfert y Geschwind del verde rápido para proteínas básicas.

Resultados obtenidos: Fijación en FN. Los trofozoítos se presentaron redondeados, ovales, pequeños, con un citoplasma verde pálido vacuolado. El núcleo se observó como un cuerpo de contorno circular, denso, teñido de verde más oscuro que el citoplasma. En otros apreciamos un halo incoloro circundando al núcleo. No se vieron otras estructuras (ver foto No. 19).

Como referencia se tomaron fotografías de *Acanthamoeba culbertsoni* (ver foto No. 20) en fresco para observar su estructura general.

4.2 DISCUSION

Se usaron diferentes tipos de fijadores de acuerdo a los componentes a investigar y según los métodos para su identificación. Se reportan los resultados obtenidos con la aplicación de fijadores y métodos más apropiados que demostraron con más claridad la presencia de los componentes buscados. Los trofozoítos provinieron de cultivos axénicos entre 5 y 15 días.

La identificación de carbohidratos se hizo con base en el desarrollo del color rojo magenta con el Schiff-ácido peryódico que tiñó el citoplasma con diferentes tonalidades y granulaciones con color magenta intenso. La aplicación de enzimas hidrolizantes de los carbohidratos o por acetilación con anhídrido acético-piridina eliminó una gran proporción de éstos materiales granulados o que se hallaban en el citoplasma, pero no totalmente en algunos casos, lo cual indica que quizá hubieron carbohidratos unidos a otros grupos moleculares, como ciertos *proteín-carbohidratos*, con enlaces resistentes a estos tratamientos.

En la determinación de mucopolisacáridos (*proteín-carbohidratos*) se aplicaron métodos para poner de manifiesto mucopolisacáridos sulfatados, neutros o ácidos, que de acuerdo con los métodos deberían mostrar coloraciones distintas. Con el método de Spicer, el azul alciano 8 GX coloreó todo el soma amibiano con distintas tonalidades de ese color; sin embargo, con el método de Mc Manus-Mowery se presentó coloración roja y azul. Levandowsky y Hutner (38) refieren que se han hecho estudios sobre recubrimientos del plasmalema de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. usando el azul de alciano y el rojo de rutenio en métodos de microscopía electrónica, que dieron reacción a materiales similares a un mucopolisacárido, pero diferente al glicocalix mucoso de algunas amibas grandes. Esta evidencia podría explicar las reacciones positivas que hallamos para los mucopolisacáridos, en particular con el método de Mc Manus-Mowery, donde observamos un recubrimiento periférico que implicó a los acantopodios y que se tiñó de azul con el colorante. De acuerdo con éste mismo método, se describe que la tinción en rojo de algunos elementos citoplasmáticos corresponde a mucopolisacáridos neutros y los azules a los ácidos.

El resultado que se obtuvo con la aplicación de la β -amilasa, en el sentido de una reacción de digestión importante pero no total, quizá indique que persistieron mucosubstancias (*proteín-carbohidratos*) no digeribles, lo cual concuerda con la persistencia de algún carbohidratos cuando se aplicó la digestión para demostrar su presencia.

Los lípidos, que se presentaron en forma de gotillas dispersas en el citoplasma o confluyendo en algunos casos para formar gotas más gruesas, han sido claramente descritas en la microscopía electrónica por varios autores (2). La cantidad de éstos componentes fué variable y se ha señalado que aumenta en la fase quística (3) quizá como un proceso de conservación de material energético de reserva. Pero probablemente las diferencias en la cantidad de lípidos que observamos no se deban a que los trofozoítos estuviesen cercanos a formar quistes, en virtud de las características de los medios de que se obtuvieron, ya que su edad y mantenimiento nos inclinan a pensar que no hubo detrimento de estos ni alteraciones ambientales que pudiesen haber influido. También los ácidos grasos han sido reportados en trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. en estudios de microscopía electrónica, y que nosotros hemos podido corroborar en nuestras determinaciones citoquímicas, las que por el grado de reacción,

nos permiten señalar que las cantidades no eran despreciables. En la literatura se cita que, generalmente, éstos ácidos son insaturados (2,13).

El gran contenido de proteínas que representa en los trofozoítos la presencia de estructuras del citoesqueleto, las membranas, enzimas diversas, etc. explican la intensidad de la reacción a las proteínas. Es probable que las granulaciones observadas con el método utilizado correspondan a organelos particulares, como podrían ser, quizá, mitocondrias o vesículas con éstos materiales. La misma diferencia de coloración que se notó en el citoplasma podría explicarse por concentraciones variables de proteínas, que cuando son muy abundantes toman el color azul que tiende al rojizo cuando su cantidad es reducida.

En el núcleo fué posible demostrar la presencia de proteínas básicas (histonas) removidas del ácido ribonucleico, mediante el ácido tricloroacético y su tinción con el verde rápido.

