



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DIVERSIDAD MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA LIBRE EN
DIFERENTES ECOSISTEMAS DEL ESTADO DE MORELOS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

Juan Manuel Zurita Artaloitia

Director de tesis:
Pablo Vinuesa Fleischmann
Centro de Ciencias Genómicas - UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2022

Dedicatoria:

A mis padres Salvador y Begoña, por su amor incondicional e incansable apoyo en todos mis objetivos académicos y personales.

A Juancho, Santiago, Pepo, Joey, Julio, Karim, Toño, Valeria y Andrea, por los recuerdos y su amistad a lo largo de años.

A Argui, Iru, Maika, Zuri y Neska, por su compañía y cariño.

Agradecimientos:

A mi director de tesis Pablo, por confiar en mí e impulsarme a constantemente mejorar mi desempeño.

Al grupo de investigación del Dr. Vinuesa y al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, por brindarme toda la asistencia necesaria para poder completar mi proyecto.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y mis profesores por educarme y ofrecerme las herramientas necesarias para mi formación académica.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
2.	Marco teórico.....	2
2.1.	Diversidad y distribución de AVL	2
3.	Antecedentes	6
3.1.	Análisis de diversidad de AVL en México	6
3.2.	Análisis de diversidad de AVL en Morelos	8
4.	Justificación	9
5.	Objetivo	10
5.1.	Objetivo general.....	10
5.2.	Objetivos particulares.....	10
6.	Materiales y métodos	11
6.1.	Colecta de muestras en campo	11
6.1.1.	Sitios de muestreo	11
6.1.2.	Método de muestreo	13
6.2.	Procedimiento de laboratorio	14
6.2.1.	Aislamiento de amebas de vida libre	14
6.2.2.	Extracción de DNA	14
6.2.3.	Amplificación de genes 18S rRNA de amebas de vida libre.....	15
6.3.	Análisis de datos	17
6.3.1.	Ensamblado y generación de alineamientos múltiples	17
6.3.2.	Análisis filogenético de genes 18S rRNA de AVL	18
6.3.3.	Caracterización de morfotipo de los aislados	18
6.4.	Análisis de asociación entre variables ambientales y linajes de AVL.....	19
7.	Resultados.....	21
7.1.	Lista de aislados recuperados en el estudio.....	21
7.2.	Evaluación de 5 pares de primers para amplificar el gen 18SrRNA	22
7.3.	Distancias pareadas dentro de los grupos de similitud de Blastn	25
7.4.	Selección de modelo de substitución.....	28
7.5.	Filogenia de máxima verosimilitud de las AVL recuperadas en el estudio.....	29
7.6.	Análisis de morfotipos	31
7.7.	Asociación estadística entre variables genéticas y ecológicas	34
8.	Discusión	36
9.	Conclusiones.....	44
10.	Literatura citada.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ECOSISTEMAS TERRESTRES, ACUÁTICOS Y ARTIFICIALES DE LOS QUE SE HAN AISLADO AVL.....	5
TABLA 2. TAXONOMÍA DE AVL REPORTADAS EN MÉXICO DE ACUERDO CON LA LITERATURA CONSULTADA Y RECLASIFICADA EN ESTE TRABAJO SEGÚN EL ESTUDIO DE ADL ET AL. 2018.....	7
TABLA 3. TAXONOMÍA DE AVL REPORTADAS EN MORELOS DE ACUERDO CON LA LITERATURA CONSULTADA Y RECLASIFICADA EN ESTE TRABAJO SEGÚN EL ESTUDIO DE ADL ET AL. 2018.....	8
TABLA 4. TRABAJOS RELACIONADOS A LA BÚSQUEDA DE DIVERSIDAD DE AVL AMBIENTALES EN MÉXICO.....	9
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS Y GEOGRÁFICAS DE LOS 8 SITIOS DE MUESTREO.....	12
TABLA 6. PRIMERS EMPLEADOS EN LA LITERATURA PARA REALIZAR AMPLIFICACIONES TOTALES O PARCIALES DE 18S rRNA EN AVL.....	15
TABLA 7. LISTA DE AISLADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO, SU FECHA DE COLECTA Y SUS COORDENADAS DE MUESTREO.....	21
TABLA 8. LONGITUD DE LAS SECUENCIAS EN LOS ALINEAMIENTOS DE CADA GRUPO DE SIMILITUD.....	25
TABLA 9. DISTANCIAS P PAREADAS ESTIMADAS ENTRE LAS SECUENCIAS DEL GRUPO DE SIMILITUD ACANTHAMOEBA. EL GRUPO EXTERNO ESTÁ MARCADO EN NEGRITAS.....	26
TABLA 10. DISTANCIAS P PAREADAS ESTIMADAS ENTRE LAS SECUENCIAS DEL GRUPO DE SIMILITUD TETRAMITUS. EL GRUPO EXTERNO ESTÁ MARCADO EN NEGRITAS.....	26
TABLA 11. DISTANCIAS P PAREADAS ESTIMADAS ENTRE LAS SECUENCIAS DEL GRUPO DE SIMILITUD VERMAMOEBIA (LAS SECUENCIAS IDÉNTICAS ESTÁN AGRUPADAS EN UNA MISMA FILA). EL GRUPO EXTERNO ESTÁ MARCADO EN NEGRITAS.....	26
TABLA 12. DISTANCIAS P PAREADAS ESTIMADAS ENTRE LAS SECUENCIAS DEL GRUPO DE SIMILITUD NAEGLERIA (LAS SECUENCIAS IDÉNTICAS ESTÁN AGRUPADAS EN UNA MISMA FILA). EL GRUPO EXTERNO ESTÁ MARCADO EN NEGRITAS.....	27
TABLA 13. MEJORES MODELOS DE SUSTITUCIÓN ORDENADOS SEGÚN EL CRITERIO DE INFORMACIÓN BAYESIANO EN JMODELTEST.....	29
TABLA 14. LAS ESTIMACIONES DE LOS VALORES E IMPORTANCIA DE LOS PARÁMETROS CALCULADAS POR MEDIO DEL CRITERIO DE INFORMACIÓN BAYESIANO EN JMODELTEST.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE AVL, SEGÚN LAS ESPECIES REPORTADAS EN MÉXICO EN LA BIBLIOGRAFÍA, BASADA EN LA ÚLTIMA REVISIÓN DE CLASIFICACIÓN, NOMENCLATURA Y DIVERSIDAD DE EUCARIOTAS (ADL ET AL. 2018).....	4
FIGURA 2. VISTA AÉREA DE LA SECCIÓN DEL ESTADO DE MORELOS QUE ABARCA LOS 8 SITIOS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO, SUS ECOSISTEMAS Y EL HÁBITAT EN EL CUAL SE REALIZÓ EL MUESTREO. IMAGEN OBTENIDA DE GOOGLE EARTH.....	12
FIGURA 3. MAPA DEL GEN 18S rRNA DE LA AVL MODELO ACANTHAMOEBA CASTELLANII NEFF CON LOS PRIMERS DISPONIBLES EN EL LABORATORIO QUE PUEDEN SER EMPLEADOS EN AVL Y EL RANGO DE AMPLICONES QUE SE GENERA CON CADA PAR EN ESTA. GENERADO EN SNAPGENE® SOFTWARE (DE GSL BIOTECH; DISPONIBLE EN SNAPGENE.COM).....	16
FIGURA 4. LOS 16 MORFOTIPOS DE AMEBAS DE VIDA LIBRE (SMIRNOV Y BROWN 2004).....	20
FIGURA 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA CON LOS PRODUCTOS DE PCR DE LAS PRIMERAS 13 CEPAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO AL EMPLEAR LOS PRIMERS JDP1 Y JDP2 . SE INCLUYÓ UNA ESCALERA DE 1Kb.	22
FIGURA 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA CON LOS PRODUCTOS DE PCR DE LAS PRIMERAS 13 CEPAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO AL EMPLEAR LOS PRIMERS ERIB1 Y ERIB10 . SE INCLUYÓ UNA ESCALERA DE 1Kb.	22
FIGURA 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA CON LOS PRODUCTOS DE PCR DE LAS PRIMERAS 13 CEPAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO AL EMPLEAR LOS PRIMERS RIBa Y RIBb . SE INCLUYÓ UNA ESCALERA DE 1Kb.	23
FIGURA 8. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA CON LOS PRODUCTOS DE PCR DE LAS PRIMERAS 13 CEPAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO AL EMPLEAR LOS PRIMERS NA1 Y NA2 . SE INCLUYÓ UNA ESCALERA DE 1Kb.....	23
FIGURA 9. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS CON LAS 34 CEPAS AL EMPLEAR LOS PRIMERS F-566 Y R-1200 . SE INCLUYÓ UNA ESCALERA DE 1Kb. LA FIGURA 9 A) MUESTRA LAS PRIMERAS 19 MUESTRAS. LA FIGURA 9 B) MUESTRAS LAS SIGUIENTES 15 MUESTRAS.	24
FIGURA 10. REGIÓN 400PB A 440PB DE LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS EN LA SECUENCIACIÓN DEL ESTUDIO VISUALIZADOS EN SNAPGENE® SOFTWARE. A) SECUENCIA REVERSE DE LA CEPA DR6 B) SECUENCIA REVERSE DE LA CEPA DR5	25
FIGURA 11. VISTA PARCIAL DEL ALINEAMIENTO COMPLETO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO Y SUS REFERENCIAS, VISUALIZADO EN SEAVIEW (GOUY ET AL., 2010).	28
FIGURA 12. ESTIMA FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSIMILITUD BAJO EL MODELO TRN+G (LNL = -4675.42), EMPLEANDO PHYML (BÚSQUEDA CON ALGORITMO BEST) Y MAPEO QUE MUESTRA EL ORIGEN DE LA SECUENCIA, GÉNERO, LUGAR Y ECOSISTEMA DE AISLAMIENTO. SE PUEDEN OBSERVAR DOS CLADOS CON UN ALTO SOPORTE. EL CLADO A CORRESPONDE AL SUPERGRUPO AMOEBOZOA Y EL CLADO B CORRESPONDE AL SUPERGRUPO DISCOBA. ÁRBOL EDITADO EN ITOL (LETUNIC Y BORK 2019).....	30
FIGURA 13. MORFOTIPO ACANTHOPODIAL DEL AISLADO 4MJS2 , IDENTIFICADO MOLECULARMENTE COMO ACANTHAMOEBA.....	32
FIGURA 14. MORFOTIPO MONOTÁCTICO DEL AISLADO FCA1 , IDENTIFICADO MOLECULARMENTE COMO VERMAMOEBA.....	32
FIGURA 15. MORFOTIPO ERUPTIVO DEL AISLADO TS3-1 , IDENTIFICADO MOLECULARMENTE COMO NAEGLERIA.	33
FIGURA 16. MORFOTIPO ERUPTIVO DEL AISLADO TS37-1 , IDENTIFICADO MOLECULARMENTE COMO TETRAMITUS.....	33
FIGURA 17. ESQUEMA QUE MUESTRA LA DIVERSIDAD TAXONÓMICA DE LOS GÉNEROS ENCONTRADOS (Y SUS GRUPOS EXTERNOS) ADEMÁS DE SU ASOCIACIÓN CON LOS AMBIENTES DE LOS QUE FUERON AISLADOS.....	34
FIGURA 18. PRUEBA DE X^2 DE TRIPLE VÍA DE LA ASOCIACIÓN Y SIGNIFICANCIA ENTRE LOS GÉNEROS DE AVL ENCONTRADOS EN EL ESTUDIO, SUS HÁBITATS Y ECOSISTEMAS DE ORIGEN MEDIDA COMO RESIDUOS DE PEARSON. LAS BARRAS INDICAN LOS VALORES DE LOS RESIDUOS DE PEARSON PARA CADA CONTRASTE. EL COLOR DE LA BARRA INDICA LA SIGNIFICANCIA DEL CONTRASTE ESPECÍFICO, SU ALTURA EL VALOR DEL RESIDUO, SU ANCHO EL TAMAÑO DE LA MUESTRA Y EL SENTIDO SI LA DESVIACIÓN ES POSITIVA O NEGATIVA.	35
FIGURA 19. DATOS REFERENTES AL MUESTREO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LOS ANTECEDENTES MEXICANOS CONSULTADOS. PUEDEN SER CONSULTADOS EN LA TABLA 3.....	42
FIGURA 20. ENTRADAS EN PUBMED A LO LARGO DE LOS ÚLTIMOS 50 AÑOS QUE MUESTRAN LA CANTIDAD DE ARTÍCULOS ENCONTRADOS PARA CADA UNO DE LOS 4 GÉNEROS ENCONTRADOS EN ESTE ESTUDIO.	43

1. Introducción

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo polifilético de protistas heterótrofos. Los taxones de este grupo presentan un tipo de organización celular “ameboide” (del griego *amoibe*, que significa “cambio”) y son capaces de completar su ciclo de vida sin la necesidad de invadir a un hospedero, aunque algunas especies pueden ser parásitas facultativas (Khan 2015). Se encuentran en todo tipo de ambientes terrestres y aéreos, pero principalmente habitan en ecosistemas acuáticos (Rodríguez-Zaragoza 1994). Todas las AVL presentan un estado activo (trofozoíto), la mayoría, presentan un estado latente (quiste) (Smirnov y Brown 2004) y algunas especies de ciertos géneros, como *Naegleria*, *Tetramitus* y *Willaertia* pueden presentar estados flagelares (De Jonckheere 2014).

Los protistas han estado presentes en el planeta desde hace más de 1,500 millones de años (Javaux *et al.* 2001), lo que se refleja en su extensa distribución a nivel global, en una amplia diversidad de ecosistemas (Geisen *et al.* 2014).

Estos organismos solían ubicarse en un grupo taxonómico monofilético, debido a sus aspectos morfológicos (Levine *et al.* 1980), por lo que la mayoría de las guías de identificación y clasificación requieren de microscopía óptica y electrónica (Page 1976 y 1988). Años después, estudios moleculares mostraron claras discrepancias entre los sistemas de clasificación morfológica contra los análisis de secuencias (Clark y Cross 1988; Bolivar *et al.* 2001), incluyendo las influyentes llaves morfológicas de Page (Brown y De Jonckheere 1999). Debido a esto, ya no se consideran suficientes las características morfológicas para identificar aislados a niveles de género y especie (Smirnov y Brown 2004). Los nuevos sistemas de clasificación se basan principalmente en secuencias de genes marcadores (Adl *et al.* 2005).

En México se sigue empleando la clasificación morfológica como principal sistema de identificación en los trabajos de diversidad, lo cual, como se mencionó anteriormente, no es recomendado para trabajar con estos organismos. Este trabajo busca implementar estándares modernos de identificación molecular de AVL recuperadas de diferentes hábitats y ecosistemas en el Estado de Morelos.

2. Marco teórico

2.1. Diversidad y distribución de AVL

Las amebas de vida libre forman un grupo definido únicamente por su tipo de movimiento y organización celular (Smirnov y Brown 2004), pero evidencia molecular reciente demuestra que no presentan una estrecha relación filogenética, por lo que se postula que la forma de vida amoeboide ha surgido de manera independiente en varias ocasiones a través de la historia evolutiva de los eucariontes (Ligrone 2019). Por ser polifilético, el estudio taxonómico del grupo es complejo. En respuesta a esto, recientemente se han publicado dos nuevas aproximaciones para abordar la taxonomía de los protistas.

La primera propuesta fue realizada por la Sociedad de Protozoólogos en 2005. Este trabajo toma en cuenta los análisis moleculares, estudios morfológicos modernos y aspectos bioquímicos para definir a los taxones. Lo interesante de este sistema de clasificación es que no utiliza la jerarquía linneana de grupo taxonómicos. En vez de ello, emplea viñetas para organizar a los grupos, sin necesidad de acomodarlos en un rango taxonómico, considerando que un nuevo descubrimiento o reclasificación de un taxón podría ocasionar un efecto en cascada que, de utilizar la clasificación convencional, causaría problemas de reorganización. Esta clasificación ha sido actualizada 3 veces, siendo la más reciente de 2018 (Adl *et al.* 2005 y 2018).

Los trabajos de Adl *et al.* fueron también una actualización al sistema de clasificación de protistas realizado anteriormente por la Sociedad de Protozoólogos en 1980, el cual únicamente contemplaba fenotipos fisiológicos y morfológicos para la agrupación taxonómica y consideraba a las amebas como un solo grupo debido a su desplazamiento amoeboide, dentro de la superclase Rhizopoda (Levine *et al.* 1980).

La segunda propuesta pertenece al grupo de Ruggiero *et al.* y fue publicada en 2015. Esta ordena a los protistas bajo la jerarquía taxonómica de grupos Linneanos (reino, filo, clase, orden...). Esta clasificación no es filogenética ni evolutiva y no trata de serlo. Lo que busca es simplificar el estudio de los protistas y clasificarlos según su uso común o práctico (Ruggiero *et al.* 2015).

Para este trabajo se decidió implementar la clasificación sugerida por la sociedad de protozoólogos, porque el sistema de viñetas es el que presenta una sistemática más realista y útil a largo plazo para trabajar con organismos que tienen una taxonomía inestable como las AVL. Para realizar un mapa taxonómico con algunos grupos de AVL (Figura 1) que se podrían llegar a encontrar en el estudio, se consultó bibliografía en torno a estudios de diversidad ambiental en México, reacomodando los géneros descritos con base en el reciente trabajo de Adl *et al.* en 2018.

Para la identificación molecular de AVL en estudios de diversidad, el marcador más utilizado es el gen 18S rRNA, el cual es considerado un marcador idóneo para identificar con precisión a estos organismos a nivel de género (Nassonova *et al.* 2010). Otra consideración importante para emplear este gen es que en la base de datos del NCBI son las secuencias más abundantes de AVL.

El estudio del 18S rRNA ha logrado revelar problemas y limitaciones en la identificación morfológica de AVL, demostrando que se trata de un grupo polifilético distribuido en diferentes ramas del árbol eucariota (Clark y Cross 1988; Zettler *et al.* 2000; Bolivar *et al.* 2001). Además, se ha reportado que algunos aislados que muestran ser morfológicamente similares poseen diferencias genéticas importantes. Del mismo modo, algunos aislados que se pueden distinguir claramente de manera morfológica, presentan pocas diferencias genéticas (Smirnov *et al.* 2002, 2007). Las repercusiones de años de estudio con sistemas de clasificación morfológicos se ven reflejadas en la necesidad de reclasificar géneros y especies en trabajos recientes (Smirnov y Kudryavtsev 2005; Smirnov *et al.* 2011; Brown *et al.* 2011, Tice *et al.* 2016).

Incluso existe controversia dentro de ciertos géneros, como en *Acanthamoeba*, en donde se encuentran 24 especies descritas. No obstante, algunos expertos sugieren que no deberían de continuar siendo clasificadas como especies y que en su lugar se deberían clasificar en “genotipos” (de los cuales existen alrededor de 20), los cuales están organizados con base en la secuencia “ASA.S1” (*Acanthamoeba* specific amplicon), localizada dentro del gen 18S rRNA y que ha sido útil para la identificación de estos grupos (Schroeder *et al.* 2001; Jercic *et al.* 2019). Dados los problemas taxonómicos y de identificación de AVL, hablar de su distribución es complicado, considerando también su aparente ubiquidad (Tabla 1) y la carencia de datos moleculares.