Los ácidos nucleicos investigados con el uso de los 3 métodos mencionados en los procedimientos, dieron resultados positivos con algunas variaciones en la forma en que se manifestaron. Aquí intervinieron, probablemente, los distintos fijadores usados que fueron el F10, CJ, metanol absoluto, FN, AA y Zenker, así como los materiales empleados en la tinción. En las amibas del género que nos ocupa, se ha observado por microscopía electrónica la presencia de ácido ribonucleico citoplasmático del retículo endoplásmico granuloso, al que puede haberse debido entre otros elementos, la tinción positiva con los diferentes métodos. Así, el ARN nuclear que corresponde al endosoma, fué evidente con todas ellas. Igualmente podemos señalar que parte de éstas tinciones citoplasmáticas pueden haber correspondido a la presencia de ARN extranuclear. En cuanto al ADN nuclear, Levandowsky y Hubner (38) señalan que se ha reportado que la cromatina que queda entre la membrana nuclear y el endosoma, es decir, en el espacio "claro" que circunda al endosoma en nuestras tinciones, y que correspondería a la región donde se halla la cromatina, ésta no puede identificarse con claridad en la microscopía óptica y electrónica. Probablemente, la forma en que ésta cromatina se presentó en el núcleo de las amibas teñidas no nos permitió identificarla claramente, percibiéndose tan sólo ésta zona "clara" con una tinción parduzca con la galocianina y el Azar II que podría corresponder a su presencia. Solamente pudimos corroborar la existencia de cromatina con el método de Feulgen, pero en forma muy discreta, tiñéndose el material derivado del ADN en un color rojo muy pálido, aunque Page y Rafalko usaron éste método clásico para observar la cromatina (38) obteniendo resultados satisfactorios.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Mediante la aplicación de métodos citoquímicos para microscopía óptica, pudimos poner de manifiesto la presencia de algunos componentes en los trofozoitos de *A. culbertsoni* procedentes de cultivos axénicos.
2. Fueron identificados materiales del tipo carbohidrato, entre ellos el glucógeno, sustancias mucopolisacáridas, lípidos, ácidos grasos, proteínas y ácidos nucleicos.
3. Estos componentes encontrados en la célula amibiana *A. culbertsoni* se pudieron correlacionar en parte con lo encontrado por otros autores en estudios de microscopía electrónica.
4. Estos estudios pretenden contribuir al conocimiento de la composición bioquímica de las amibas de vida libre, en éste caso *A. culbertsoni*.

BIBLIOGRAFIA

1. Bancroft J. D., AN INTRODUCTION TO HISTOCHEMICAL TECHNIQUE, Butterworths, London, 1967.
2. Bowers B. and Korn E. D., The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*, I The trophozoite, Journal of Cell Biology, vol 39, pp. 95-111, 1968.
3. Bowers B. and Korn E. D., The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. II Encystment, The Journal of Cell Biology, vol. 41, pp. 786-805, 1969.
4. Burck H.C. and Citoler C. P., TECNICA HISTOLOGICA, Editorial Paz Montalvo, España, 1969.
5. Chayen J., Bitensky L. and Butcher R. G., PRACTICAL HISTOCHEMISTRY, John Wiley and Sons, Great Britain, 1969.
6. Clark G., STAINING PROCEDURES, 4th ed., Baltimore U.S.A., 1981.
7. Coulson P. B. and Tyndall R. Quantitation by flow microfluorometry of total cellular DNA in *Acanthamoeba*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 26, No. 9, pp. 713-718, 1978.
8. De Robertis E.D.P. y de Robertis E. M. F., BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR, Editorial "El Ateneo", 11ª edición, Buenos Aires, Argentina, 1986.
9. Ferrante A., Free-living amoebae: pathogenicity and immunity, Parasite Immunology, No 1, vol 13, pp. 31-47, 1991.
10. Fischler C. (1904). Zbl. Allg. Path Anat., 15.913. Citado por Bancroft J. D., 1967.
11. González O. A. M. , Citoquímica de *Toxoplasma gondii*, Tesis, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, 1985.
12. Hoover R. L., Surface characterization of two amoebae relative to cell adhesion, Experimental Cell Research, 87, pp. 265-276, 1974.
13. Korn E. D., Fatty acids of *Acanthamoeba* sp., The Journal of Biological Chemistry, vol. 238, No. 11, pp. 3584-3587, 1963.
14. Korn E. D., Biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Acanthamoeba* sp., The Journal of Biological Chemistry, vol. 239, No. 2, pp. 396-400, 1964.

15. Korn E. D. and Olivecrona T., Composition of an amoeba plasma membrane, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 45, No. 1, pp. 90-97, 1971.
16. Kreier J. P., PARASITIC PROTOZOA, VOL II. INTESTINAL FLAGELLATES, HISTOMONADS, TRICHOMONADS, AMOEBA, OPALINIDS AND CILIATES, Academic Press, pp. 508-544, 1978.
17. Lares V. F., Identificación de amibas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba* aisladas de diversas fuentes y determinación de su patogenicidad, Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, 1992.
18. Leninger, A. L., BIOQUIMICA. Las bases moleculares de la estructura y función celular, Ediciones Omega, S.A., 2ª edición, Barcelona, 1984.
19. Lillie R. D. and Fullmer H. M., HISTOPATHOLOGIC TECHNIC AND PRACTICAL HISTOCHEMISTRY, Ed. Mc Graw-Hill Book Company, 4 th, N. Y., 1976.
20. Martínez A. J., FREE LIVING AMEBAS: NATURAL HISTORY, PREVENTION, DIAGNOSIS, PATHOLOGY, AND TREATMENT OF DISEASE, CRC Press, Inc., Boca Raton, U.S.A., 1978.
21. Mc Laughlin G. L., Brandt F.H., and Visvesvara G.S. Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of select *Naegleria* and *Acanthamoeba* amoebae. Journal of Clinical Microbiology, vol. 26, No. 9, pp. 1655-1658, 1988.
22. Mehdi H. and Garg N.K. Changes in the lipid composition and activities of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase during encystation of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 81, pp. 633-636, 1987.
23. Pearse, A.G.E., (a) HISTOCHEMISTRY, THEORETICAL AND APPLIED, vol. I, J & Churchill, 1968.
24. Piekarski, G., MEDICAL PARASITOLOGY, Springer-Verlag, Berlin, 1989.
25. Sheeman D. C. y Hrapchak B. B., THEORY AND PRACTICE OF HISTOTECHNOLOGY, Mosby Company The C. V., London, 1980.
26. Spicer S. S., The Journal of Histochemistry and Histochemistry, 8:18, 1960. Citado por Pearse 1968 (a).
27. Stevens A. R. and Pachler P. F., Discontinuity of 26 S rRNA in *Acanthamoeba castellanii*, Journal Molecular Biology, 66, pp. 225-237, 1972.

28. Stewart J. R. and Weisman R. A., A chemical and autoradiographic study of cellulose synthesis during the encystment of *Acanthamoeba castellanii*, Archives of Biochemistry, 161, pp. 488-498, 1974.
29. Swift, H. , CYTOCHEMICAL TECHNIQUES FOR NUCLEIC ACIDS, IN THE NUCLEIC ACIDS, vol II, Academic Press, New York, 1955.
30. Troyer H., PRINCIPLES AND TECHNIQUES OF HISTOCHEMISTRY, Little Brown and Company (Inc), 1st edition, U. S. A., 1980.
31. Visvesvara G. S. and Balamuth W., Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*, Journal of Protozoology, vol. 22, No. 2, pp. 245-256, 1975.
32. Weisman R. A., Spiegel R. S. and McCauley J. G., Differentiation in *Acanthamoeba* glycogen levels and glycogen synthetase activity during encystment, Biochimica et Biophysica Acta, 201, pp. 45-53, 1970.
33. Zaman V., ATLAS COLOR PARASITOLOGIA CLINICA, editorial Médica Panamericana, 2a reimpression, Argentina, 1993.
34. Pearse, A.G.E., (b) HISTOCHEMISTRY, THEORETICAL AND APLLIED, vol. II, J & Churchill, 1968.
35. Culling, C.S.A., HANDBOOK OF HISTOPATOLOGY AND HISTOCHEMISTRY TECHNIQUES, Butterworths, 3 edition, London, 1974.
36. Fradsen, J. C., Experimental Parasitology, 27, pp. 100-115, 1970.
37. Alfert, M. y Geschwind I. I., A selective staining method for the basic proteins of cell nucleic., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 39, pp 991-999, 1953.
38. Levandowsky M. y Hutner S. H., BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF PROTOZOA, Vol. 1, Academic Press, Inc., 2° edition, U.S.A., 1979.

APENDICES



Foto No. 1, 1000x.5x, Determinación: carbohidratos (método de PAS), Fijada en: metanol absoluto 15 minutos, Cultivo de: 8 días, Montada en: resina



Foto No. 2, 1000x.5x, Determinación: glucógeno (método de Carmin de Best), Fijada en: metanol absoluto 30 minutos, Cultivo de: 5 días, Montada en: resina