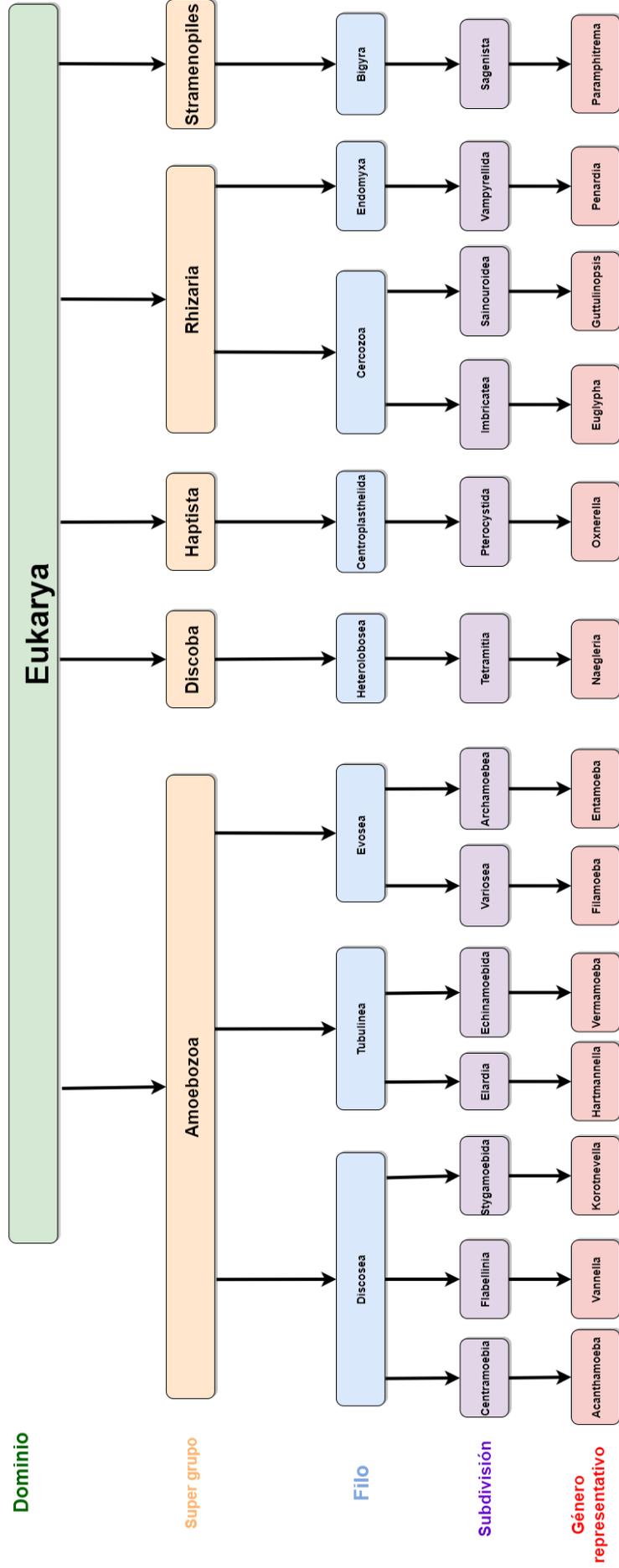


Figura 1. Diversidad filogenética de AVL, según las especies reportadas en México en la bibliografía, basada en la última revisión de clasificación, nomenclatura y diversidad de eucariotas (Adl *et al.* 2018).

Tabla 1. Ecosistemas terrestres, acuáticos y artificiales de los que se han aislado AVL.

Ecosistema	Referencia
Desierto	Dumack <i>et al.</i> 2016
Permafrost	Shmakova y Rivkina 2015
Micorrizosfera	Timonen <i>et al.</i> 2004
Pantanos	Seneviratna y Waidyasekera 1995
Sedimentos marinos	Butler y Rogerson 2000
Mar abierto	Vørs 1992; Murzov y Caron 1996
Manglares	Rogerson y Gwaltney 2000
Lagunas	Garstecki y Arndt 2000
Lagos salinos	Hauer <i>et al.</i> 2001; Rogerson y Hauer 2002
Lagos ácidos	Bell y Weithoff 2008
Aguas termales	Baumgartner <i>et al.</i> 2003
Estuarios	Rogerson y Laybourn-Parry 1992
Agua marina y continental del antártico	Tong <i>et al.</i> 1997
Albercas públicas	Vesaluoma <i>et al.</i> 1995
Bañeras termales	Scaglia <i>et al.</i> 1983
Plantas de tratamiento de agua	García <i>et al.</i> 2013
Sistemas de aire acondicionado	Gabr <i>et al.</i> 2020
Sistemas de conducción de agua potable	Taravaud <i>et al.</i> 2018; Shaheen <i>et al.</i> 2019
Camillas para odontología	Singh y Coogan 2005
Sistemas de agua domésticos	Jeong y Yu 2005
Estaciones de lavado de ojos	Paszko-Kolva <i>et al.</i> 1991
Sistemas de conducción de agua de hospital	Thomas <i>et al.</i> 2006

Se discute la existencia de una relación entre el tipo de hábitat y la diversidad específica, debido a que algunos géneros se han aislado en ambientes contrastantes (Smirnov y Brown 2004). Otro argumento que sugiere su ubicuidad es el estudio en aislados de géneros como *Naegleria* y *Acanthamoeba*, que, a pesar de haber sido encontrados en países mutuamente distantes, presentan una alta similitud genética (Pélandakis *et al.* 1998; Geisen *et al.* 2014). Sin embargo, también existen especies que solo crecen en ambientes específicos, por ejemplo: a altas temperaturas o a altos niveles de salinidad (Baumgartner *et al.* 2009; Schulz *et al.* 2015). Por lo tanto, es razonable asumir que existan especies generalistas y cosmopolitas, mientras que haya otras que presenten una mayor especificidad para ciertos ambientes.

3. Antecedentes

Los trabajos que se consultaron fueron realizados con aislados mexicanos obtenidos del ambiente. No se consideraron los aislados clínicos ni los que no hayan sido publicados en artículos.

3.1. Análisis de diversidad de AVL en México

El primer estudio realizado en el país fue en 1841, por el alemán Christian Gottfried Ehrenberg, el cual reportó los géneros *Arcella* y *Diffugia* (Esto se encuentra reportado en López-Ochoa y Madrazo 1979).

A partir de entonces fue hasta la década de 1980 que el grupo de Fermín Rivera, de la FES-Iztacala, realizó 3 estudios de diversidad de AVL: en albercas deportivas, en la atmósfera de la CDMX y en aguas termales en el Estado de Hidalgo (Rivera *et al.* 1983, 1987, 1989).

Guzmán-Fierros y Lares-Villa realizaron un estudio en sitios recreativos del Estado de Sonora, con el objetivo de obtener aislados del género *Naegleria* (Guzmán-Fierros *et al.* 2008).

Lares-Jiménez ha publicado 2 trabajos de diversidad, ambos realizados en el balneario “Agua Caliente”, en el Estado de Sonora, en los años 2009 y 2018. El primer estudio empleó identificación morfológica, pero el segundo empleó 3 juegos de primers, uno de ellos dirigido a eucariotas en general, para realizar una identificación a nivel molecular (Lares-Jiménez y Lares-Villa 2009; Lares-Jiménez *et al.* 2018).

Ramírez ha realizado 4 estudios alrededor del Valle de México, dos de ellos en cuerpos de agua de Morelos, uno de ellos en una planta tratadora de agua en el Estado de México y el otro se realizó tomando partes de lirio acuático del lago de Xochimilco en CDMX (Ramírez *et al.* 2009, 2010, 2014 y 2016).

El grupo de Patricia Bonilla Lemus contribuyó con 3 reportes de diversidad de AVL en México, alrededor de la CDMX, el primero de ellos en sistemas de conducción de agua en hogares de la CDMX enfocado en encontrar al género *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto. Los otros dos fueron realizados en cuerpos de agua alrededor de la Cuenca del Valle de México. Los primeros dos únicamente emplearon claves morfológicas para su identificación y el último, en colaboración de Andrade, empleó diferentes juegos de primers 18SrRNA género específicos. En

2020 Bonilla-Lemus realizó un reporte de diversidad enfocado únicamente en el género *Naegleria* en Mexicali (Bonilla-Lemus *et al.* 2010, 2014 y 2020; Andrade *et al.* 2015).

El grupo de Elvia Gallegos-Neyra, ha publicado dos estudios y una revisión referentes a diversidad de AVL, el primer estudio fue realizado en un arrecife y en una planta termoeléctrica del Estado de Veracruz y el segundo en las “cascadas de sal” localizadas en el Estado de Oaxaca. Las amebas de ambos estudios fueron identificadas con claves morfológicas (Gallegos-Neyra *et al.* 2018 y 2019). Para la revisión, se tomaron en cuenta estudios formales (artículos y libros) e informales (tesis) para intentar mostrar un panorama general de la diversidad de amebas en México. En este reportan 315 especies, siendo los géneros más recurrentes: *Diffugia*, *Arcella*, *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Amoeba*, *Naegleria*, *Mayorella*, *Euglypha*, *Centropyxis* y *Hartmannella*, en ese orden. Además, mencionan que existen 9 entidades federativas para las que aún no se reporta la diversidad de amebas (Gallegos-Neyra *et al.* 2014). La Tabla 2 muestra la diversidad reportada en México a partir de los estudios citados anteriormente.

Tabla 2. Taxonomía de AVL reportadas en México de acuerdo con la literatura consultada y reclasificada en este trabajo según el estudio de Adl *et al.* 2018.

Super grupos				Género
Amoebozoa	Discosea	Centramoebia	Acanthopodida	<i>Acanthamoeba</i>
				<i>Balamuthia</i>
		Flabellinia	Vannellida	<i>Clydonella</i>
				<i>Vannella</i>
			Thecamoebida	<i>Thecamoeba</i>
				<i>Sappinia</i>
			Dactylopodida	<i>Vexillifera</i>
				<i>Paramoeba</i>
				<i>Korotnevela</i>
			Dermamoebida	<i>Mayorella</i>
		Stygamoebida	-----	<i>Stygamoeba</i>
	Tubulinea	Elardia	Leptomyxida	<i>Flabellula</i>
			Euamoebida	<i>Amoeba</i>
				<i>Saccamoeba</i>
				<i>Hartmannella</i>
			Arcellinida	<i>Diffugia</i>
				<i>Arcella</i>
				<i>Centropyxis</i>
		Echinamoebida	-----	<i>Echinamoeba</i>
				<i>Vermamoeba</i>
	Evosea	Archamoebia	Mastigamoebida	<i>Mastigamoeba</i>
			Entamoeba	<i>Entamoeba</i>
		Variosea	Filamoeba	<i>Filamoeba</i>

Discoba	Heterolobosea	Tetramitia	Vahlkampfiidae	<i>Naegleria</i>
				<i>Vahlkampfia</i>
				<i>Willaertia</i>
				<i>Fumarolamoeba</i>
				<i>Tetramitus</i>
			Gruberellidae	<i>Stachyamoeba</i>
Haptista	Centroplasthelida	Pterocystida	Oxnerellidae	<i>Oxnerella</i>
Rhizaria	Endomyxa	Vampyrellida	-----	<i>Penardia</i>
				<i>Hyalodiscus</i>
	Cercozoa	Imbricatea	Silicofilosea	<i>Euglypha</i>
		Sainouroidea	Guttulinopsidae	<i>Rosculus</i>
				<i>Guttulinopsis</i>
Stramenopiles	Bigyra	Sagenista	Amphitremida	<i>Paramphitrema</i>

3.2. Análisis de diversidad de AVL en Morelos

En el estado de Morelos, el grupo de Ramírez, proveniente de la FES-Iztacala de la UNAM ha realizado 2 estudios, el primero fue en 2009, a través del acuífero de Zacatepec y el segundo, en 2016, fue realizado en ocho manantiales recorridos por la población cercana. Dos de ellos en Cuernavaca, uno en Tlaquiltenango, uno en Amacuzac, uno en Tlaltizapán, uno en Tepalcingo y dos en Cuautla. En ninguno de ellos se emplearon técnicas moleculares para la identificación (Ramírez *et al.* 2009 y 2016). La diversidad reportada en ambos estudios se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Taxonomía de AVL reportadas en Morelos de acuerdo con la literatura consultada y reclasificada en este trabajo según el estudio de Adl *et al.* 2018.

Super Grupo				Género
Amoebozoa	Discosea	Centramoebia	Acanthopodida	<i>Acanthamoeba</i>
		Flabellinia	Vannellida	<i>Vannella</i>
			Dactylopodida	<i>Vexillifera</i>
				<i>Korotnevella</i>
			Dermamoebida	<i>Mayorella</i>
			Thecamoebida	<i>Thecamoeba</i>
	Evosea	Variosea	Filamoeba	<i>Filamoeba</i>
	Tubulinea	Elardia	Leptomyxida	<i>Saccamoeba</i>
			Euamoebida	<i>Hartmannella</i>
		Echinamoebida	-----	<i>Echinamoeba</i>
				<i>Vermamoeba</i>
Discoba	Heterolobosea	Tetramitia	Vahlkampfiidae	<i>Naegleria</i>
				<i>Willaertia</i>
				<i>Tetramitus</i>
				<i>Vahlkampfia</i>
			Gruberellidae	<i>Stachyamoeba</i>
Rhizaria	Endomyxa	Sainouroidea	Guttulinopsidae	<i>Rosculus</i>
				<i>Guttulinopsis</i>

4. Justificación

Este estudio, al aplicar métodos de identificación molecular, es relevante porque la caracterización de AVL ambientales en México sigue siendo escasa y la existente se encuentra poco detallada, ya que la mayor parte de los estudios hechos en el país y todos los realizados en el Estado de Morelos se basaron en claves morfológicas antiguas para identificar a los aislados a nivel de género e incluso a nivel de especie, cuando estas no han sido actualizadas de acuerdo con los últimos avances de taxonomía molecular. Esto dificulta la comparación de los datos con estudios internacionales y con futuros estudios nacionales. Otro aspecto importante para considerar es la falta de estudios realizados en suelos en el país, ya que todos se han enfocado en hábitats acuáticos para realizar los muestreos (Tabla 4), por lo que no se conoce la diversidad de AVL en los suelos del país. Por otro lado, el único estudio filogenético utilizó únicamente métodos de distancias (Bonilla-Lemus *et al.* 2020), siendo este el primer trabajo que utiliza el método de máxima verosimilitud para inferir filogenia en AVL en México. Este también es el primer trabajo que hace uso de un marco estadístico para definir la asociación entre taxones y variables ecológicas.

Tabla 4. Trabajos relacionados a la búsqueda de diversidad de AVL ambientales en México.

Autores y año	Tipo de estudio	Hábitat	Medio
Ehrenberg C.G. 1841 (citado en López-Ochoa y Madrazo 1979)	Morfológico	Cuerpos de agua fresca	-
Rivera <i>et al.</i> 1983	Morfológico	Albercas	Peptona-Agar + <i>Escherichia coli</i>
Rivera <i>et al.</i> 1987	Morfológico	Agua de lluvia	Infusión de paja
Rivera <i>et al.</i> 1989	Morfológico	Aguas termales	Agar no nutritivo + <i>E. coli</i>
Guzmán-Fierros <i>et al.</i> 2008	Molecular enfocado a <i>Naegleria</i>	Agua de sitios recreativos	Agar no nutritivo + <i>E. coli</i>
Lares-Jiménez <i>et al.</i> 2009	Morfológico	Aguas recreativas	Agar no nutritivo
Ramírez <i>et al.</i> 2009	Morfológico	Pozos	Agar no nutritivo + <i>Enterobacter aerogenes</i>
Bonilla-Lemus <i>et al.</i> 2010	Morfológico	Agua doméstica	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Ramírez <i>et al.</i> 2010	Morfológico	Raíces de lirio acuático	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Bonilla-Lemus <i>et al.</i> 2014	Morfológico	Arroyo	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Ramírez <i>et al.</i> 2014	Morfológico	Sistema de tratamiento de agua industrial	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Andrade <i>et al.</i> 2015	Molecular	Ríos	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Ramírez <i>et al.</i> 2016	Morfológico	Manantiales	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Gallegos-Neyra <i>et al.</i> 2018	Morfológico	Playas y arrecifes	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Lares-Jiménez <i>et al.</i> 2018	Molecular	Aguas termales	Agar no nutritivo
Gallegos-Neyra <i>et al.</i> 2019	Morfológico	Cascadas	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>
Bonilla-Lemus <i>et al.</i> 2020	Molecular enfocado a <i>Naegleria</i>	Canales de irrigación de uso recreacional	Agar no nutritivo + <i>E. aerogenes</i>

5. Objetivo

5.1. Objetivo general

Determinar la diversidad molecular de amebas de vida libre recuperadas de ecosistemas naturales y artificiales del Estado de Morelos.

5.2. Objetivos particulares

1. Aislamiento de amebas de vida libre colectadas en ecosistemas naturales y artificiales de Morelos.
2. Identificación molecular de los aislamientos de amebas de vida libre mediante amplificación, secuenciación y análisis filogenético del gen 18S rRNA.
3. Caracterización microscópica a nivel de morfotipo de las amebas recuperadas.
4. Realizar una prueba de asociación estadística entre los géneros encontrados, sus hábitats de aislamiento y sus ecosistemas de origen.

6. Materiales y métodos

6.1. Colecta de muestras en campo

6.1.1. Sitios de muestreo

Se seleccionaron 8 sitios de muestreos (Figura 2) en hábitats contrastantes del estado de Morelos y aledaños. Se eligieron estos puntos considerando los dos ecosistemas predominantes del Estado de Morelos, el bosque templado (el cual cubre el extremo norte del estado, incluyendo al corredor biológico Chichinautzin y al parque nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl) y a la selva baja caducifolia (que abarca el centro y sur del estado, que además contiene reservas estatales como Las Estacas, la Sierra de Huautla y la Sierra de Montenegro) (CONABIO y UAEM 2004).

También se muestrearon ecosistemas artificiales. Los sitios de muestreo fueron los siguientes:

1. El río Apatlaco, debajo del puente “paso de las aves”, a la altura del municipio de Temixco, Morelos.
(N 18°51'14.6" W 99°13'19.8").
2. Bosque de pino-encino, localizado detrás del Centro de Ciencias genómicas de la UNAM.
(N 18° 59' 06" W 99° 14' 05")
3. Bosque de pino-oyamel, localizado en Mexicapa, en el borde entre el Estado de México y Morelos.
(N 18° 58' 32" W 99° 20' 31")
4. Sistema doméstico de purificación de agua potable en la colonia Bella Vista, Cuernavaca, Morelos.
(N 18° 57' 41" W 99° 14' 46")
5. Sistemas domésticos de conducción de agua en la colonia Chamilpa en Cuernavaca, Morelos.
(N 18°58'51.0" W 99°14'41")
6. Sistemas domésticos de conducción de agua en la colonia Lienzo Charro en Cuernavaca, Morelos.
(N 18°58' 22" W 99°14'46")
7. Selva baja caducifolia, localizada en el municipio de Xochitepec, Morelos.
(N 18° 48' 17.8" W 99° 15' 53.3")
8. Parque Natural de las Estacas, localizado en el municipio Tlaltizapán, Morelos.
(N 18° 43' 47" W 99° 06' 46")



Figura 2. Vista aérea de la sección del Estado de Morelos que abarca los 8 sitios seleccionados para el estudio, sus ecosistemas y el hábitat en el cual se realizó el muestreo. Imagen obtenida de Google Earth.

Tabla 5. Características ecológicas y geográficas de los 8 sitios de muestreo.

Sitio de muestreo	Ecosistema	Hábitat	Altura
1	Selva baja caducifolia	Río: sedimento y agua	1,240 msnm
2	Bosque templado	Suelo	1,917 msnm
3	Bosque templado	Suelo	2,327 msnm
4	Artificial	Filtro de purificación de agua	1,750 msnm
5	Artificial	Sistema de conducción de agua doméstica	1,829 msnm
6	Artificial	Sistema de conducción de agua doméstica	1,864 msnm
7	Selva baja caducifolia	Suelo	1,112 msnm
8	Selva baja caducifolia	Río: plantas acuáticas y agua	954 msnm

6.1.2. Método de muestreo

Muestras de agua:

1. Se tomó un tubo Falcon de 50 ml y se colectó una muestra de la columna de agua a contracorriente, colectando también materia orgánica flotante.
2. Se rotuló el tubo de 50 ml y se guardó, a continuación, se transportó al laboratorio para su procesamiento inmediato.

Muestras de sedimento:

1. Se tomó un tubo Falcon de 15 ml y se clavó en el sedimento a 2-3 cm de profundidad.
2. Se cerró firmemente la tapa para crear un efecto de vacío y se retiró el tubo del sedimento y se decantó el agua cuidadosamente por el extremo superior del tubo.
3. Se guardó el tubo Falcon de 15 ml en un tubo Falcon de 50ml, se rotuló el tubo de 50 ml y se guardó, a continuación, se transportó al laboratorio para su procesamiento inmediato.

Muestras de suelo:

1. Se tomó, con una pequeña pala, muestras de tierra debajo de hojarasca, buscando preferentemente sitios con humedad.
2. Se colocaron las muestras en bolsas de plástico con sello hermético, estas se rotularon y se transportaron al laboratorio para su procesamiento inmediato.

Muestras en sistemas de conducción de agua:

1. Se recolectaron las muestras directamente del agua y de raspados en algunas de las superficies.
2. Se depositaron en tubos Falcon de 50ml, estos se rotularon y se guardaron para ser transportados al laboratorio para su procesamiento inmediato.

Muestras de plantas acuáticas:

1. Se realizaron cortes de los tejidos de las plantas que mantenían contacto con el agua.
2. Se depositaron los tubos Falcon de 50 ml, estos se rotularon y guardaron, a continuación, se transportaron al laboratorio para su procesamiento inmediato.

6.2. Procedimiento de laboratorio

6.2.1. Aislamiento de amebas de vida libre

Se utilizó la técnica de aislamiento “por enriquecimiento” que fue empleada en el trabajo de Greub y Jacquier (Jacquier *et al.* 2013).

Procedimiento:

1. Se prepararon cajas Petri de PAS (Page's Amoeba Saline) (120 mg de NaCl, 4 mg de MgSO₄•7H₂O, 4 mg de CaCl₂•2H₂O, 142 mg de Na₂HPO₄ y 136 mg de KH₂PO₄ en 1 L de agua destilada) solidificado con 1% de agar. A estas se les agregó *Escherichia coli* inactivadas por congelación como fuente de alimento.
2. Se resuspendieron las muestras de sedimento en PAS.
3. Se centrifugó la suspensión a 180 g por 10 minutos, lo que permitió el enriquecimiento de amebas en el sedimento, se decantó el sobrenadante hasta dejar solo 15 ml de suspensión y se vortexearon nuevamente. Las muestras de agua únicamente se vortexearon.
4. Se tomaron 50 µL de cada muestra y se dejó caer la gota de un extremo a otro en cajas Petri con PAS (1% de agar) con una capa de *E.coli* inactivada por congelación.
Para las muestras de plantas acuáticas, se realizaron cortes de éstas y se colocaron directamente sobre las cajas de PAS c/ *E. coli*.
5. Se observaron las cajas todos los días para buscar frentes de migración, al encontrarlos se recortó un pequeño cuadro de agar que contenía al frente de migración y se inoculó en cajas frescas de PAS con césped de *E.coli* inactivadas. Durante el primer pase se realizaron 3 inoculaciones por caja, dando un total de 18 cajas.
6. Se repitieron las reinoculaciones varias veces, hasta lograr la pureza morfológica del cultivo (alrededor de 5 a 7 pases).
7. Una vez purificadas, se rasparon las células del agar y se colocaron en matraces con medio PAS líquido y *E.coli* inactivadas, donde son más sencillas de manejar.

6.2.2. Extracción de DNA

1. Se empleó el *kit de extracción de Quiagen: DNeasy Ultra Clean Microbial Kit* para extraer DNA de AVL, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.2.3. Amplificación de genes 18S rRNA de amebas de vida libre

1. Se realizaron PCRs con las parejas de primers que han sido reportadas en la literatura como óptimas para estudios de diversidad ambiental (Tabla 6) y las cuales se han verificado en este estudio de manera *in silico* que se pueden pegar a la secuencia de la AVL modelo *A. castellanii* NEFF (Figura 4). Se empleó la *Taq* DNA polimerasa y se realizaron 30 ciclos de: 45 segundos a 95°, 30 segundos a 60° y 45 segundos a 72°.
2. Se seleccionó el par de primers que presentaron una mayor intensidad y especificidad en la electroforesis de los amplicones.
3. Los productos de PCR de 18S rRNA se purificaron con el *kit de purificación de PCR GeneJET*, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
4. Los amplicones purificados se secuenciaron comercialmente en Macrogen, utilizando ambos primers empleados en el PCR, para llevar a cabo la secuenciación de ambas hebras.

Tabla 6. Primers empleados en la literatura para realizar amplificaciones totales o parciales de 18S rRNA en AVL.

Primers	Secuencias	Referencia:
JDP1-JDP2 (<i>Acanthamoeba</i>)	JDP1 GGCCCAGATC GTTTACCGTGAA JDP2 TCTCACAAGCTGCT AGGGAGTCA	Schroeder <i>et al.</i> 2001
ERIB1-ERIB10 (Universal eucariontes)	ERIB1 ACCTGGTTGATCCTGCCAG ERIB10 CTTCCGCTGGTTCACCTACGG	Barta <i>et al.</i> 1997
RibA-RibB (Universal eucariontes)	RibA ACCTGGTTGATCCTGCCAGT RibB TGATCCATCTGCAGGTTACCTAC	Geisen <i>et al.</i> 2014
NA1-NA2 (<i>Vermamoeba</i>)	NA1 GCTCCAATAGCGTATATTAA NA2 AGAAAGAGCTATCAATCTGT	Lasjerdi <i>et al.</i> 2011
F-566 - R-1200 (Universal eucariontes)	F-566 CAGCAGCCGCGTAATTCC R-1200 CCCGTGTGAGTCAAATTAAGC	Hadziavdic <i>et al.</i> 2014

Acanthamoeba castellanii Neff
2299pb

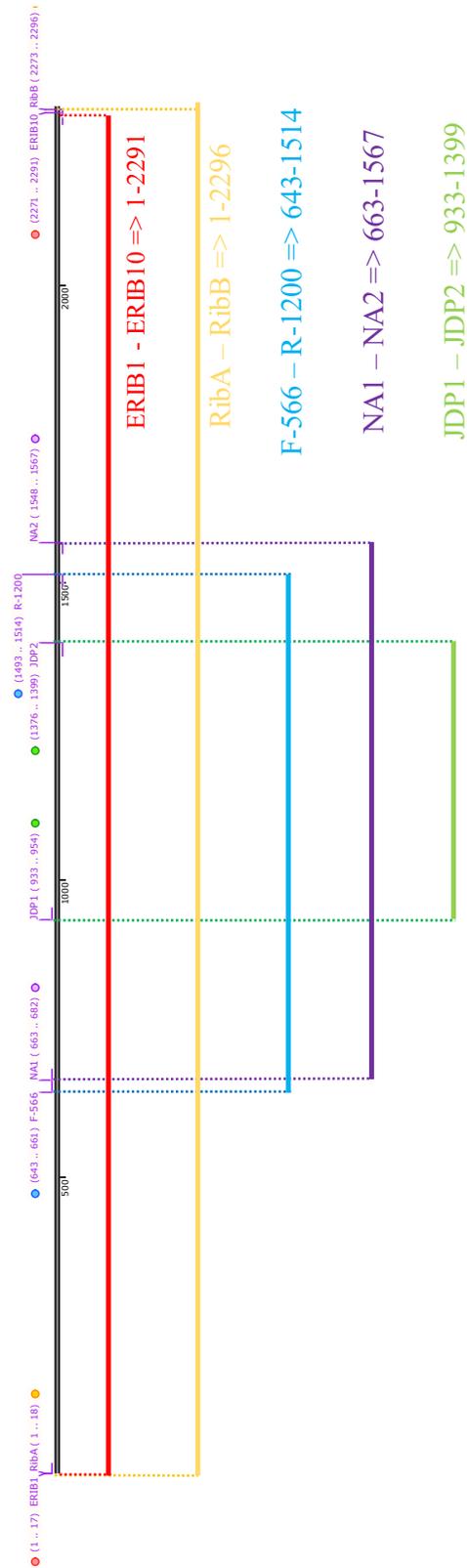


Figura 3. Mapa del gen 18S rRNA de la AVL modelo *Acanthamoeba castellanii* Neff con los primers disponibles en el laboratorio que pueden ser empleados en AVL y el rango de amplicones que se genera con cada par en esta. Generado en SnapGene® software (de GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

6.3. Análisis de datos

6.3.1. Ensamblado y generación de alineamientos múltiples

1. Se realizó un ensamblado con las lecturas de las cadenas *forward* y *reverse* secuenciadas comercialmente por MacroGen (Corea) utilizando SnapGene® software (de GSL Biotech; disponible en snapgene.com).
2. Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos NCBI con las secuencias ensambladas generadas en el estudio mediante Blastn (en el portal <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra la base de datos no redundante de NCBI. De los hits, se seleccionaron a aquellas secuencias con la mayor longitud y que de preferencia incluyeran una publicación asociada. Estas se emplearon como secuencias de referencia y se recortaron a la posición de los primers que fueron seleccionados, utilizando SnapGene® software para obtener la misma región del gen que se amplificó.
3. Las secuencias de referencia y las secuencias generadas en este estudio se agruparon con base en el nivel de similitud mostrado en el Blastn, generando cuatro grupos de similitud.
4. Se realizaron alineamientos múltiples con el programa Clustal OMEGA (Sievers *et al.* 2011) para generar una matriz de datos de caracteres homólogos para cada grupo de similitud. Debido a la naturaleza polifilética de estos organismos, se agregó un grupo externo de un género cercano dentro de cada grupo de similitud para enraizar a cada uno de estos.

Los alineamientos de cada grupo fueron curados manualmente.

5. Una vez que se obtuvieron los alineamientos de cada grupo de similitud, se empleó el programa MEGA X (Sudhir *et al.* 2018) para cuantificar el nivel de divergencia dentro de estos, utilizando un análisis de distancias p (proporción de diferencias entre pares de secuencias).
6. Finalmente, para reunir a todas las secuencias en un solo alineamiento, se utilizó la estrategia de alineamientos de perfiles (alineamientos de alineamientos) utilizando Clustal OMEGA (Sievers *et al.* 2011), de acuerdo con la cercanía filogenética entre grupos de similitud.

6.3.2. Análisis filogenético de genes 18S rRNA de AVL

1. Una vez generados los alineamientos, estos se utilizaron para estudiar las características de los datos en cuanto a sesgo composicional de bases, la complejidad del patrón de sustitución y la heterogeneidad de tasas de sustitución entre sitios mediante la selección de un modelo de sustitución, para obtener un grado de parametrización razonable. Para esto se empleó el programa jModelTest2 (Darriba *et al.* 2012), con 88 modelos candidatos incluyendo modelos que tienen diferente frecuencia de bases (F) y modelos con una tasa de variación individual en cada posición (G), buscando la mejor topología de árbol durante la operación. A continuación, se seleccionó el más ajustado usando el criterio de información Bayesiano (BIC).
2. Una vez seleccionado un modelo de sustitución razonable, se realizó una búsqueda de árboles bajo el criterio de máxima verosimilitud con el programa PhyML (Guindon *et al.* 2010) empleando el algoritmo de búsqueda BEST y con 100 árboles semilla aleatorios. El análisis filogenético de las secuencias generadas en este estudio, en el contexto de las de referencia, permitió clasificar sin ambigüedad a las AVL al menos a nivel de género.

6.3.3. Caracterización de morfotipo de los aislados

Para la caracterización morfológica de las AVL se utilizó microscopía de contraste de fases con el equipo ZEISS Axio Vert A1, empleando un objetivo 40X y se tomaron fotografías de las células *in vivo*. También se emplea la guía de identificación de Smirnov y Brown, 2004.

La guía menciona que, para la identificación a nivel de género y especie realizada únicamente con caracteres morfológicos, es necesario el uso de microscopía electrónica y de bastante experiencia, por lo que recomienda solo describir el morfotipo de los aislados y fotografiarlos (con medidas y descripción de los rasgos característicos) para publicarlos y que posteriormente un experto en sistemática sugiera una lista de posibles especies, evitando así una identificación errónea (Smirnov y Brown 2004). Se describen en la guía 16 morfotipos diferentes (Figura 3) y para identificarlos es necesario realizar observaciones con microscopía de luz, identificando su “forma locomotiva”.

La forma locomotiva de las amebas se puede observar cuando, en un medio acuoso, estas avanzan en una misma dirección de manera continua y es la forma más informativa para la identificación

de la ameba. Se considera imposible identificar el morfotipo de una ameba a partir de su forma “estacionaria”, en la cual no presenta movimiento. Tampoco es posible identificar su morfotipo durante la forma “no direccional”, en la cual se mueve en distintas direcciones al mismo tiempo. Una vez observada la forma locomotiva, se necesitará describir (si se encuentran presentes) las siguientes características: uroide (bulbo presentado en el posterior de las amebas durante su forma locomotiva), hialoplasma (proyecciones del citoplasma libres de contenido granular), crestas, planitud lateral, subpseudopodia (pequeñas proyecciones del citoplasma que no presentan función locomotiva) lóbulos y arrugas. Una vez descritas y fotografiadas las características anteriores se deberá dirigir a la guía para encontrar su morfotipo correspondiente (Smirnov y Brown 2004).

6.4. Análisis de asociación entre variables ambientales y linajes de AVL

Se realizó una prueba formal de asociación y significancia estadística entre las variables de género, hábitat y ecosistema, medida como residuos de Pearson correspondientes a un análisis de χ^2 de triple vía, haciendo uso del paquete `vcdExtra` de R (Disponible en <https://CRAN.R-project.org/package=vcdExtra>).

Para realizar esta prueba de triple vía se acomodaron los datos de las tres categorías en un archivo “.csv”; esta información se guardó en el ambiente de R como “fullTab”. A continuación se utilizó la función `assoc`, la cual realizó el análisis estadístico. La figura generada fue exportada. El código empleado se observa en el siguiente cuadro de texto:

```
library(vcdExtra)
fullTab <- read.csv(file="C:/Users/R/data4vcd.csv" , header=T)
assoc(~Ecosystem+Genus+Habitat, data=fullTab, shade=T, gp = shading_Friendly, legend=T, rot_labels = c( right = 25))
```

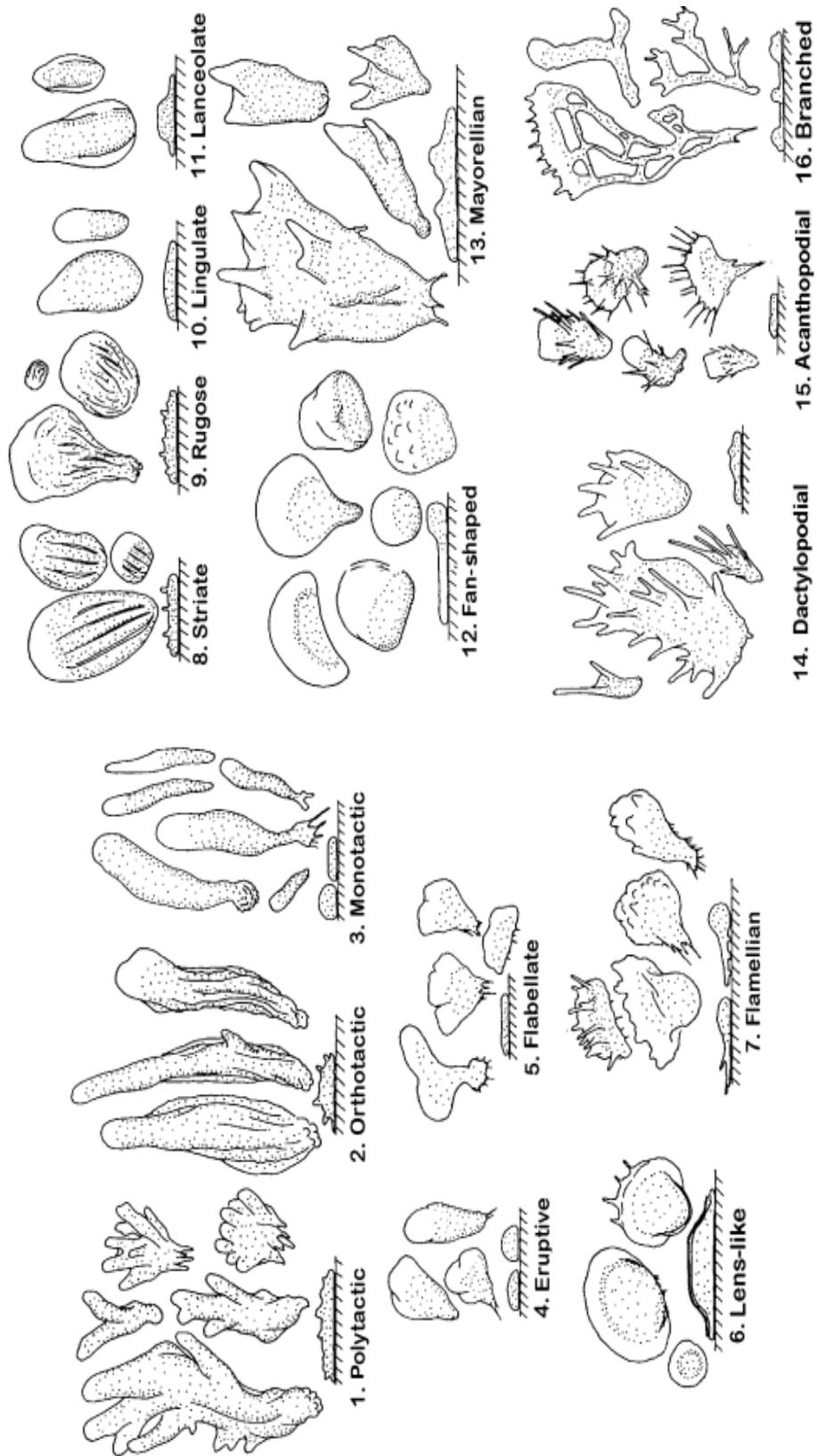


Figura 4. Los 16 morfotipos de amebas de vida libre (Smimov y Brown 2004)

7. Resultados

7.1. Lista de aislados recuperados en el estudio

En la Tabla 7 se enlistan los 35 aislados que se purificaron de los 8 puntos de muestreo.

Tabla 7. Lista de aislados obtenidos en el estudio, su fecha de colecta y sus coordenadas de muestreo.

	ID	Origen de muestra	Fecha de colecta	Coordenadas
1	DR1	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
2	DR2	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
3	DR3	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
4	DR4	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
5	DR5	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
6	DR6	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
7	DR7	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
8	DR8	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
9	DR9	Regadera doméstica	09/19	N 18°58' 22" W 99°14'46"
10	JR1	Regadera doméstica	09/19	N 18°58'51.0" W 99°14'41"
11	3HKMJS1	Suelo en la arboleada detrás del CCG	10/19	N 18° 59' 06" W 99° 14' 05"
12	4MJS2	Suelo en la arboleada detrás del CCG	10/19	N 18° 59' 06" W 99° 14' 05"
13	5HKMJS2	Suelo en la arboleada detrás del CCG	10/19	N 18° 59' 06" W 99° 14' 05"
14	FER1	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
15	FCA1	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
16	FCA2	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
17	FCA3	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
18	FCA4	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
19	SF1-1	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
20	SF1-2	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
21	SF1-3	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
22	SF1-4	Sistema de filtrado de agua potable doméstico	02/20	N 18° 57' 41" W 99° 14' 46"
23	TS3-1	Sedimento río Apatlaco	03/20	N 18°51'14.6"W99°13'19.8"
24	TS3-2	Sedimento río Apatlaco	03/20	N 18°51'14.6"W99°13'19.8"
25	TS37-1	Sedimento río Apatlaco	03/20	N 18°51'14.6"W99°13'19.8"
26	TS37-2	Sedimento río Apatlaco	03/20	N 18°51'14.6"W99°13'19.8"
27	S4	Suelo en el bosque de subida a Chalma	09/20	N 18° 58' 32" W 99° 20' 31"
28	S5	Suelo en el bosque de subida a Chalma	09/20	N 18° 58' 32" W 99° 20' 31"
29	S6	Suelo en el bosque de subida a Chalma	09/20	N 18° 58' 32" W 99° 20' 31"
30	XOCH1-2	Suelo en la selva baja caducifolia de Xochitepec	09/20	N 18° 48' 29" W 99° 16' 43"
31	XOCH2-3	Suelo en la selva baja caducifolia de Xochitepec	09/20	N 18° 48' 29" W 99° 16' 43"
32	XOCH1-3	Suelo en la selva baja caducifolia de Xochitepec	09/20	N 18° 48' 29" W 99° 16' 43"
33	TA37-1	Agua río Apatlaco	03/20	N 18°51'14.6"W99°13'19.8"
34	EAPIL_P11	Hojas de <i>Ludwigia palustris</i> encontrada en Las Estacas	03/21	N 18° 43' 47" W 99° 06' 46"
35	NEFF	Cepa de colección	NA	NA

7.2. Evaluación de 5 pares de primers para amplificar el gen 18SrRNA

Se realizaron electroforesis individuales en un gel de agarosa al 1.5% para cada uno de los 5 pares de primers. Al teñirlas con bromuro de etidio y visualizarlas en el transiluminador se obtuvieron las siguientes imágenes:

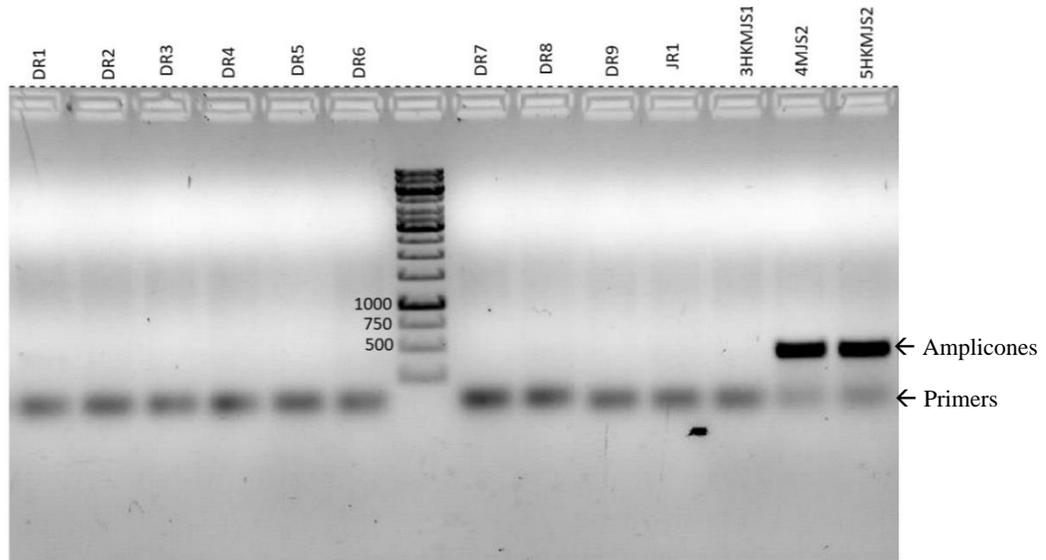


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR de las primeras 13 cepas obtenidas en el estudio al emplear los primers **JDP1** y **JDP2**. Se incluyó una escalera de 1Kb.