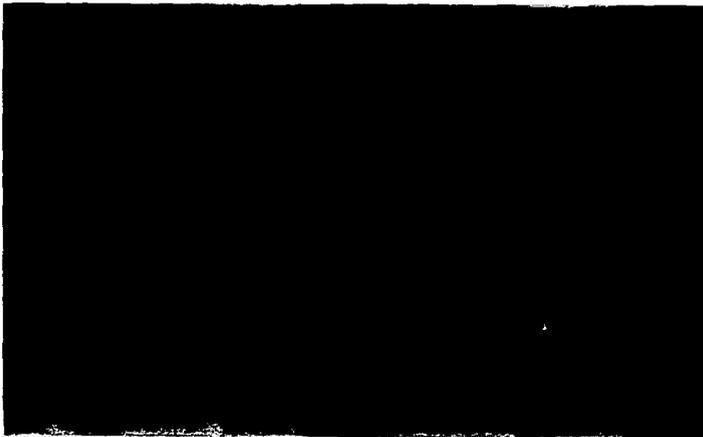


Foto No. 3, 1000x.2x, Determinación: glucógeno (método de Bauer-Feulgen), Fijada en: metanol absoluto 20 minutos a temperatura ambiente, Cultivo de: 15 días, Montada en: resina



Foto No. 4, 1000x.5x, Testigo de: carbohidratos (método de acetilación), Fijada en: metanol absoluto 30 minutos, Cultivo de: 6 días, Montada en: resina



Foto No. 5, 1000x.5x. Testigo de: carbohidratos (método digestión saliva-PAS), Fijada en: metanol absoluto 20 minutos, Cultivo de: 15 días, Montada en: resina



Foto No. 6, 1000x.5x. Testigo de: glucógeno (método digestión saliva-Carmin de Best), Fijada en: metanol absoluto 30 minutos, Cultivo de: 10 días, Montada en: resina

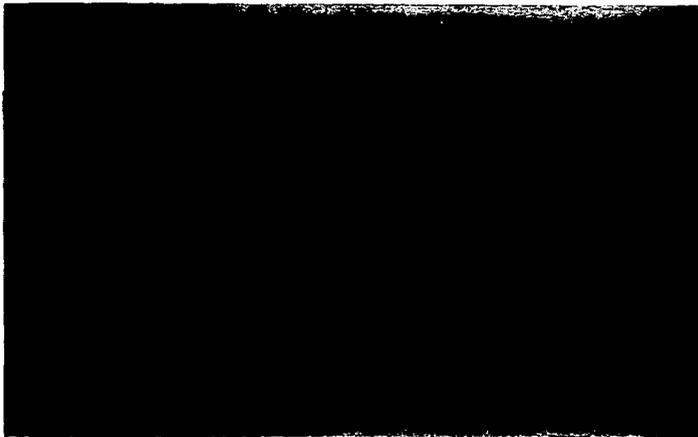


Foto No. 7, 1000x.2x. Determinación de: mucopolisacáridos neutros y ácidos (método de Mc Manus-Mowery), Fijada en: CJ 30 minutos, Cultivo de: 7 días, Montada en: resina

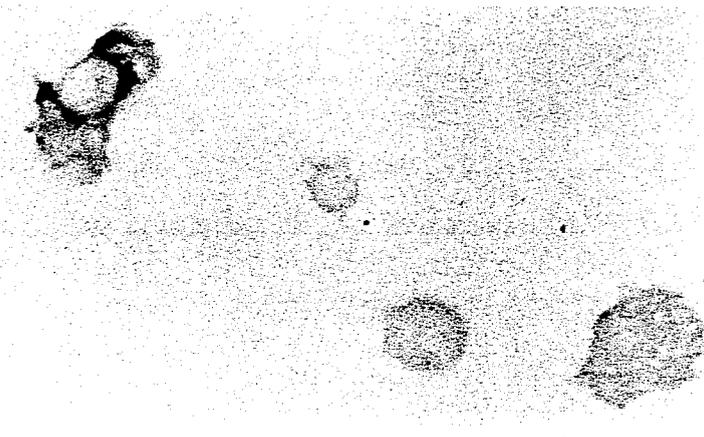


Foto No. 8, 1000x.2x. Determinación de: mucopolisacáridos (método de Spicer), Fijada en: CJ 20 minutos, Cultivo de: 5 días, Montada en: resina

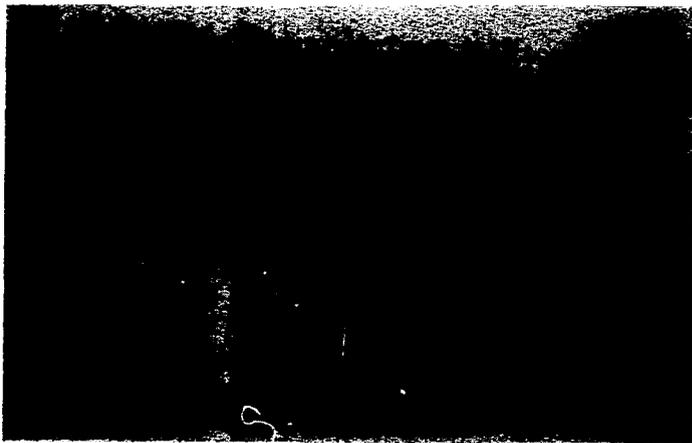


Foto No. 9. 1000x.5x, Testigo de: mucopolisacáridos (método digestión β -amilasa), Fijada en: CJ 30 minutos, Cultivo de: 7 días, Montada en: resina