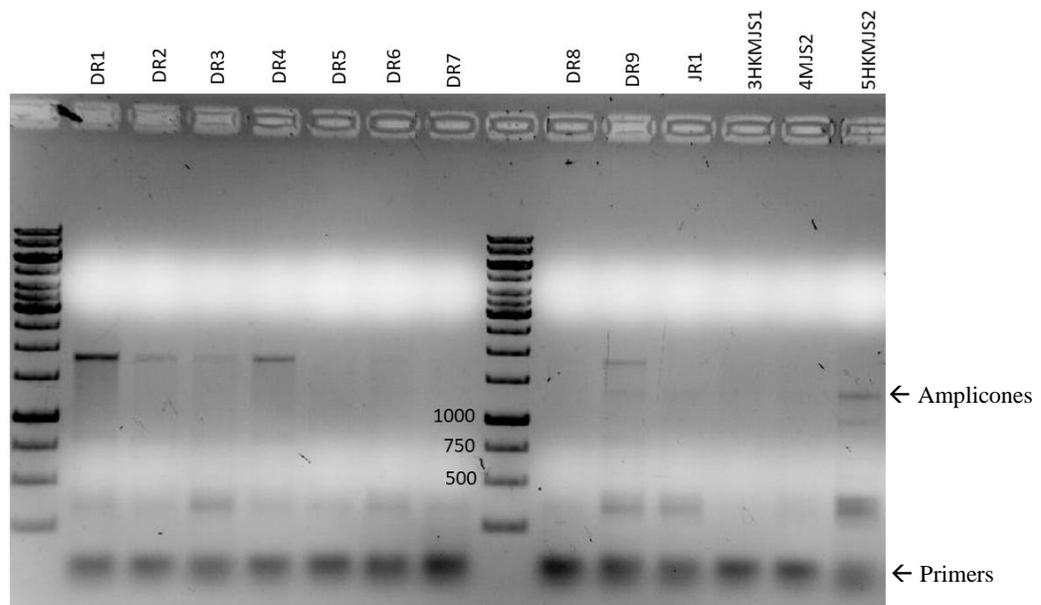


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR de las primeras 13 cepas obtenidas en el estudio al emplear los primers **ERIB1** y **ERIB10**. Se incluyó una escalera de 1Kb.

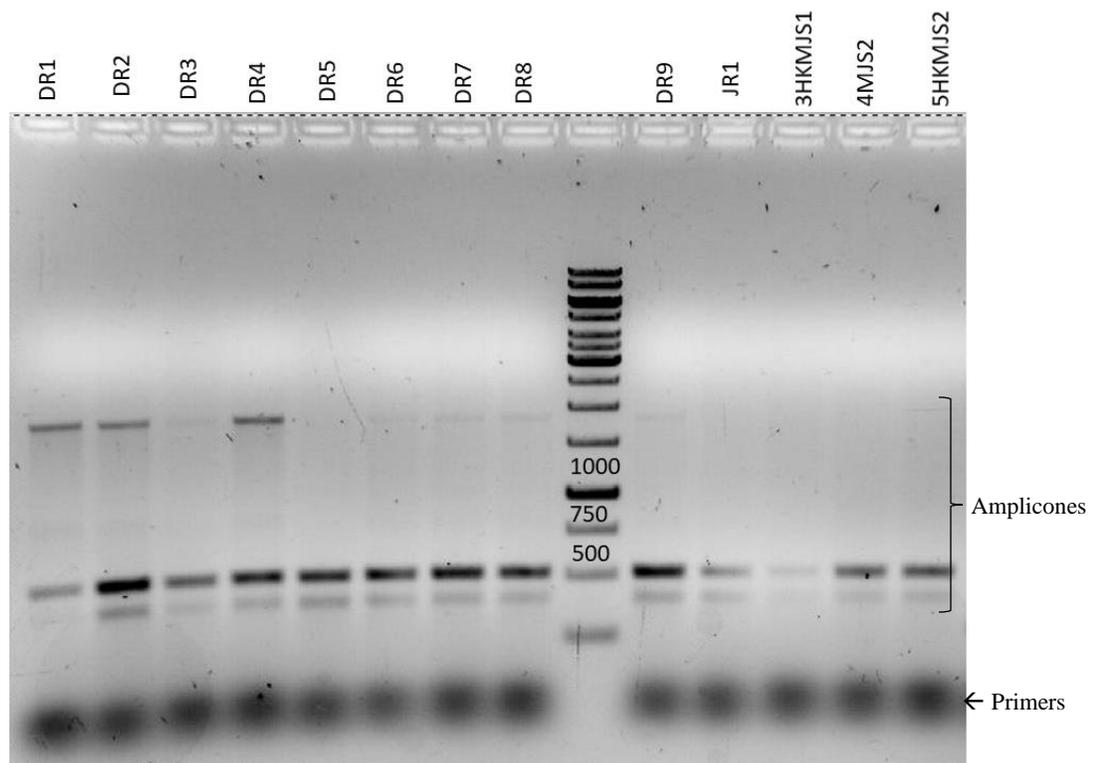


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR de las primeras 13 cepas obtenidas en el estudio al emplear los primers **RibA** y **RibB**. Se incluyó una escalera de 1Kb.

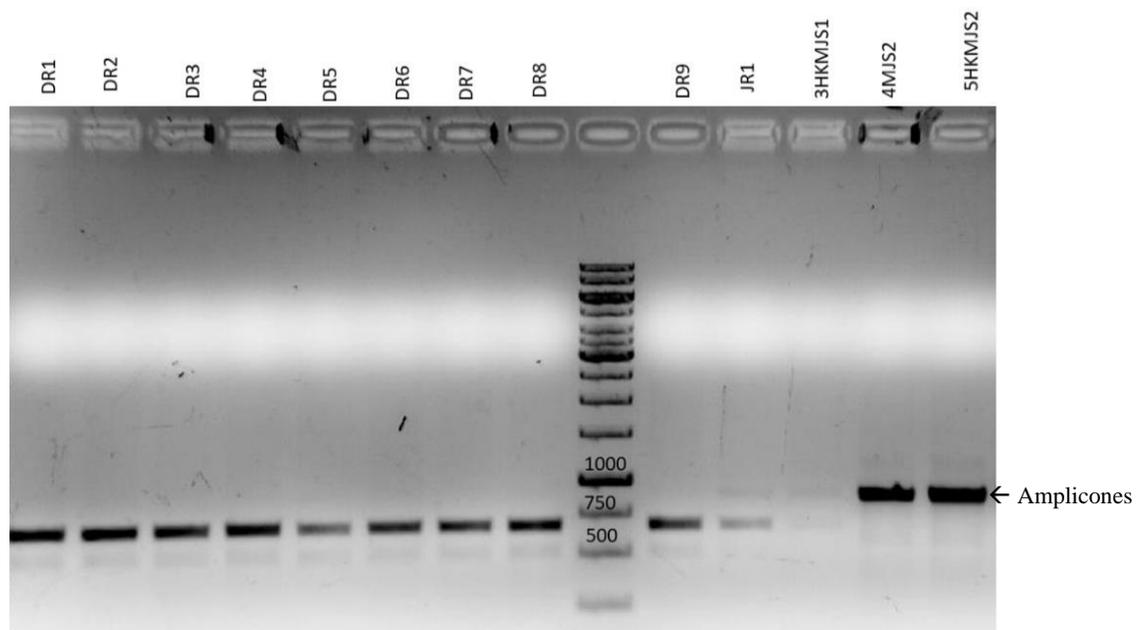


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR de las primeras 13 cepas obtenidas en el estudio al emplear los primers **NA1** y **NA2**. Se incluyó una escalera de 1Kb.

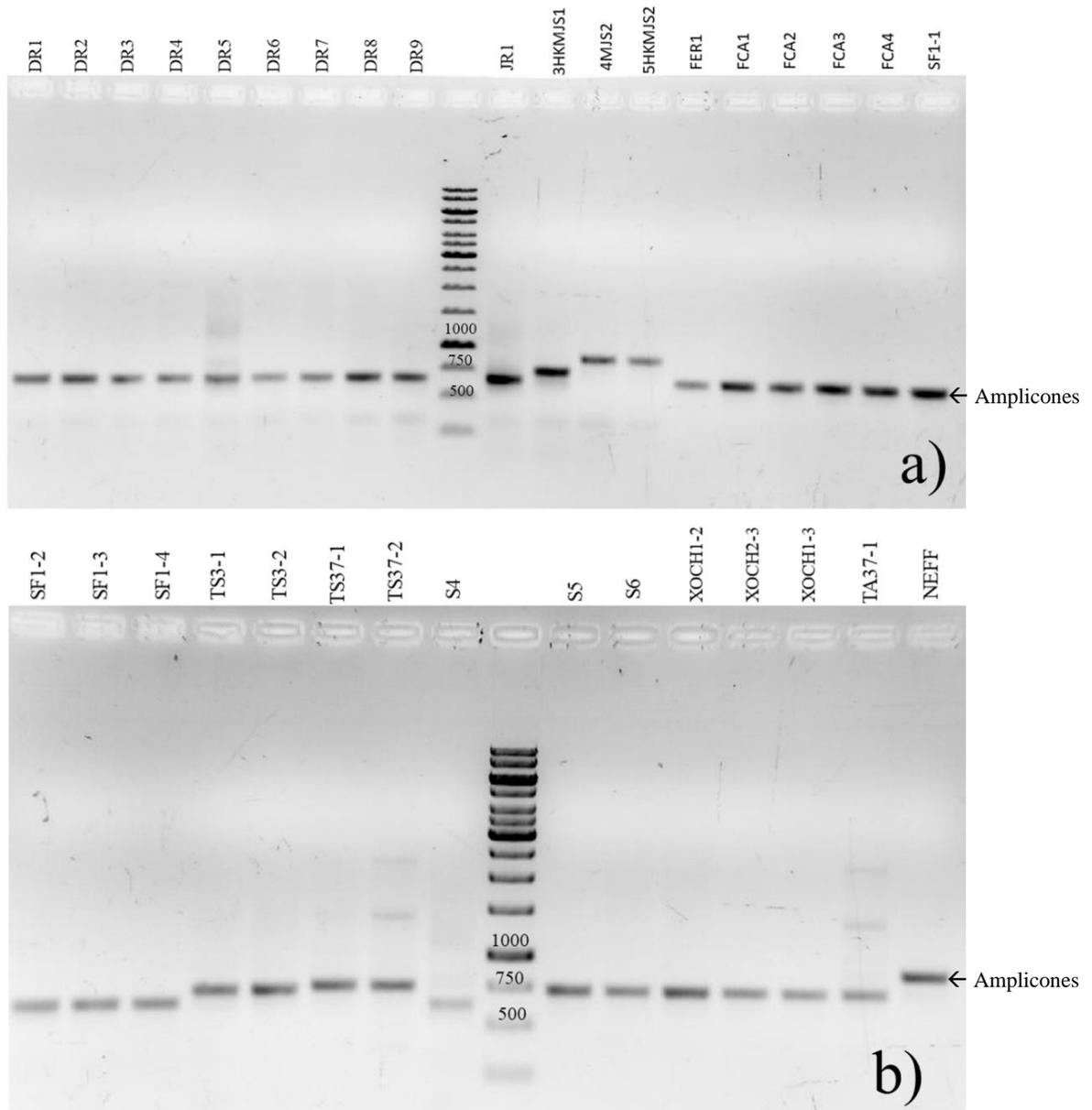


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos con las 34 cepas al emplear los primers **F-566** y **R-1200**. Se incluyó una escalera de 1Kb. La Figura 9 a) muestra las primeras 19 muestras. La Figura 9 b) muestra las siguientes 15 muestras.

En un principio, cuando únicamente se tenían los 13 aislados obtenidos en 2019 se realizaron PCRs con los primeros 4 primers enlistados en la Tabla 6, de los cuales:

- JDP1: Amplificaron solo 2 de las muestras (Figura 5).
- ERIB: Amplificaron varias muestras, pero presentaron hasta tres bandas (Figura 6).
- Rib: Amplificaron varias muestras, pero presentaron hasta tres bandas (Figura 7).
- NA: Amplificaron una banda en todas las muestras a excepción de 3HKMJS1 (Figura 8).

Una vez que se obtuvieron las 35 cepas aisladas se realizó una amplificación empleando los primers F-566 y R-1200. Estos amplificaron con una buena especificidad a todas las muestras (Figura 9), por lo que fueron seleccionados para la secuenciación parcial del gen 18S rRNA. Se obtuvo una cepa posteriormente en 2021 llamada EAP1L_P11, la cual recibió el mismo tratamiento.

7.3. Distancias pareadas dentro de los grupos de similitud de Blastn

Se obtuvieron 35 amplicones, de los cuales, al ser secuenciados, 33 mostraron una buena calidad (Figura 10a). Solamente 2 de las secuenciaciones (DR5 y S4) mostraron picos dobles en la mayor parte del cromatograma (Figura 10b), esto indica la posibilidad de que la cepa no logró ser completamente purificada, por lo cual no fueron utilizadas posteriormente en el estudio.

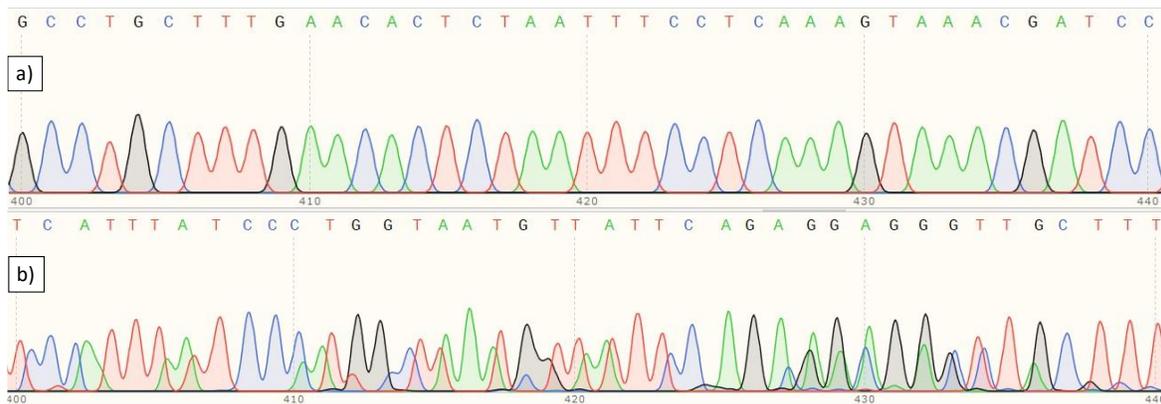


Figura 10. Región 400pb a 440pb de los cromatogramas obtenidos en la secuenciación del estudio visualizados en SnapGene® software. a) Secuencia reverse de la cepa DR6 b) Secuencia reverse de la cepa DR5.

El Blastn mostró secuencias similares a los géneros: *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Naegleria* y *Tetramitus*, las cuales fueron seleccionadas como secuencias de referencia y organizadas en cuatro grupos según su similitud a cada género, junto a un grupo externo cercano a cada género: para *Acanthamoeba* fue *Balamuthia*, para *Vermamoeba* fue *Echinamoeba* y en el caso de *Naegleria* y *Tetramitus*, estos se emplearon como grupos externos mutuos debido a su cercanía taxonómica. La longitud de las secuencias ensambladas se muestra en la Tabla 8, según su grupo de similitud.

Tabla 8. Longitud de las secuencias en los alineamientos de cada grupo de similitud

Grupo de similitud	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Tetramitus</i>	<i>Vermamoeba</i>	<i>Naegleria</i>
Longitud de secuencia	860 pb	713 pb	599 pb	682 pb

El análisis de distancias p mostró que todas las secuencias, con excepción de los grupos externos, tienen una distancia menor a 0.06, lo cual nos permite inferir que sí pertenecen a un mismo grupo taxonómico, cuando se realiza la comparación con el gen 18S rRNA (Tablas 9-12).

Tabla 9. Distancias p pareadas estimadas entre las secuencias del grupo de similitud *Acanthamoeba*. El grupo externo está marcado en negritas.

		1	2	3	4	5
1	4MJS2					
2	5HKMJS2	0.0061				
3	<i>Acanthamoeba_sp._T13_KF928950</i>	0.0012	0.0073			
4	<i>Acanthamoeba_castellanii_Neff_T4_U07416</i>	0.0517	0.0544	0.0518		
5	NEFF	0.0519	0.0544	0.052	0	
6	<i>Balamuthia_mandrillaris_AF019071</i>	0.0979	0.0983	0.0979	0.0875	0.0879

Tabla 10. Distancias p pareadas estimadas entre las secuencias del grupo de similitud *Tetramitus*. El grupo externo está marcado en negritas.