Foto No. 10. 1000x.2x. Determinación de: ácidos nucleicos (método de Einarson). Fijada en: F10 30 minutos, Cultivo de: 7 días, Montada en: resina

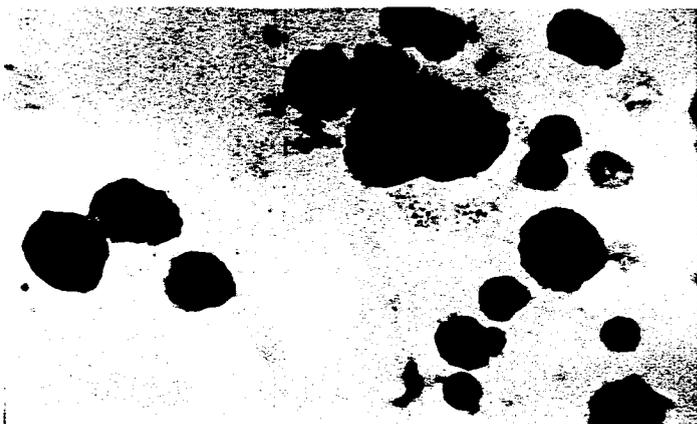


Foto No. 11. 1000x.2x, Determinación de: ácidos nucleicos (método de Azur II). Fijada en: F10 30 minutos, Cultivo de: 11 días, Montada en: resina

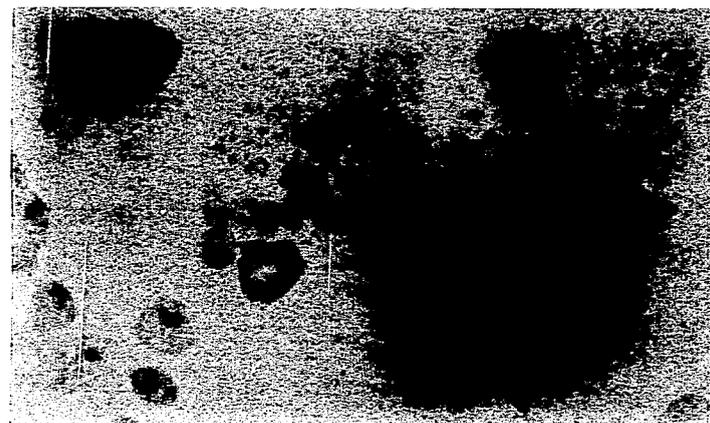


Foto No. 12. 1000x.2x. Determinación de: ácidos nucleicos (método de Feulgen). Fijada en: F10 30 minutos, Cultivo de: 11 días, Montada en: resina



Foto No. 13, 1000x.2x. Determinación de: lípidos neutros (método de Lillie-Burner). Fijada en: F10 30 minutos. Cultivo de: 12 días. Montada en: gelatina-glicerina

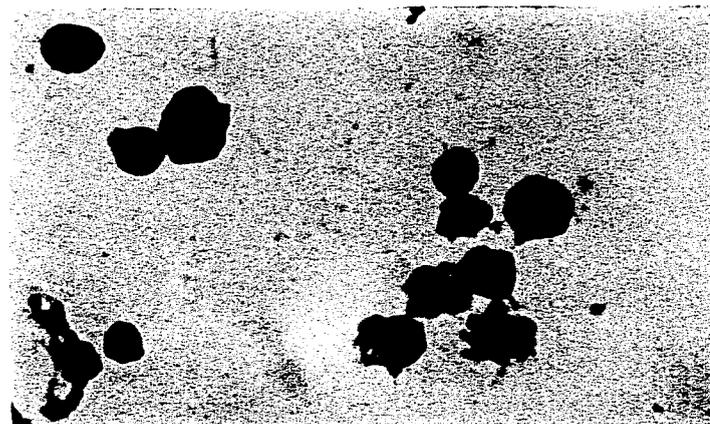


Foto No. 14, 1000x.2x. Testigo de: lípidos neutros (método de Fradsen metanol-clororoformo). Fijada en: F10 30 minutos. Cultivo de: 12 días. Montada en: gelatina-glicerina

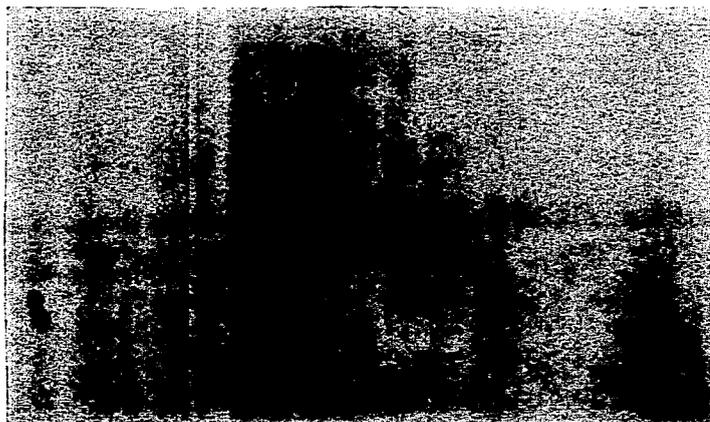


Foto No. 15, 1000x.2x. Determinación de: ácidos grasos (método Azul Nilo de Lillie). Fijada en: F10 20 minutos. Cultivo de: 7 días. Montada en: gelatina-glicerina

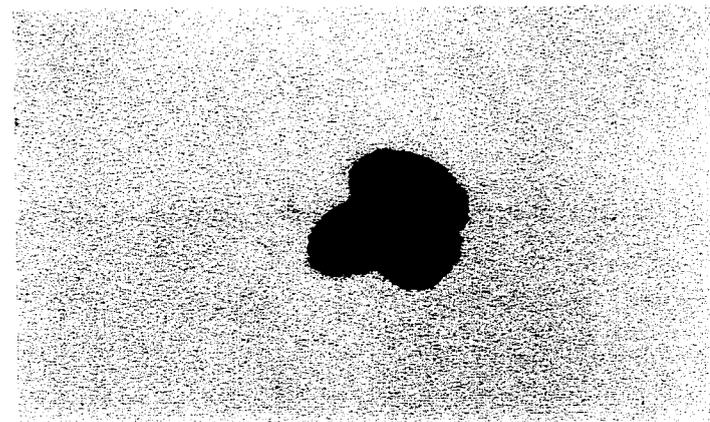


Foto No. 16, 1000x.2x. Determinación de: ácidos grasos (método de Holzinger). Fijada en: F10 20 minutos. Cultivo de: 5 días. Montada en: gelatina-glicerina



Foto No. 17, 1000x.2x. Testigo de: ácidos grasos (método de la acetona), Fijada en: F10 20 minutos, Cultivo de: 5 días. Montada en: gelatina-glicerina

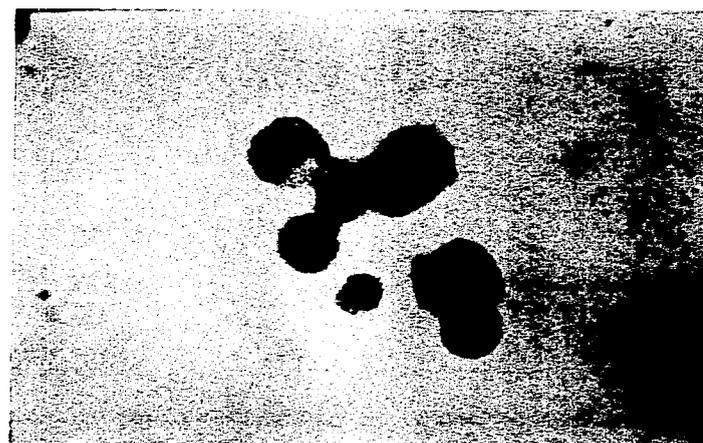


Foto No. 18, 1000x.2x, Determinación de: proteínas (método de Chapman), Fijada en: CJ 30 minutos, Cultivo de: 9 días. Montada en: resina



Foto No. 19, 1000x.2x, Determinación de: proteínas básicas (método de Alfert y Geschwind), Fijada en: FN 30 minutos, Cultivo de: 9 días. Montada en: resina

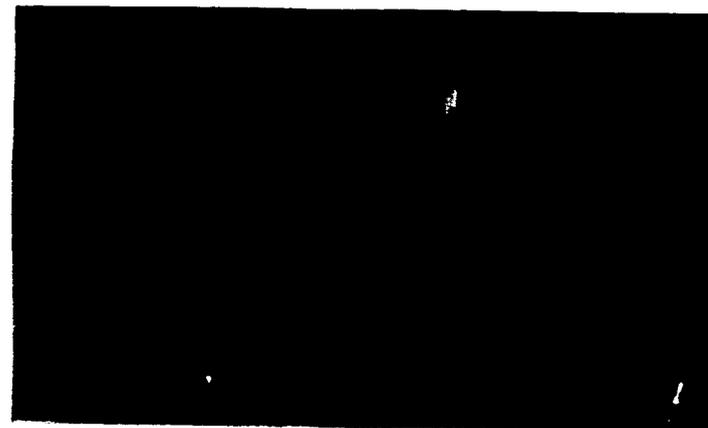


Foto No. 20, 1000x.2x. Cultivo fresco de A. culbertsoni con 6 días desarrollo, en medio axénico Bactocasitona.

II "SOLUCIONES"

Colorantes

Azul alciano 8 GX

Disolver en 100 ml de ácido acético al 3%, 1 g de azul alciano 8GX. Ajustar el pH a 2.5. Filtrar.