		1	2	3	4	5	6
1	TS37-1						
2	TS37-2	0.0000					
3	<i>Tetramitus_dokdoens_KY463322</i>	0.0028	0.0028				
4	<i>Tetramitus_rostratus_M98051</i>	0.0112	0.0112	0.0112			
5	<i>Paratetramitus_jugosus_M98050</i>	0.0326	0.0326	0.0326	0.0297		
6	<i>Tetramitus_thorntoni_X93085</i>	0.0309	0.0310	0.0310	0.0267	0.0057	
7	<i>Naegleria_fultoni_DQ768719</i>	0.2704	0.2709	0.2700	0.2673	0.2690	0.2704

Tabla 11. Distancias p pareadas estimadas entre las secuencias del grupo de similitud *Vermamoeba* (las secuencias idénticas están agrupadas en una misma fila). El grupo externo está marcado en negritas.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	DR1-9									
2	JR1	0.0033								
3	FER1	0.0050	0.0050							
4	FCA1-4	0.0050	0.0050	0.0000						
5	SFI-1-4	0.0117	0.0083	0.0100	0.0100					
6	<i>Vermamoeba_vermiformis_KC188996</i>	0.0033	0.0000	0.0050	0.0050	0.0083				
7	<i>Vermamoeba_vermiformis_KP792393</i>	0.0050	0.0050	0.0000	0.0000	0.0100	0.0050			
8	<i>Vermamoeba_vermiformis_KP792397</i>	0.0117	0.0083	0.0100	0.0100	0.0000	0.0083	0.0100		
9	Uncultured_eukaryote_LC222939	0.0000	0.0033	0.0050	0.0050	0.0117	0.0033	0.0050	0.0117	
10	<i>Echinamoeba_thermarum_AJ489263</i>	0.1789	0.1773	0.1773	0.1773	0.1706	0.1773	0.1773	0.1706	0.1789

Tabla 12. Distancias p pareadas estimadas entre las secuencias del grupo de similitud *Naegleria* (las secuencias idénticas están agrupadas en una misma fila). El grupo externo está marcado en negritas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	<i>Naegleria fultoni</i> DQ768719																					
2	<i>Naegleria australiensis</i> AY321362	0.0192																				
3	<i>Naegleria jejuensis</i> MF113400	0.0192	0.0177																			
4	<i>Naegleria pagei</i> DQ768714	0.0206	0.0162	0.0074																		
5	3HKWJ51	0.0192	0.0177	0.0088	0.0103																	
6	<i>Naegleria gruberi</i> MG699123	0.0192	0.0177	0.0088	0.0103	0.0000																
7	<i>Naegleria neojejuensis</i> MF113404	0.0177	0.0221	0.0133	0.0147	0.0074																
8	<i>Naegleria clarki</i> JQ271704	0.0221	0.0236	0.0147	0.0162	0.0088	0.0133															
9	<i>Naegleria minor</i> X93224	0.0547	0.0620	0.0650	0.0665	0.0620	0.0633	0.0709														
10	<i>Naegleria lovaniensis</i> U80062	0.0754	0.0740	0.0740	0.0725	0.0651	0.0651	0.0725	0.0710	0.0735												
11	<i>Naegleria fowleri</i> KT375442	0.0709	0.0753	0.0753	0.0739	0.0665	0.0665	0.0709	0.0724	0.0734	0.0088											
12	TS3-2	0.0178	0.0325	0.0325	0.0340	0.0325	0.0325	0.0325	0.0325	0.0500	0.0766	0.0750										
13	85-6	0.0163	0.0311	0.0311	0.0325	0.0311	0.0311	0.0311	0.0311	0.0485	0.0751	0.0735	0.0015									
14	XOCH(1-2,-3,1-3)Y EAPLL_P11	0.0178	0.0325	0.0325	0.0340	0.0325	0.0325	0.0325	0.0325	0.0500	0.0766	0.0750	0.0000	0.0015								
15	<i>Naegleria sp.</i> AF011457	0.0177	0.0325	0.0325	0.0340	0.0325	0.0325	0.0325	0.0325	0.0499	0.0765	0.0749	0.0000	0.0015	0.0000							
16	TR37-1	0.0178	0.0325	0.0325	0.0340	0.0325	0.0325	0.0325	0.0325	0.0500	0.0766	0.0750	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000						
17	<i>Naegleria sp.</i> DQ768718	0.0178	0.0325	0.0325	0.0340	0.0325	0.0325	0.0325	0.0325	0.0471	0.0766	0.0750	0.0029	0.0015	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029	0.0059	0.0059	0.0059	0.0059
18	Uncultured eukaryote JN635490	0.0207	0.0355	0.0355	0.0370	0.0355	0.0355	0.0355	0.0529	0.0795	0.0779	0.0029	0.0044	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029	0.0059	0.0059	0.0059	0.0059
19	<i>Naegleria sp.</i> DQ768717	0.0207	0.0325	0.0355	0.0370	0.0355	0.0355	0.0355	0.0529	0.0766	0.0750	0.0029	0.0044	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029	0.0059	0.0059	0.0059	0.0059
20	<i>Naegleria americana</i> AM062740	0.0221	0.0348	0.0379	0.0395	0.0379	0.0379	0.0379	0.0565	0.0818	0.0801	0.0031	0.0047	0.0031	0.0031	0.0031	0.0031	0.0031	0.0063	0.0063	0.0063	0.0063
21	TS3-1	0.0207	0.0325	0.0355	0.0370	0.0355	0.0355	0.0355	0.0529	0.0766	0.0750	0.0029	0.0044	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029	0.0059	0.0059	0.0059	0.0059
22	<i>Tetramitus thornstoni</i> X93085	0.2704	0.2720	0.2767	0.2736	0.2752	0.2752	0.2767	0.2783	0.2837	0.2833	0.2801	0.2786	0.2801	0.2801	0.2801	0.2801	0.2801	0.2801	0.2801	0.2801	0.2801

En primer lugar, se realizaron los alineamientos por grupo de similitud. Posteriormente se alinearon estos grupos en función de su cercanía filogenética: *Acanthamoeba* con *Vermamoeba*, que pertenecen al supergrupo Amoebozoa y posteriormente *Naegleria* y *Tetramitus*, los cuales pertenecen al supergrupo Discoba. Finalmente se alinearon ambos perfiles entre ellos obteniendo así el alineamiento completo (Figura 11).

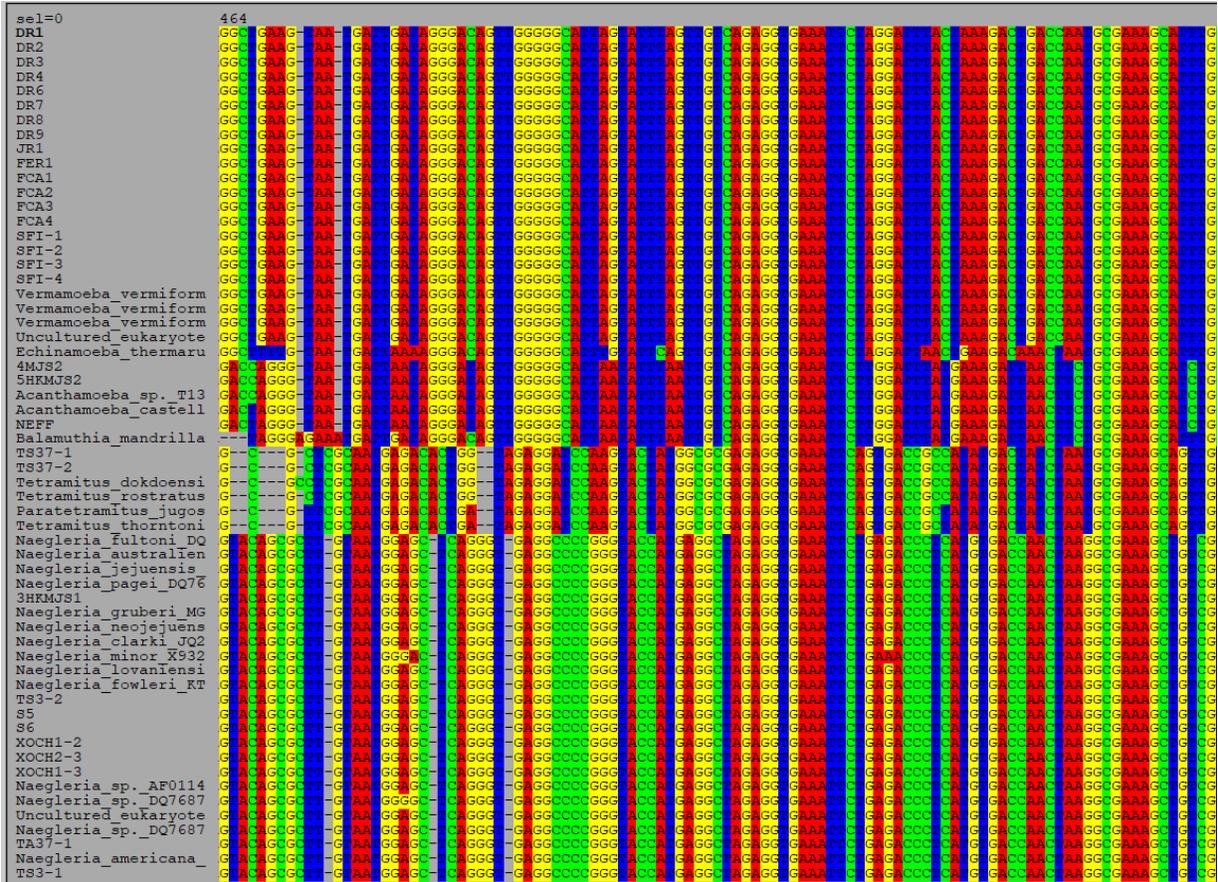


Figura 11. Vista parcial del alineamiento completo de las secuencias obtenidas en el estudio y sus referencias, visualizado en Seaview (Gouy *et al.* 2010).

7.4. Selección de modelo de sustitución

El criterio de información Bayesiano (BIC), mostró al modelo de sustitución **TrN+G** como el más indicado (Tabla 13). También se obtuvieron las estimaciones de los valores e importancia de los parámetros del alineamiento (Tabla 14).

Tabla 13. Mejores modelos de sustitución ordenados según el Criterio de Información Bayesiano en JModelTest.

	Model	(-lnL)	K	BIC	delta	weight	cumWeight
1	TrN+G	4674.729	122	10179.621	0	0.515919	0.515919
2	TrNef+G	4685.479	119	10180.708	1.087056	0.299592	0.815510
3	TIM2+G	4673.798	123	10184.565	4.944215	0.043547	0.859057
4	TIM3ef+G	4684.155	120	10184.864	5.243131	0.037502	0.896559
5	TIM1+G	4674.477	123	10185.921	6.300215	0.022106	0.918665
6	TIM3+G	4674.649	123	10186.267	6.645675	0.018599	0.937264
7	TIM3+G	4674.749	123	10186.467	6.845895	0.016827	0.954091

Tabla 14. Las estimaciones de los valores e importancia de los parámetros calculadas por medio del Criterio de Información Bayesiano en JModelTest.

Parámetro	Estimaciones promedio del modelo	Importancia
fA	0.2546	0.6199
fC	0.2055	0.6199
fG	0.2738	0.6199
fT	0.2661	0.6199
kappa	4.7786	0.0001
titv	2.3877	0.0001
rAC	1.0296	0.1191
rAG	3.1612	0.9999
rAT	1.0969	0.1
rCG	0.8008	0.097
rCT	7.0759	0.9999
rGT	1	0.9999
pinv(I)	0.2945	0
alpha(G)	0.5835	0.9685
pinv(IG)	0.001	0.0315
alpha(IG)	0.5912	0.0315

7.5. Filogenia de máxima verosimilitud de las AVL recuperadas en el estudio

La búsqueda de árboles de máxima verosimilitud encontró el árbol mostrado en la Figura 12 con una Log likelihood de -4675.42. La filogenia muestra a dos clados profundamente divergentes (A y B), que corresponden a Amoebozoa y a Discoba, respectivamente.

En el clado A (Amoebozoa), de las secuencias obtenidas en el trabajo, se agrupan 3 aislados del género *Acanthamoeba*, 2 del genotipo T13 y uno del genotipo NEFF. Así mismo se agrupan 18 aislados dentro del género *Vermamoeba*. En el clado B (Discoba), se agrupan 2 aislados en el género *Tetramitus* y 10 aislados en el género *Naegleria*.

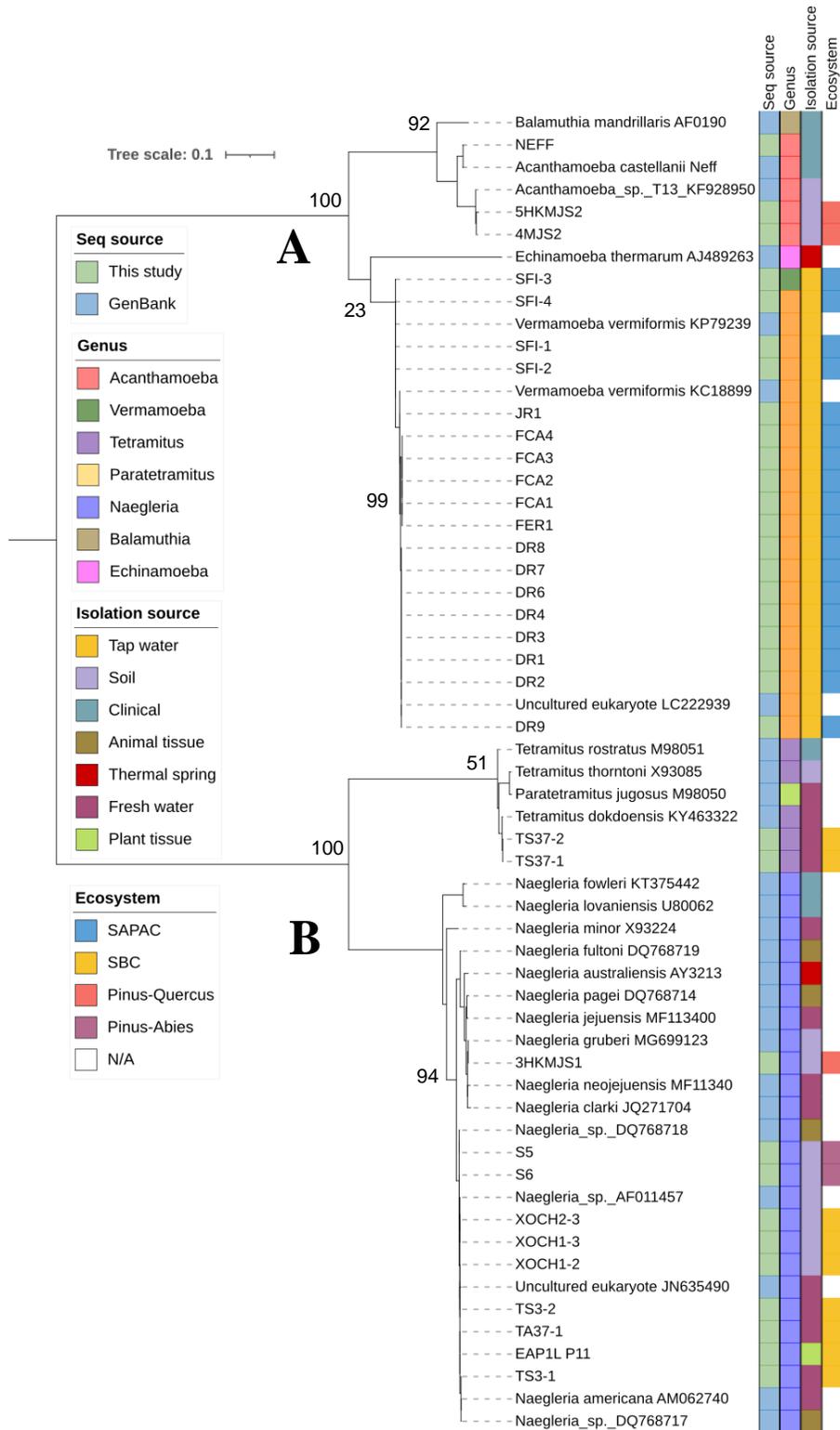


Figura 12. Estima filogenética de máxima verosimilitud bajo el modelo TrN+G (lnL = -4675.42), empleando PhyML (búsqueda con algoritmo BEST) y mapeo que muestra el origen de la secuencia, género, lugar y ecosistema de aislamiento. Se pueden observar dos clados con un alto soporte. El clado A corresponde al supergrupo Amoebozoa y el clado B corresponde al supergrupo Discoba. Árbol editado en ITOL (Letunic y Bork 2019).

7.6. Análisis de morfotipos

El género *Acanthamoeba* mostró su característico morfotipo acanthopodial (Figura 13), el cual presenta células irregulares con proyecciones citoplasmáticas cortas, afiladas e hialinas. Sin embargo, AVL de diferentes géneros presentan esta morfología, por lo que también deben tomarse en cuenta las formas de su quiste para identificarlas (Smirnov y Brown 2004). El parecido de estos acanthopodios con espinas es lo que proporcionó el prefijo “acanth-” al género. Se pueden observar grandes vacuolas contráctiles como cuerpos refringentes al microscopio de contraste de fases en la mayoría de las células.

El género *Vermamoeba* presentó un morfotipo monotácito (Figura 14), el cual representa a amebas monopodiales y subcilíndricas con un flujo citoplasmático constante, además de que presenta un exterior liso, sin arrugas laterales. Este morfotipo se encuentra en bastantes géneros de tubulinea, por lo que se requiere de microscopía electrónica para identificarlo (Smirnov y Brown 2004). Su parecido morfológico a gusanos le proporcionó el prefijo “vermi-“ tanto al género como a la especie.

Naegleria y *Tetramitus*, pertenecen al grupo *Vahlkampfiidae*, siendo estos géneros hermanos (Adl *et al.* 2018) y presentan el mismo morfotipo eruptivo, el cual comprende a amebas monopodiales con una locomoción eruptiva generada por el flujo de su citoplasma, estos géneros pueden ser confundidos como monotácitos en las fotografías, debido a que no se observa su locomoción, sin embargo, algunas de las especies de estos géneros presentan etapa flagelar, la cual se les induce para poder identificarlos (Smirnov y Brown 2004). El cultivo analizado del género *Naegleria* se encontraba en proceso de enquistamiento (Figura 15), debido a que rápidamente consumió a su fuente de alimento. Por el contrario, el cultivo del género *Tetramitus* (Figura 16) presentó muy pocos trofozoítos y una gran cantidad de bacterias *E. coli*, lo que demuestra que este asilado consume su alimento más lentamente, por lo que crece a un menor ritmo bajo las condiciones de cultivo empleadas. El género *Naegleria* fue nombrado en honor al zoólogo francés Mathieu Naegler (De Jonckheere 2014) y el nombre del género *Tetramitus* fue proporcionado por la presencia de 4 flagelos durante su etapa flagelar (Bunting 1922). No se ha logrado todavía documentar el estado flagelar de nuestros aislados pertenecientes a *Vahlkampfiidae*.

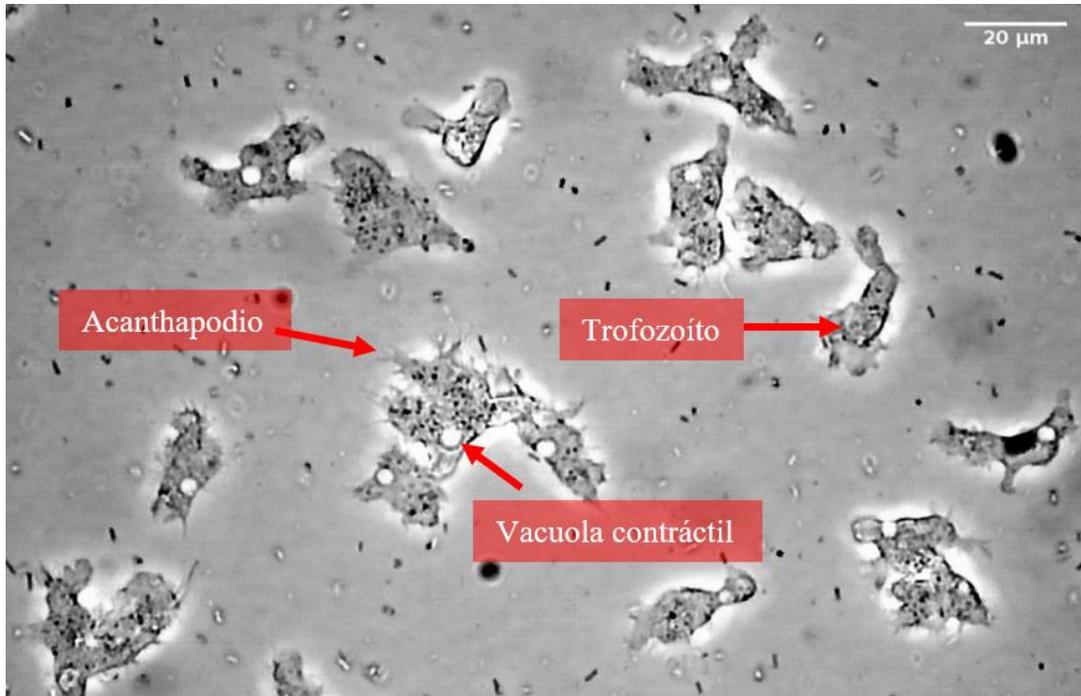


Figura 13. Morfotipo acanthopodial del aislado **4MJS2**, identificado molecularmente como *Acanthamoeba*.

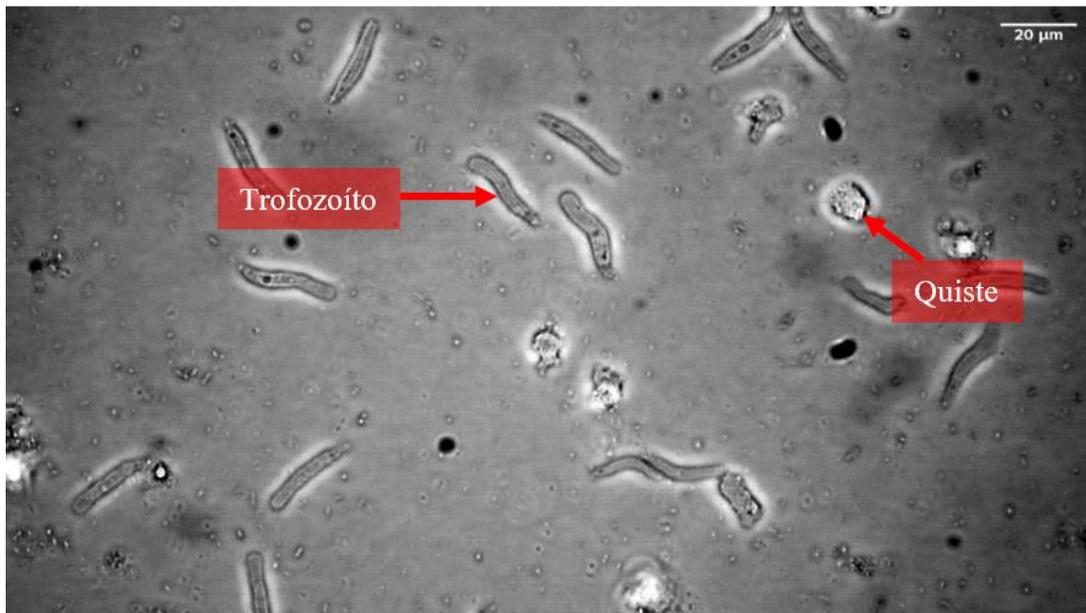


Figura 14. Morfotipo monotáctico del aislado **FCA1**, identificado molecularmente como *Vermamoeba*.

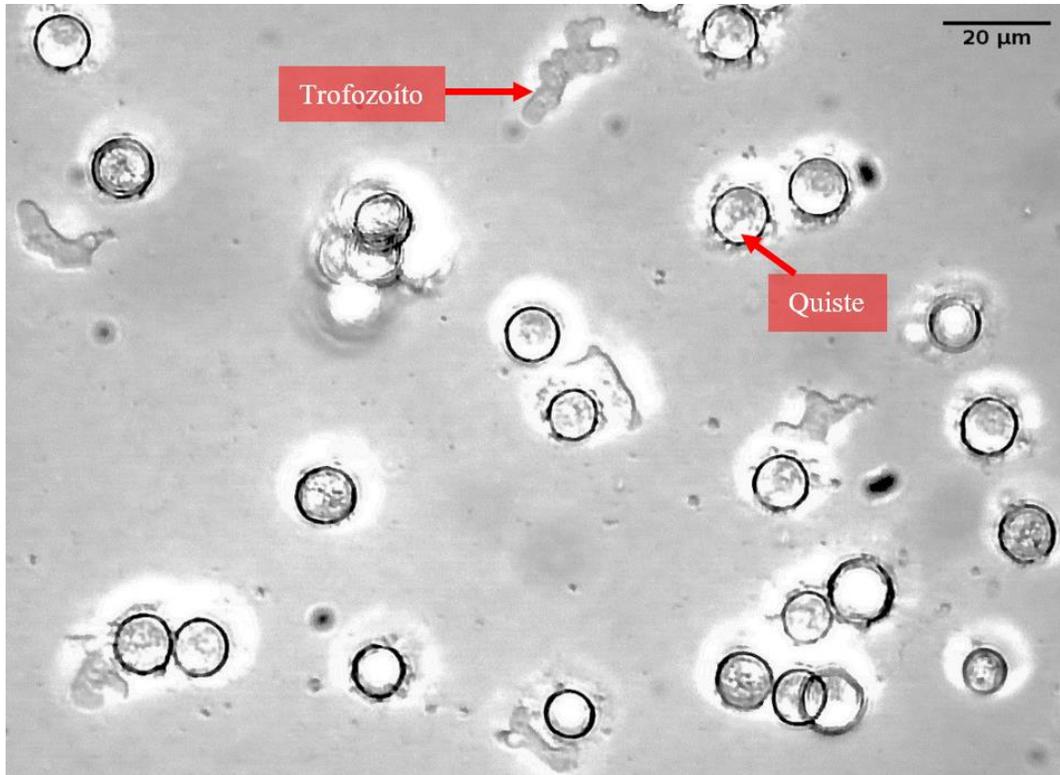


Figura 15. Morfotipo eruptivo del aislado **TS3-1**, identificado molecularmente como *Naegleria*.

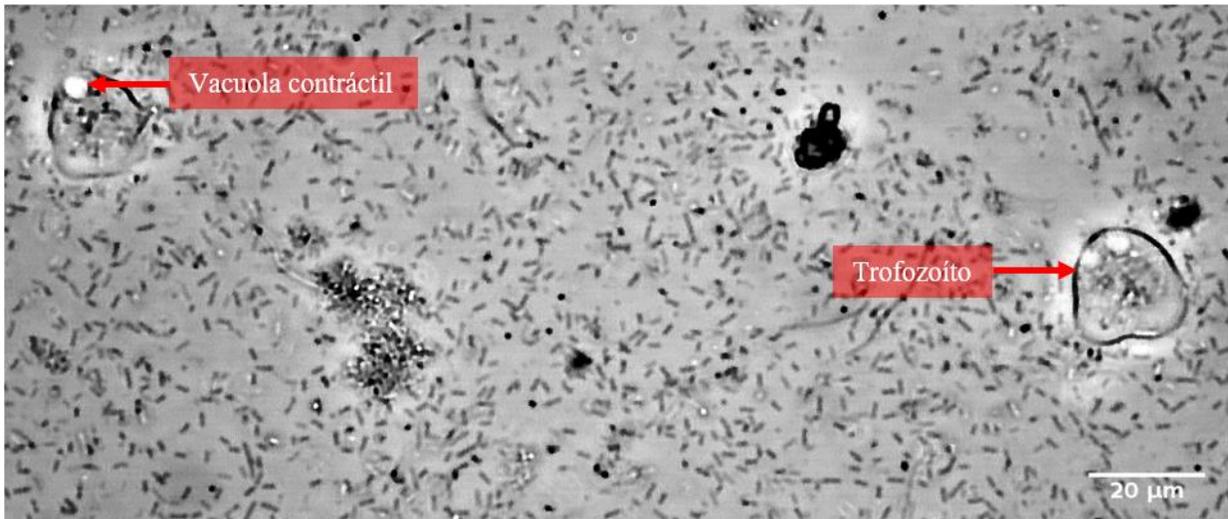


Figura 16. Morfotipo eruptivo del aislado **TS37-1**, identificado molecularmente como *Tetramitus*.

7.7. Asociación estadística entre variables genéticas y ecológicas

Se encontró una gran diversidad taxonómica considerando que se identificaron organismos pertenecientes a los supergrupos Amoebozoa y Discoba, encontrados en ramas distintas del árbol eucariota, como se ilustra en la Figura 17, lo que demuestra que, con el método de cultivo por enriquecimiento, y los primers elegidos, se puede identificar a estos organismos ameboides a pesar de su distancia filogenética. Se encontraron 2 géneros en cada supergrupo, con una notable asociación entre estos y sus variables ambientales, a excepción del género *Naegleria*, el cual fue recuperado de dos hábitats diferentes.

El género que más se encontró fue *Vermamoeba*, con 14 aislados, seguido por *Naegleria* con 8 aislados y para *Acanthamoeba* junto a *Tetramitus* se obtuvieron únicamente 2 aislados.

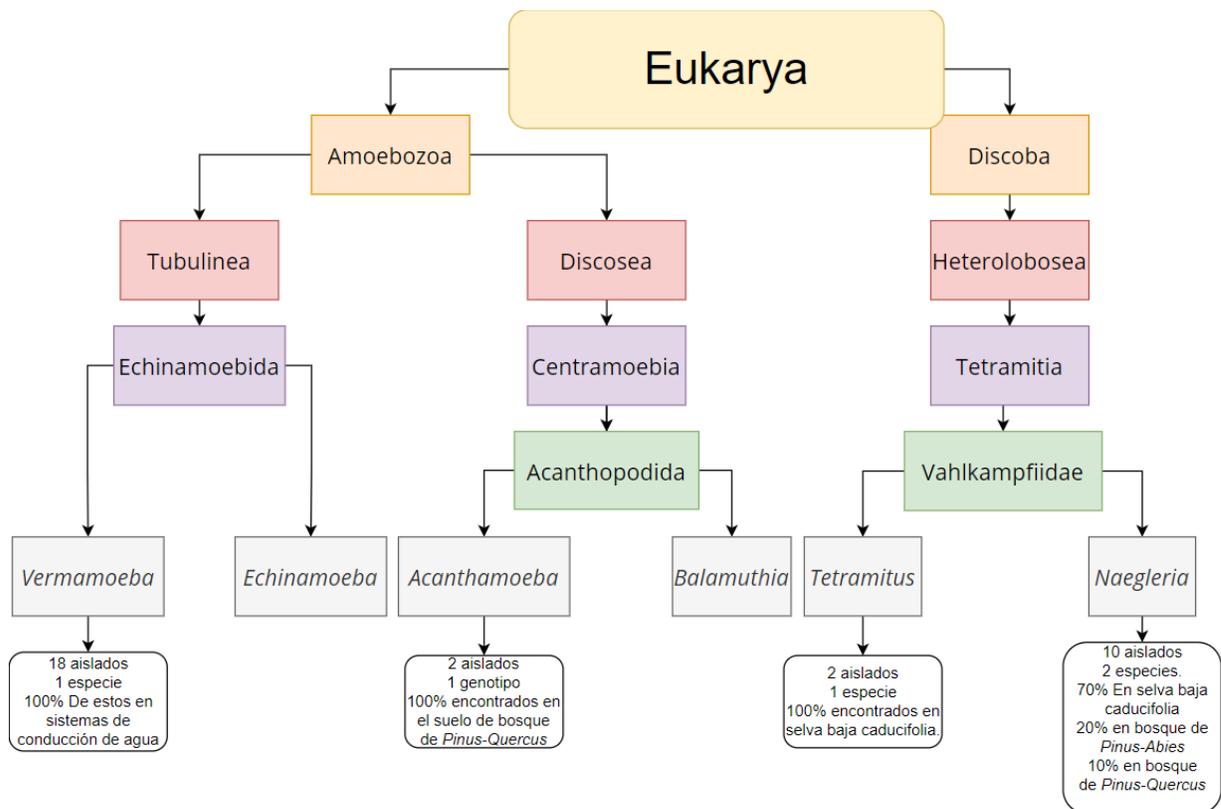
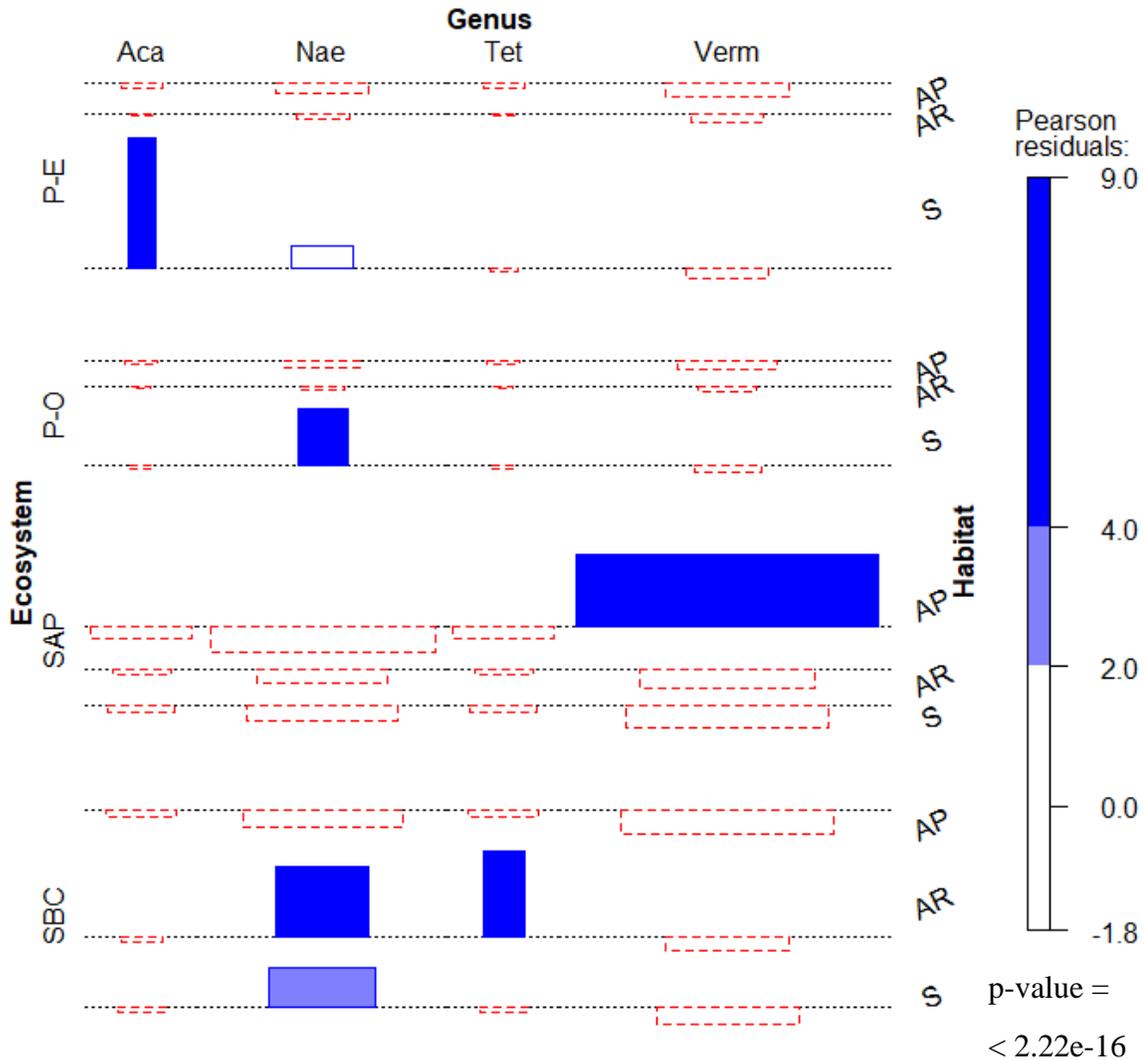


Figura 17. Esquema que muestra la diversidad taxonómica de los géneros encontrados (y sus grupos externos) además de su asociación con los ambientes de los que fueron aislados.

El género *Acanthamoeba* fue encontrado en el suelo del bosque de pino-encino. *Naegleria* fue recuperada del suelo del bosque de pino-encino y del bosque de pino-oyamel, pero fue más prevalente en muestras de la selva baja caducifolia, donde fue encontrado tanto en agua de río

como en el suelo. *Tetramitus* se aisló únicamente de muestras de la selva baja caducifolia, en el agua de río. Por último, *Vermamoeba* fue el único género recuperado del agua potable distribuida por SAPAC. Se evaluó la hipótesis nula de no asociación entre los géneros de AVL, su hábitat y ecosistema de origen, la cual es fuertemente rechazada: $p < 2.22e^{-16}$ (Figura 18).



SAP: sistema agua potable	SBC: selva baja caducifolia	P-O: pino-oyamel
P-E: pino-encino	AP: agua potable (SAPAC)	AR: agua de río
S: suelo	Aca: <i>Acanthamoeba</i>	Nae: <i>Naegleria</i>
Tet: <i>Tetramitus</i>	Verm: <i>Vermamoeba</i>	

Figura 18. Prueba de X^2 de triple vía de la asociación y significancia entre los géneros de AVL encontrados en el estudio, sus hábitats y ecosistemas de origen medida como residuos de Pearson. Las barras indican los valores de los residuos de Pearson para cada contraste. El color de la barra indica la significancia del contraste específico, su altura el valor del residuo, su ancho el tamaño de la muestra y el sentido si la desviación es positiva o negativa.

8. Discusión

En este estudio se hizo una caracterización molecular y morfológica de AVL recuperadas de diversos hábitats y ecosistemas de Morelos.

En total se obtuvieron 35 aislados, como se muestra en la Tabla 7, de los cuales se obtuvieron 33 secuencias de calidad. Se logró obtener al menos un aislado de cada uno de los puntos de muestreo, demostrando que la técnica de enriquecimiento con agar no nutritivo y *E. coli* (Jacquier *et al.* 2013) es útil para recuperar AVL provenientes de muestras de suelo, sedimento, plantas acuáticas y cuerpos de agua.

De los estudios realizados en México, solo uno de ellos presenta números de acceso a secuencias de Genbank y es un estudio únicamente enfocado a encontrar al género *Naegleria* (Guzmán-Fierros *et al.* 2008). Por otro lado, los estudios morfológicos en su mayoría no presentan fotografías y los estudios que las presentan no incluyen todos los géneros encontrados, por lo que la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con el resto de los trabajos del país solo es posible con uno de ellos (Bonilla-Lemus *et al.* 2020).

En este trabajo, además de que ser el primero en su tipo en el que se recolectaron muestras de suelo en el país (Figura 19), también se generó una cantidad importante de secuencias (33), las cuales podrán ser utilizadas en futuros trabajos nacionales e internacionales para contrastar sus resultados con los presentados en este estudio. Las secuencias generadas en este estudio no se encuentran disponibles públicamente, ya que este trabajo no se ha publicado aún, pero eventualmente se subirán a la base de datos de NCBI.

El medio de cultivo que se ha empleado en la mayor parte de los estudios nacionales (Tabla 3) y en este trabajo, ha sido el mismo: agar no nutritivo con bacterias. Es posible que exista un sesgo entre los géneros que se pueden aislar mediante esta técnica, debido a que se ha demostrado que diferentes medios son capaces de aislar diferentes géneros (Mrva y Garajová 2018). A futuro se deberá diversificar la colección de medios de cultivo para obtener un muestreo más amplio de la diversidad de AVL.

Respecto a los primers que se evaluaron en este estudio, F-566 y R-1200 fue la pareja que mostró la mejor cobertura filogenética, especificidad, afinidad e intensidad (Figuras 5-9). Esta pareja se

encuentra flanqueando la región “V4” del gen 18S rRNA (la región más variable de este gen en eucariontes, lo cual facilita realizar estudios de diversidad), tiene condiciones óptimas en PCR, genera una secuencia con un buen tamaño promedio (aprox. 700 ntds) y al utilizarla para secuenciar presentó secuencias de buena calidad. Además, esta sección solapa con la región ASA.S1 (en la Figura 3 se observa como los primers seleccionados cubren la región amplificada por los primers JDP1 y JDP2), la cual, como se mencionó en el marco teórico, es utilizada para determinar la diversidad dentro del género *Acanthamoeba* (Schroeder et al. 2001).

Además, las pruebas *in silico* realizadas en el estudio que publicó los primers, detectaron que se unen al 80% de las secuencias eucariotas encontradas en la base de datos SILVA, excluyendo únicamente a 8 grupos (Hadziavdic *et al.* 2014), los cuales, al ser grupos de animales, algas y hongos, indica que son óptimos para estudiar la diversidad ambiental de AVL.

La capacidad de estos primers para unirse a una gran cantidad de secuencias 18S rRNA es importante, ya que, para estudiar la diversidad de un grupo polifilético como las AVL, se necesitan primers eucariotas universales que puedan unirse a todos los grupos en los que se encuentren. Aquí demostramos su utilidad para analizar la diversidad molecular de los super grupos Amoebozoa y Discoba. Hasta donde sabemos, nunca se habían utilizado estos primers para el estudio de AVL.