Azul alciano 8GX-ácido clorhídrico

Disolver en 100 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, 1 g de azul de alciano 8GX. Filtrar.

Azul de bromofenol

Disolver 10 g de cloruro mercúrico en 100 ml de alcohol de 95°. Después, incorporar 0.1 g de azul de bromofenol y agitar hasta que esté bien mezclado. Filtrar.

Azur II (Azur tipo B)

Disolver 25 mg de azur II (azur tipo B), en 100 ml de regulador Mc Ilvaine con pH 4 (ver apéndice II, soluciones reguladoras). Filtrar

Carmin de Best concentrado

Disolver en 60 ml de agua destilada, 5 g de cloruro de potasio y 1 g de carbonato de potasio. Una vez disuelto, agregar 2 g de Carmin de Best y llevar a ebullición por 5 minutos. Enfriar y filtrar. Al filtrado frío, agregar 25 ml de hidróxido de amonio concentrado, dejar madurar 24 horas. Guardar en refrigeración.

Galocianina-alumbre de cromo

Disolver en 50 ml de agua destilada 150 mg de galocianina. Agitar durante 1 minuto, filtrar y descartar el filtrado. El papel con el residuo, introducirlo en 50 ml de alumbre de cromo al 5% en agua destilada. Poner a ebullición en baño María por 30 minutos. Enfriar, filtrar y ajustar a un pH de 1.6 con ácido clorhídrico al 1%.

Rojo oleoso

Disolver 500 mg de rojo oleoso en 100 ml de alcohol isopropílico puro. Para uso inmediato tomar de ésta solución madre 25 ml y mezclar con 25 ml de agua destilada. Filtrar y mantener a 37°C al momento de usar.

Sulfato azul de Nilo

Disolver 50 mg de sulfato de azul de Nilo en 99 ml de agua destilada, y posteriormente agregar con cuidado 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitar hasta que este bien incorporado y filtrar.

Verde rápido

Disolver 500 mg de verde rápido en 100 ml del alcohol etílico de 70°. Filtrar.

Fijadoras

Alcohol-ácido (AA)

Mezclar 1 parte de ácido acético glacial con 2 partes de etanol absoluto.

Curney-Jones (CJ)

Mezclar 10 ml de ácido acético glacial, 60 ml de alcohol etílico absoluto y 30 ml de cloroformo anhidro.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Formol 10% (F 10)

Mezclar 10 ml de formol concentrado (38-40%) con 90 ml de agua destilada.

Formol-alcohol (FA)

Disolver 50 mg de acetato de calcio en una mezcla de 90 ml de alcohol etílico absoluto y 10 ml de formol concentrado (38-40%).

Formol calcio (FCa)

Disolver 1.1 g de cloruro de calcio anhidro en una mezcla de 90 ml de agua destilada y 10 ml de formol concentrado (38-40%).

Formol neutro o amortiguado (FN)

Disolver 0.4 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado y 0.65 g de fosfato disódico anhidro en 90 ml de agua destilada. Una vez disueltos, agregar 10 ml de formol concentrado (38-40%) y mezclar bien.

Zenker

Disolver en 100 ml de agua destilada 5 g de cloruro de mercurio, 2.5 g de dicromato de potasio y 1 g de sulfato de sodio. De ésta solución madre, tomar 95 ml y mezclarlos con 5 ml de ácido acético glacial, al momento de usarse.

Reguladoras

Solución reguladora de citrato-fosfato pH 8-8.1

Disolver 2.10 g de ácido cítrico monohidratado en 100 ml de agua destilada. Aparte, disolver 2.839 g de fosfato disódico anhidro en 100 ml de agua destilada.

Tomar 2.75 ml de la solución de ácido cítrico y mezclarlos con 97.25 ml de la solución de fosfato disódico. Ajustar pH a 8-8.1.

Solución reguladora de fosfatos 0.02 M pH 6.0

Disolver en 100 ml de agua destilada 2.75 g de fosfato monosódico anhidro. Aparte, disolver en 100 ml de agua destilada 2.83 g de fosfato disódico anhidro.

De la solución de fosfato monosódica tomar 46 ml y mezclarlos con 4 ml de la solución de fosfato disódico; agregar después 50 ml de agua destilada. Filtrar y ajustar el pH a 6.0.

Solución reguladora de fosfatos 0.02 M pH 6.4

Disolver 2.84 g de fosfato disódico anhidro en 100 ml de agua destilada. Aparte, disolver 2.76 g de fosfato monosódico monohidratado en 100 ml de agua destilada.

Tomar 26.5 ml de la solución de fosfato disódico y mezclarlos con 73.5 ml de la solución de fosfato monosódico y llevar a un volumen de 200 ml con agua destilada. Filtrar y ajustar el pH a 6.4.

Solución reguladora de Na Ilvaine

Mezclar 24.6 ml de ácido cítrico 0.1 M con 15.4 ml de fosfato de potasio dibásico anhidro 0.2 M.