Emplear el gen 18S rRNA como una primera aproximación para un estudio de diversidad resulta conveniente, debido a que es el marcador más abundante en la base de datos de GenBank, lo que también influye en que secuencias de diversos géneros de AVL se encuentren ampliamente caracterizadas, facilitando así la identificación de los aislados obtenidos. Este marcador, al ser de amplio espectro, y unirse a una región conservada, nos ayudó a identificar los géneros de nuestros aislados empleando un solo par de primers. Por otro lado, trabajar con la región más divergente del gen dificulta el alineamiento, ya que las secuencias son filogenéticamente lejanas. Realizar los alineamientos de perfiles fue una aproximación útil permitió generar un alineamiento de calidad. Esta aproximación no ha sido reportada en la literatura relacionada a AVL.

Otra limitante del gen 18S rRNA es que no contiene suficiente variación debajo del nivel de género para definir especies, debido a su baja tasa de evolución y escaso polimorfismo intraespecífico. Se ha propuesto el gen COI (citocromo oxidasa 1 mitocondrial) como un buen marcador para AVL, ya que ha resultado útil por su alta resolución a nivel de especie y su potencial para distinguir entre

especies crípticas de AVL de los géneros *Vannella*, *Nebela* y *Quadrullella* (Nassonova *et al.* 2010; Kosakyan *et al.* 2012 y 2016).

COI ya ha sido sugerido como el marcador universal para realizar el sistema “código de barras de la vida” en especies de animales (Hebert *et al.* 2003), pero aún falta ampliar las bases de datos de COI en AVL para estar seguros de que también sea un buen candidato para diversos linajes de este grupo polifilético. También se ha recomendado emplear análisis multilocus para obtener un estudio que nos permita delimitar a las especies (Tekle *et al.* 2008; Lahr *et al.* 2014; Fučíková y Lahr, 2015).

En este trabajo pudimos clasificar todos los aislados a nivel de género, los cuales abarcan: *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Tetramitus* y *Naegleria*. Estos mostraron formar clados monofiléticos en todos los casos, con un alto soporte que puede ser observado en el análisis filogenético de máxima verosimilitud (Figura 12).

Dentro de los aislados obtenidos en el estudio se puede observar la baja resolución del 18S rRNA en el género *Vermamoeba* en el análisis de distancias pareadas (Tabla 10) que también se refleja en el árbol encontrado (Figura 12), donde se encuentran en un mismo cluster. Los resultados son comparables con un estudio realizado en 2018, el cual mostró que con todas las secuencias disponibles públicamente del gen 18S rRNA en *Vermamoeba* muestra una divergencia menor a 1% dentro del género (Delafont *et al.* 2018). Sin embargo, un estudio realizado con las únicas dos secuencias COI en este género mostró una considerable divergencia entre ellas (Fučíková y Lahr 2015). Esto sugiere la posibilidad de una diversidad críptica del género eclipsada por el uso de 18S rRNA como marcador.

Vermamoeba se ha encontrado en una gran cantidad de ecosistemas naturales y ecosistemas artificiales (Delafont *et al.* 2018). En este trabajo encontramos que todos nuestros aislados de *Vermamoeba* fueron obtenidos de sistemas de conducción de agua, lo que es similar a la conclusión de Wang *et al.* 2012, quienes reportan que se trata del género con mayor presencia en sistemas de conducción de agua. También se ha encontrado en sistemas de agua en hospitales, representando un riesgo para la salud debido a la presencia de patógenos intracelulares que poseen (Pagnier *et al.* 2015; Lasjerdi *et al.* 2011, 2015). Este puede ser el motivo por el cual en años recientes este género ha sido más estudiado (Figura 20).

Este trabajo es el primero en mostrar mediante métodos moleculares la presencia de *Vermamoeba vermiformis* en sistemas de conducción de agua potable en el país.

El análisis mostrado en la Figura 18 mostró una fuerte asociación estadística entre *Vermamoeba* y su presencia en los sistemas de conducción de agua domésticos, ya que en ese caso todos los aislados de este género provinieron de estos ambientes. La presencia de *Vermamoeba* en sistemas de conducción de agua potable puede ser causado por proceso de desinfección insuficiente, ya que en estudios *in vitro* se ha demostrado que los quistes de *Vermamoeba* no son resistentes a los sistemas de desinfección de agua estándares (Fouque *et al.* 2015). A pesar de esto, el mismo estudio sugiere que las condiciones *in vitro* no reflejan correctamente el ecosistema que se encuentra en los sistemas de conducción de agua, por lo que estudios *in situ* son necesarios.

En los trabajos realizados en México se ha reportado la presencia de *Vermamoeba* en 8 de los 15 estudios de diversidad realizados (sin considerar los que específicamente buscaban *Naegleria*). No se sabe si en 3 de estos estudios realmente se obtuvo este género, porque es mencionado el género “*Hartmannella*”, en el que antes se clasificaba a *Vermamoeba vermiformis* (Smirnov *et al.* 2011). Al no presentar secuencias, no es posible asegurar si realmente se trata de *Vermamoeba*. Incluso si se hubiera incluido fotografías sería complicado identificar al género, ya que *Hartmannella*, *Vermamoeba* y muchos géneros del grupo Tubulinea presentan el mismo morfotipo (Smirnov y Brown 2004). La ventaja de la obtención de secuencias es la comparación objetiva de estas con otros estudios, que evitaría problemas de esta índole.

Para el género *Acanthamoeba*, principalmente se ha empleado el gen 18S rRNA al identificar los genotipos, debido a que se considera que la región ASA.S1 es suficiente para poder obtener una buena resolución de estos, similar a los resultados que se obtienen al emplear el gen 18S rRNA completo (Fuerst *et al.* 2015). En nuestro estudio se encontraron dos aislados de *Acanthamoeba* del genotipo T13, similar a una cepa obtenida en el Tíbet, China (Geisen *et al.* 2014). En el árbol encontrado (Figura 12) se logra observar la separación de estos genotipos con nuestro aislado clínico NEFF, sin embargo, se necesitan más cepas de este género para poder discutir en este trabajo sobre la eficiencia del gen 18S rRNA y la región ASA.S1. Es importante resaltar que los primers F-566 y R-1200 solapan a la región ASA.S1, pero generan un amplicón de mayor tamaño y de buena calidad (466 vs. 871 como se observa en la Figura 3). Por lo tanto, se recomienda el uso de los primers F-566 y R-1200 para futuros análisis de diversidad de *Acanthamoeba*.

El género *Acanthamoeba* ha sido aislado en diversos países y puede ser encontrado en todo tipo de ambientes, aunque principalmente se han encontrado en los suelos (Rodríguez-Zaragoza 1994; Geisen *et al.* 2014), lo que coincide con nuestros aislados 5HKMJS2 y 4MJS2, que únicamente fueron recuperados de suelo del bosque pino-encino. En México ha sido encontrado en 14 de los 15 estudios realizados de diversidad general, en ambientes acuáticos variados. Por su papel en los casos clínicos y su presencia en la mayoría de los estudios de diversidad, este género ha sido de los más estudiados (Figura 20). Este es el género de AVL más encontrado en los casos clínicos (Visvesvara *et al.* 2007).

En el caso de *Naegleria*, los genes ribosomales se encuentran en plásmidos extracromosomales (Nguyen *et al.* 2021), que han sido los principales marcadores moleculares para la definición de especies, en especial la región “ITS1,5.8S, ITS2”, siendo la región ITS2 la más informativa (De Jonckheere 2004; De Jonckheere 2014).

Aislados de *Naegleria* son recuperados comúnmente de cuerpos de agua natural y artificial a lo largo del mundo (Tymel *et al.* 2016; Khwon y Park 2017; Di Filippo *et al.* 2017; Javanmard *et al.* 2017). En el análisis de asociación estadística (Figura 18) se puede observar como el género *Naegleria* es el que representa una mayor distribución de hábitats y ecosistemas, ya que fue aislado de muestras suelo de bosque templado y en muestras de agua fresca y suelo de selva baja caducifolia. Dada la escasa resolución del marcador empleado, el análisis de asociación está limitado a nivel de género, por lo que perdemos cierta información que la identificación específica de los aislados nos podría proporcionar con relación a los factores ambientales de los aislados.

En México, *Naegleria* ha sido reportado en 16 de los 17 estudios realizados. En el país ha habido trabajos enfocados a encontrar únicamente a *Naegleria* (Tabla 3). El interés por estudiar este género puede ser atribuido al papel patológico que representa la especie *N. fowleri* en el país y el resto del mundo (Vargas-Zepeda *et al.* 2005; Visvesvara *et al.* 2007), lo que ha conducido al género a ser considerablemente estudiado (Figura 20). *Naegleria gruberi* es un importante modelo en estudios de biología celular (Unciuleac y Shuman 2015; Herman *et al.* 2018).

En los estudios moleculares realizados en el género *Tetramitus* se ha empleado el gen 18S rRNA y la región “ITS1,5.8S, ITS2”, esta última siendo la más usada, para la identificación de especies (De Jonckheere y Brown 2005). Sin embargo, no se conoce aún el nivel de polimorfismo intraespecífico dentro del grupo Heterolobosea, por lo cual se desconoce si estos marcadores son

adecuados (Pánek y Čepička 2012). Un claro ejemplo acerca de la falta de estándares para delimitar especies es la existencia de especies dentro de este género que son consideradas nuevas a pesar de tener una similitud en sus secuencias ITS1,5.8S,ITS2 mayor a 99% (Park 2017). Nuestros aislados TS37-1 y TS37-2 mostraron ser similares a un aislado de *T. dokdoensis*; pero se deberán obtener las secuencias de los marcadores ITS1,5.8S,ITS2 para poder asegurarnos de la especie.

Tetramitus suele encontrarse en baja frecuencia en la mayoría de los estudios de diversidad. Sin embargo, en 2 estudios moleculares, enfocados en la región ITS1-5,8S-ITS2, realizados en África resultó ser el género más prevalente, identificando en uno de ellos únicamente a nivel de género (Denet *et al.* 2017) y en el otro se identificaron 2 especies: *T. waccamawensis* y *T. entericius* (Farra *et al.* 2017).

Han sido aislados de cuerpos de agua desde 6°C (Robinson *et al.* 2007) hasta 52°C (Reeder *et al.* 2015), siendo encontrado principalmente en cuerpos de agua dulce (De Jonckheere 2007; Park 2017). En este trabajo se aisló el género *Tetramitus* de sedimento de río, lo cual coincide con la literatura citada anteriormente sobre la presencia del género en cuerpos de agua dulce.

En México solo se ha reportado un caso del género, en un estudio morfológico realizado en Morelos, mencionando que se trata de la especie *T. rostratus* (Ramírez *et al.* 2009). En este estudio se identifica por primera vez con técnicas moleculares la presencia del género *Tetramitus* en México. Este género ha sido el menos reportado en México de los obtenidos en este trabajo y de manera general ha sido muy poco estudiado (Figura 20).

Se puede observar en la Figura 19 la homogeneidad con la cual se realizan los estudios de diversidad de AVL en el país, los cuales en su mayoría son morfológicos, realizados en ambientes acuáticos y con un medio de cultivo que actúa como filtro para ciertos géneros y/o especies. Esto muestra la importancia de actualizar los estándares y aproximaciones de estudios que nos permitirán obtener una representación más realista en torno a la diversidad de AVL en el país.

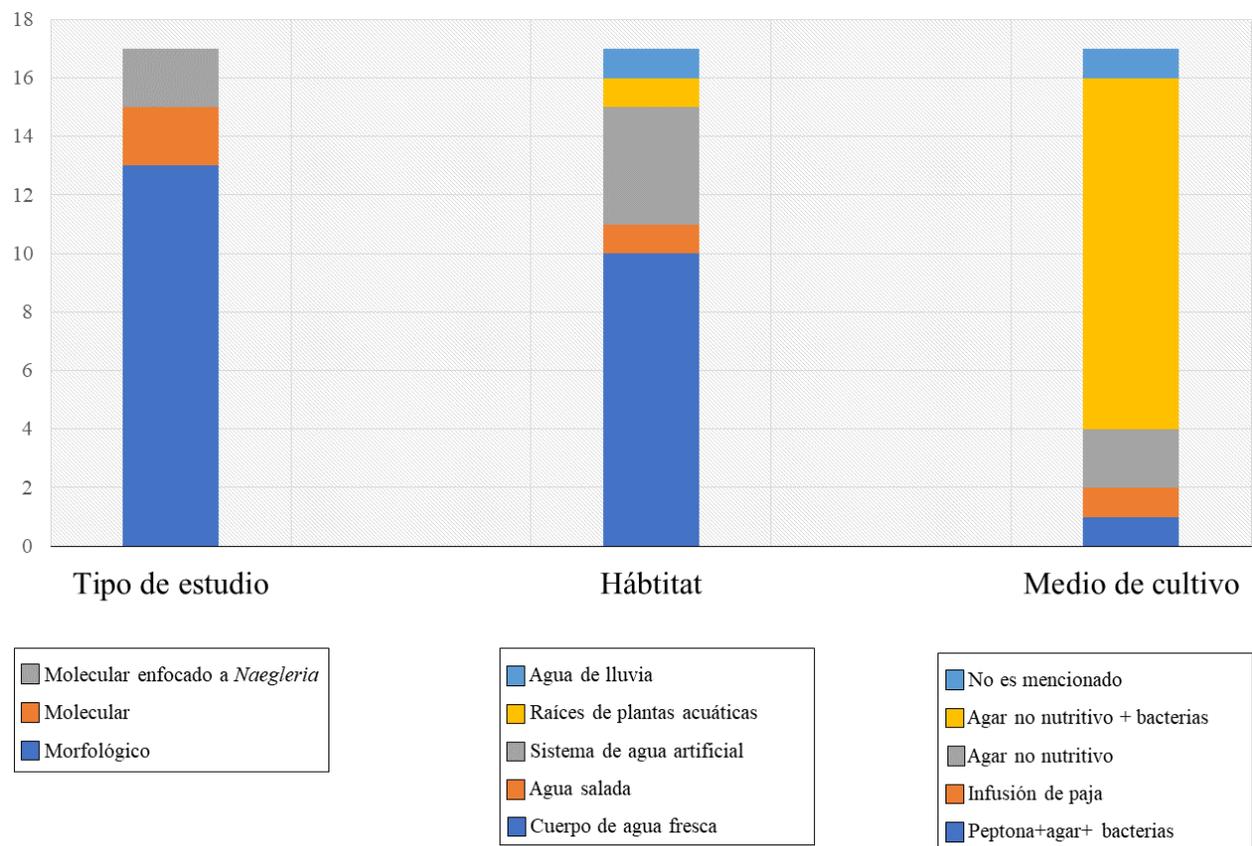


Figura 19. Datos referentes al muestreo, aislamiento e identificación de las muestras en los antecedentes mexicanos consultados. Pueden ser consultados en la Tabla 3.

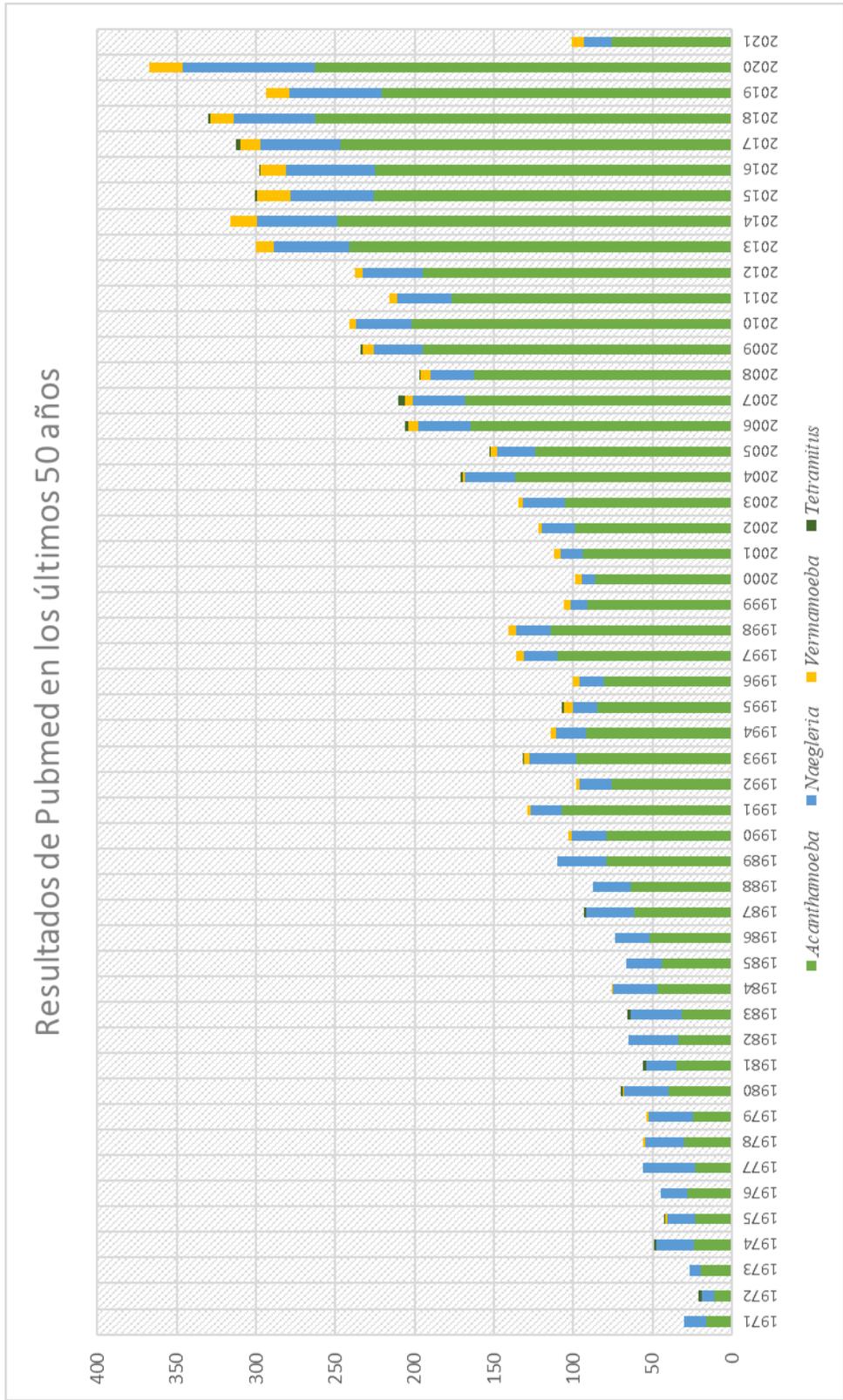


Figura 20. Entradas en Pubmed a lo largo de los últimos 50 años que muestran la cantidad de artículos encontrados para cada uno de los 4 géneros encontrados en este estudio.

9. Conclusiones

Para el estudio de la diversidad ambiental de AVL, se recomienda implementar estándares moleculares para identificar y registrar los aislados, lo que permitirá la comparación eficiente de resultados en estudios a futuro. Reportamos por primera vez el uso de primers F-566 y R-1200 para el estudio de diversidad ambiental de AVL, demostrando su superioridad a los primers previamente utilizados. Dichos primers pudieron generar secuencias para los 33 aislados purificados en este trabajo de los 8 puntos de muestreo ubicados en ambientes contrastantes del estado de Morelos.

Este trabajo implementa por primera vez, en México, filogenias de máxima verosimilitud para analizar la diversidad de AVL con base a secuencias de 18S rRNA, permitiendo la identificación inequívoca de todos los aislados a nivel de género.

La clasificación molecular fue consistente con el análisis microscópico de morfología de los aislados.

Se encontró una fuerte asociación estadística entre los géneros encontrados y los hábitats de los que fueron recuperados, por lo que podría haber una relación más estrecha entre éstos de lo que se piensa, por lo que este tipo de análisis, al ser implementados con aislados identificados a nivel de especie, podrían ayudar a descubrir asociaciones entre los aislados y sus variables ambientales.

Para futuros estudios sería deseable obtener y analizar una mayor cantidad de aislados de distintos ecosistemas y hábitats, además de emplear diversos medios de cultivo. También se debe considerar que para la identificación a nivel de especie son necesarios análisis multilocus que evitarán basar la clasificación específica en la filogenia de un solo gen, ya que estrictamente ésta no es una filogenia de especie. Estas recomendaciones permitirán obtener un resultado más representativo de la diversidad de estos organismos.