Otras soluciones

Diferenciador para el Carmin de Best

Mezclar 8 ml de alcohol etílico absoluto, 4 ml de alcohol metílico absoluto y 10 ml de agua destilada.

Reactiva de Schiff (de De Tonnai)

Disolver 1 g de fucsina básica en 200 ml de agua destilada hirviendo. Agitar 5 minutos y enfriar exactamente a 50°C. Filtrar y agregar al filtrado 20 ml de ácido clorhídrico 1 N (aproximadamente 86 ml/1000 ml). Enfriar a 25°C y agregar 1 g de metabisulfito de potasio (o sodio). Guardar en la oscuridad durante 14-24 hr. Agregar 2 g de carbón activado y agitar durante 1 minuto. Filtrar. Mantener en la oscuridad a 4°C. Dejar que alcance la temperatura del laboratorio antes de usar. La solución debe ser incolora o muy ligeramente amarillenta.

Solución acetato de cobre

Disolver 5 mg de acetato de cobre, en 100 ml de agua destilada.

Solución ácido rubetánico-alcohol absoluto

Disolver 50 mg de ácido rubetánico, calentando ligeramente en 35 ml de alcohol etílico absoluto. Después agregar 15 ml de agua destilada y mezclar bien.

Solución colorante de Carmin de Best

Mezclar 15 ml del colorante Carmin de Best concentrado con 12.5 ml de amoníaco concentrado y 12.5 ml de alcohol metílico absoluto. Filtrar.

Nota: Esta solución dura solamente de 2-3 semanas y sólo se usa una vez.

Solución de anhídrido acético-piridina

Mezclar 16 ml de anhídrido acético con 24 ml de piridina anhidra.

Solución de β amilasa-fosfato de sodio salino

Disolver en 50 ml de solución reguladora de fosfato con pH 6 (0.02 M) (ver apéndice II, soluciones reguladoras), 400 mg de cloruro de sodio y 50 mg de β -amilasa.

Solución de E.D.T.A. disódico (etilendiamino tetraacetato disódico)

Disolver 50 mg de E.D.T.A. disódico en 50 ml de agua destilada. Ajustar pH a 7.1

Solución de metabisulfito de potasio o sodio

Mezclar 5 ml de metabisulfito de potasio o sodio al 10%, 5 ml de ácido clorhídrico 1 N y 90 ml de agua destilada.

Solución de verde rápido

Disolver 0.1 g de verde rápido FCF en 100 ml de solución reguladora de citrato fosfato, a pH 8-8.1 (ver apéndice II, soluciones reguladoras). Filtrar.

III "LAVADO DE MATERIAL DE VIDRIO PARA EL MANEJO DE *Acanthamoeba*"

Método para lavar portobjetos y cubreobjetos

1. Sumergir el material en una solución de ácido clorhídrico al 5%, por un día.
2. Pasar a una solución de hipoclorito de sodio al 3% aproximadamente, de 2-3 horas.
3. Después introducir a una solución de Tween 80 al 1%, más o menos 1 hora.
4. Enjuagar bien el material con agua destilada.
5. Secar con un trapo limpio sin pelusa.

Método para lavar tubos

1. Lavar los tubos con agua de la llave.
2. Introducir en una solución de ácido clorhídrico al 1%, por 1 día.
3. Enjuagar bien con agua de la llave.
4. Después enjuagar bien con agua destilada.
5. Dejar escurrir hasta que estén secos.

IV "CULTIVO DE *Acanthamoeba*"

Medio de cultivo Bactocastone, Disco

Disolver en 100 ml de agua destilada 2 g de medio de cultivo Bactocastone y esterilizar a 1 kg/cm² (15 lb pulg²) durante 15 minutos. Mantener en refrigeración hasta que se ocupe.

Medio de cultivo de NNE

Disolver en 100 ml de agua destilada 1.66 g de biotriptasa, 0.27 g de glucosa, 0.15 g de fosfato de sodio dibásico anhidro y 0.09 g de fosfato de potasio monobásico anhidro. Esterilizar a 1 kg/cm² (15 lb pulg²) durante 15 minutos. Mantener en refrigeración hasta que se ocupe.

Método de cultivo de amibas

1. A un tubo limpio de (12 x 1.5 cm), con tapón de rosca, agregar 2.7 ml de medio de cultivo.
2. Esterilizar a 1 Kg/cm² (15 lb pulg²) durante 15 min.
3. Guardar en refrigeración hasta el momento en que se vaya a sembrar.
4. Dejar que alcancen la temperatura ambiente antes de sembrar.
5. Para las resiembras, en condiciones estériles, agregar 0.5 ml de suero fetal estéril de bovino. Después agregar más o menos 8 gotas del medio de cultivo con amibas.
6. Incubar a 28°C, aproximadamente 7 días.