10. Literatura citada

- Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, O., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. y Taylor, M. (2005), The New Higher Level Classification Of Eukaryotes With Emphasis On The Taxonomy Of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52, 399-451.
- Adl, S., Bass, D., Lane, C., Lukeš, J., Schoch, C., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., James, T., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D., Mann, D., Massana, R., Mitchell, E., Morrow, C., Park, J., Pawlowski, J., Powell, M., Richter, D., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V. y Zhang, Q. (2018), Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 66, 4-119.
- Andrade, M., Carrasco, M., Ortíz, R., Ibarra, R., Carmona, J., y Bonilla, P. (2015) Amibas de vida libre y potencialmente patógenas de ríos de la Cuenca de México. *Tendencias de Investigación*, 115-122.
- Barta, J., Martin, D., Liberator, P., Dashkevich, M., Anderson, J., Feighner, S., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M., Danforth, H., Ruff, M., y Profous-Juchelka, H. (1997). Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of parasitology*, 83(2), 262–271.
- Baumgartner, M., Yapi, A., Gröbner-Ferreira, R. y Stetter, K. (2003) Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* n. sp., an extremely thermophilic amoeba thriving in hot springs. *Extremophiles* 7, 267–274.
- Baumgartner, M., Eberhardt, S., De Jonckheere, J. y Stetter, K. (2009). *Tetramitus thermacidophilus* n. sp., an amoeboflagellate from acidic hot springs. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 201-206.
- Bell, E. y Weithoff, G. (2008). Recruitment of Heliozoa, rhizopods and rotifers from the sediments of an extremely acidic lake during spring and early summer. *Lakes & Reservoirs. Research & Management*. 13. 105 - 115.
- Bonilla-Lemus, P., Ramírez-Bautista, G., Zamora-Muñoz, C., del Rocío Ibarra-Montes, M., Ramírez-Flores, E., y Hernández-Martínez, M. (2010). *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Experimental parasitology*, 126(1), 54-58.
- Bonilla-Lemus, P., Villegas, A., Jiménez, J. y Vázquez, A. (2014). Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Experimental parasitology*, 145, 28-33.
- Bonilla-Lemus, P., Rojas-Hernández, S., Ramírez-Flores, E., Castillo-Ramírez, D., Monsalvo-Reyes, A., Ramírez-Flores, M., Barrón-Garciano, K., Reyes-Battle, M., Lorenzo-Morales, J. y Carrasco-Yépez, M. (2020). Isolation and Identification of *Naegleria* Species in Irrigation Channels for Recreational Use in Mexicali Valley, Mexico. *Pathogens*, 9(10), 820.
- Bolivar, I., Fahrni, J., Smirnov, A. y Pawlowski, J. (2001). SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Molecular biology and evolution*, 18(12), 2306-2314.
- Brown, S. y De Jonckheere, J. (1999). A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSUrDNA sequences. *European Journal of Protistology*, 35(1), 49-54.
- Brown, M., Silberman, J. y Spiegel, F. (2011). “Slime molds” among the Tubulinea (Amoebozoa): molecular systematics and taxonomy of Copromyxa. *Protist*, 162(2), 277-287.
- Bunting, M. (1922). A preliminary note on *Tetramitus*, a stage in the life cycle of a coprozoic amoeba. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 8(10), 294.
- Butler, H. y Rogerson A. (2000). Naked amoebae from benthic sediments in The Clyde Sea area, Scotland, *Ophelia*, 53(1), 37-54.

- Clark, C. y Cross, G. (1988). Small-subunit ribosomal RNA sequence from *Naegleria gruberi* supports the polyphyletic origin of amoebas. *Molecular biology and evolution*, 5(5), 512-518.
- CONABIO y UAEM (2004). La Diversidad Biológica en Morelos: Estudio del Estado. Contreras-MacBeath, T., Boyás, J., Jaramillo, F. (editores). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.
- Darriba D., Taboada G., Doallo R. y Posada D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- De Jonckheere, J. (2004). Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist*, 155(1), 89-103.
- De Jonckheere, J. y Brown, S. (2005). The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist*, 156(1), 89-96.
- De Jonckheere, J. (2007). Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). *European journal of protistology*, 43(1), 9-15.
- De Jonckheere, J. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp Parasitol*, 145, 1–8.
- Delafont, V., Rodier, M., Maisonneuve, E., y Cateau, E. (2018). *Vermamoeba vermiformis*: a free-living amoeba of interest. *Microbial ecology*, 76(4), 991-1001.
- Denet, E., Coupat-Goutaland, B., Nazaret, S., Pélandakis, M. y Favre-Bonté, S. (2017). Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitology Research*, 116(11), 3151–3162.
- Di Filippo, M., Novelletto, A., Di Cave, D., y Berrilli, F. (2017). Identification and phylogenetic position of *Naegleria* spp. from geothermal springs in Italy. *Experimental parasitology*, 183, 143-149.
- Dumack, K., Koller, R., Weber, B. y Bonkowski, M. (2016). Estimated abundance and diversity of heterotrophic protists in South African biocrusts. *South African Journal of Science*, 112(7-8), 1-5.
- Farra, A., Bekondi, C., Tricou, V., Mbecko, J. y Talarmin, A. (2017). Free-living amoebae isolated in the Central African Republic: epidemiological and molecular aspects. *Pan African Medical Journal*, 26(1), 1-10.
- Fouque, E., Héchar, Y., Hartemann, P., Humeau, P. y Trouilhé, M. (2015). Sensitivity of *Vermamoeba* (*Hartmannella*) *vermiformis* cysts to conventional disinfectants and protease. *Journal of water and health*, 13(2), 302-310.
- Fučíková, K., y Lahr, D. (2015). Uncovering cryptic diversity in two amoebozoan species using complete mitochondrial genome sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 112-122.
- Fuerst, P., Booton, G. y Crary, M. (2015). Phylogenetic Analysis and the Evolution of the 18S rRNA Gene Typing System of *Acanthamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), 69–84.
- Gabr, N., Mohamed, R., Belal, U., Abdel-Fatah, M., Ahmed, R., Gaber, N. y Abdel-Hafeez, E. (2021). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* species from air conditioning systems, Egypt. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 74(3), 180-186.
- Gallegos-Neyra, E., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., del Rosario Sánchez-Rodríguez, M. y Mayén-Estrada, R. (2014). Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 10-25.
- Gallegos-Neyra, E., Cigarroa, J., Méndez, M., Zuno, S., Zamarripa, A., Romero, M., Corona, A., Venegas, J. y Delavequia, G. (2018). Amibas de vida libre en playas de Tuxpan y Arrecife Ingeniero, Veracruz, México. *Revista de Zoología*, 29, 1-5.
- Gallegos-Neyra, E., Barrientos, J., Estrada, R., Arzola, J., Romero, M. y Arzola, A. (2019). Primer registro de amibas de vida libre en el balneario natural "Hierve el Agua" en el municipio de San Lorenzo Albarradas, estado de Oaxaca. *Revista de Zoología*, 30, 1-11.
- García, A., Goñi, P., Cieloszyk, J., Fernández, M., Calvo-Beguería, L., Rubio, E., Fillat, M., Peleato, M. y Clavel, A. (2013). Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environmental science & technology*, 47(7), 3132-3140.
- Garstecki, T. y Arndt, H. (2000). Seasonal abundances and community structure of benthic rhizopods in shallow lagoons of the Southern Baltic Sea. *European Journal of Protistology*, 36, 103-115.
- Geisen, S., Fiore-Donno, A., Walochnik, J. y Bonkowski, M. (2014). *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitology Research*, 113(9), 3151–3158.

- Gouy M., Guindon S. y Gascuel O. (2010) SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2),221-224.
- Guindon, S., Dufayard, J., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. y Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307-321.
- Guzmán-Fierros, E., De Jonckheere, J. y Lares-Villa, F. (2008). Identificación de especies de Naegleria en sitios recreativos en Hornos, Sonora. *Revista mexicana de biodiversidad*, 79(1), 1-5.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. y Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS one*, 9(2), e87624.
- Hauer, G., Rogerson, A. y Anderson, O. (2001). *Platyamoeba pseudovannellida* N. Sp., a Naked Amoeba With Wide Salt Tolerance Isolated from the Salton Sea, California. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, 663-669.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. y Dewaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Herman, E., Yiangou, L., Cantoni, D., Miller, C., Marciano-Cabral, F., Anthonyrajah, E., Dacks, J. y Tsaousis, A. (2018). Identification and characterisation of a cryptic Golgi complex in Naegleria gruberi. *Journal of cell science*, 131(7), jcs213306.
- Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J. y Greub, G. (2013). Discovery of New Intracellular Pathogens by Amoebal Coculture and Amoebal Enrichment Approaches. *J. Vis. Exp.*, 80.
- Javanmard, E., Niyiyati, M., Lorenzo-Morales, J., Lasjerdi, Z., Behniafar, H. y Mirjalali, H. (2017). Molecular identification of waterborne free living amoebae (Acanthamoeba, Naegleria and Vermamoeba) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran. *Experimental parasitology*, 183, 240-244.
- Javaux, E., Knoll, A. y Walter, M. (2001). Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature*, 412(6842), 66-69.
- Jeong, H. y Yu, H. (2005). The role of domestic tap water in Acanthamoeba contamination in contact lens storage cases in Korea. *The Korean journal of parasitology*, 43(2), 47.
- Jercic, M., Aguayo, C., Saldarriaga-Córdoba, M., Muiño, L., Chenet, S., Lagos, J., Osuna, A. y Fernández, J. (2019). Genotypic diversity of Acanthamoeba strains isolated from Chilean patients with Acanthamoeba keratitis. *Parasites & vectors*, 12(1), 58.
- Khan, N. (2015) Acanthamoeba, Biology and Pathogenesis. *Caister Academic Press*. Reino Unido.
- Khwon, W. y Park, J. (2017). Morphology and Phylogenetic Analyses of Three Novel Naegleria Isolated from Freshwaters on Jeju Island, Korea, During the Winter Period. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(1), 61-69.
- Kosakyan, A., Heger, T., Leander, B., Todorov, M., Mitchell, E. y Lara, E. (2012). COI barcoding of Nebelid testate amoebae (Amoebozoa: Arcellinida): extensive cryptic diversity and redefinition of the Hyalospheniidae Schultze. *Protist*, 163(3), 415-434.
- Kosakyan, A., Lahr, D., Mulot, M., Meisterfeld, R., Mitchell, E. y Lara, E. (2016). Phylogenetic reconstruction based on COI reshuffles the taxonomy of hyalosphenid shelled (testate) amoebae and reveals the convoluted evolution of shell plate shapes. *Cladistics*, 32(6), 606-623.
- Kudryavtsev, A. y Pawlowski, J. (2013). *Squamamoeba japonica* n. g. n. sp. (Amoebozoa): A Deep-sea Amoeba from the Sea of Japan with a Novel Cell Coat Structure. *Protist*, 164(1), 13-23.
- Lahr, D., Laughinghouse, H., Oliverio, A., Gao, F. y Katz, L (2014). How discordant morphological and molecular evolution among microorganisms can revise our notions of biodiversity on Earth. *BioEssays*, 36,950-959.
- Lares-Jiménez, L. y Lares-Villa, F. (2009). Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5(2), 161-167.
- Lares-Jiménez, L., Borquez-Román, M., Lares-García, C., Otero-Ruiz, A., Gonzalez-Galaviz, J., Ibarra-Gámez, J. y Lares-Villa, F. (2018). Potentially pathogenic genera of free-living amoebae coexisting in a thermal spring. *Experimental parasitology*, 195, 54-58.
- Lasjerdi, Z. , Niyiyati, M. ,Haghighi, A., Shahabi, S., Biderouni, F., Taghipour, N., Eftekhari, M. y Mojarad, E. (2011). Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran Iran. *Parasitology research*. 109. 575-80.
- Lasjerdi Z, Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Haghighi A. y Taghipour N. (2015). Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living amoebae in Iran, *Acta Parasitol*, 60,417-422.

- Letunic, I. y Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*, 47(W1), W256-W259.
- Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Hon-igberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, D., Page, F., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27,37–58.
- Ligrone, R. (2019). Biological Innovations that Built the World. A Four-billion-year Journey through Life and Earth History. *Springer*. Switzerland.
- López-Ochoa, E. y Madrazo, M. (1979) La contribución de C.G. Ehrenberg al conocimiento de los protozoarios de vida libre en México. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México* 50, Ser. *Zoología*, 1, 739-724.
- Mrva, M. y Garajová, M. (2018). The efficiency of cultivation media in recovering naked lobose amoebae from freshwater environments. *Zoological studies*, 57.
- Murzov, S. y Caron, D. (1996) Sporadic high abundances of naked amoebae in Black Sea plankton: Aquatic Microbial Ecology. *Aquat. Microb. Ecol.* 11 (2) 161-169.
- Nassonova, E., Smirnov, A., Fahrni, J. y Pawlowski, J. (2010). Barcoding Amoebae: Comparison of SSU, ITS and COI Genes as Tools for Molecular Identification of Naked Lobose Amoebae. *Protist*, 161(1), 102–115.
- Nguyen, B., Chapman, N., Tracy, S. y Drescher, K. (2021). The extrachromosomal elements of the Naegleria genus: How little we know. *Plasmid*, 102567.
- Page, F. (1976). “An Illustrated Key to Fresh Water and Soil Amoebae.” Titus Wilson, Kendal, England.
- Page, F. (1988). A new key to freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association. Cumbria, England. 122 pp.
- Pagnier I., Valles C., Raoult D., y La Scola B. (2015) Isolation of Vermamoeba vermiformis and associated bacteria in hospital water. *Microb Pathog*, 80,14–20.
- Pánek, T. y Čepička, I. (2012). Diversity of heterolobosea. *Genet. Divers. Microorg*, 10(5772), 35333.
- Park, J. (2017). A New Heterolobosean Amoeboflagellate, Tetramitus dokdoensis n. sp., Isolated from a Freshwater Pond on Dokdo Island in the East Sea, Korea. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(6), 771–778.
- Paszko-Kolva, C. Yamamoto, H., Shahamat, M., Sawyer, T., Morris, G. y Colwell, R. (1991). Isolation of amoebae and Pseudomonas and Legionella spp. from eyewash stations. *Applied and environmental microbiology*, 57(1), 163-167.
- Pélandakis, M., De Jonckheere, J. y Pernin, P. (1998). Genetic Variation in the Free-Living Amoeba Naegleria fowleri. *Applied and environmental microbiology*, 64(8), 2977-2981.
- Ramírez, E., Robles, E., Sainz, M., Ayala, R. y Campoy, E. (2009) Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4) 247-255.
- Ramirez, E., Robles, E., y Martinez, B. (2010). Free-living amoebae isolated from water-hyacinth root (Eichhornia crassipes). *Experimental parasitology*, 126(1), 42-44.
- Ramirez, E., Robles, E., Martinez, B., Ayala, R., Sainz, G., Martinez, M. y Gonzalez, M. (2014). Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. *Experimental parasitology*, 145, 34-38.
- Ramírez, E., Robles, E., Martínez, M., Sainz, M., Martínez, B., Rivas, B. y Rocha, A. (2016). Distribution of free-living amoebae in springs in Morelos, Mexico. *Glo. Adv. Res. J. Microbiol.*, 5(6), 057-067.
- Reeder, W., Sanck, J., Hirst, M., Dawson, S. y Wolfe, G. (2015). The Food Web of Boiling Springs Lake Appears Dominated by the Heterolobosean Tetramitus thermacidophilus Strain BSL. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(3), 374–390.
- Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. y Medina, F. (1983) A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environmental Research* 32, 205-211.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P. y Lares, F. (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environmental Research*, 42(1), 149-154.
- Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Martínez, J., Rodríguez, S. y Alcocer, J. (1989). Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environmental Research*, 50(2), 289-295.

- Robinson, B., De Jonckheere, J. y Dobson, P. (2007). Two new Tetramitus species (Heterolobosea, Vahlkampfiidae) from cold aquatic environments. *European Journal of Protistology*, 43(1), 1–7.
- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of Free-living Amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*, 20(3):225-241.
- Rogerson, A. y Laybourn-Parry, J. (1992) The abundance of marine naked amoebae in the water column of the Clyde estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 34 (2). 187-196.
- Rogerson, A. y Gwaltney, C. (2000). High Numbers of Naked Amoebae in the Planktonic Waters of a Mangrove Stand in Southern Florida, USA. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47, 235-241.
- Rogerson, A. y Hauer, G. (2002). Naked amoebae (Protozoa) of the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* 473, 161–177 .
- Ruggiero M., Gordon D., Orrell T., Bailly N., Bourgoin T., Brusca R., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. y Kirk, P. (2015) A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLOS ONE* 10(4).
- Scaglia, M., Strosselli, M., Grazioli, V., Gatti, S., Bernuzzi, A. y De Jonckheere, J. (1983). Isolation and identification of pathogenic Naegleria australiensis (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Applied and environmental microbiology*, 46(6), 1282-1285.
- Schroeder, J., Booton, G., Hay, J., Niszl, I., Seal, D., Markus, M., Fuerst, P. y Byers, T. (2001). Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1903-1911.
- Schulz, F., Tyml, T., Pizzetti, I., Dyková, I., Fazi, S., Kostka, M. y Horn, M. (2015). Marine amoebae with cytoplasmic and perinuclear symbionts deeply branching in the Gammaproteobacteria. *Scientific reports*, 5(1), 1-10.
- Seneviratna, A. y Waidyasekera, P. (1995) Ecology and distribution of soil protozoa in the Bellanwila wetland. *Vidyodaya J. of Sci.* 5 (1). 79-87.
- Shaheen, M., Scott, C., y Ashbolt, N. (2019). Long-term persistence of infectious Legionella with free-living amoebae in drinking water biofilms. *International journal of hygiene and environmental health*, 222(4), 678-686.
- Shmakova, L. y Rivkina, E. (2015). Viable eukaryotes of the phylum Amoebozoa from the Arctic permafrost. *Paleontol. J.* 49, 572–577.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J y Higgins D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7,539.
- Singh, T. y Coogan, M. (2005). Isolation of pathogenic Legionella species and legionella-laden amoebae in dental unit waterlines. *Journal of Hospital Infection*, 61(3), 257-262.
- Smirnov, A., Nassonova, E., Holzmann, M. y Pawlowski, J. (2002). Morphological, ecological and molecular studies of Vannella simplex Wohlfarth-Bottermann 1960 (Lobosea, Gymnamoebia), with a new diagnosis of this species. *Protist*, 153(4), 367-377.
- Smirnov, A. y Brown, S. (2004). Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*, 3, 148–190.
- Smirnov, A. y Kudryavtsev, A. (2005). Pellitidae n. fam.(Lobosea, Gymnamoebia)—a new family, accommodating two amoebae with an unusual cell coat and an original mode of locomotion, Pellita catalonica ng, n. sp. and Pellita digitata comb. nov. *European journal of protistology*, 41(4), 257-267.
- Smirnov, A., Nassonova, E., Chao, E. y Cavalier-Smith, T. (2007). Phylogeny, evolution, and taxonomy of vannellid amoebae. *Protist*, 158(3), 295-324.
- Smirnov, A., Chao, E., Nassonova, E. y Cavalier-Smith, T. (2011). A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist*, 162(4), 545-570.
- Sudhir Kumar, G., Michael L., Christina K. y Koichiro T. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35,1547-1549.
- Taravaud, A., Ali, M., Lafosse, B., Nicolas, V., Féliers, C., Thibert, S., Lévi, Y., Loiseau, P. y Pomel, S. (2018). Enrichment of free-living amoebae in biofilms developed at upper water levels in drinking water storage towers: An inter-and intra-seasonal study. *Science of The Total Environment*, 633, 157-166.

- Tekle, Y., Grant, J., Anderson, O., Nerad, T., Cole, J., Patterson, D. y Katz, L. (2008). Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within 'Amoebozoa' upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(1), 339-352.
- Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. y Greub, G. (2006). Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Applied and environmental microbiology*, 72(4), 2428-2438.
- Tice, A., Shadwick, L., Fiore-Donno, A., Geisen, S., Kang, S., Schuler, G., Spigel, F., Wilkinson, K., Bonokowski, M., Dumack, K., Lahr, D., Voelcker, E., ClauB, S., Zhang, J. y Brown, M. (2016). Expansion of the molecular and morphological diversity of Acanthamoebidae (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biology direct*, 11(1), 1-21.
- Timonen, S., Christensen, S. y Ekelund, F. (2004). Distribution of protozoa in Scots pine mycorrhizospheres. *Soil Biology and Biochemistry*. 36. 1087-1093.
- Tong, S., Vørs, N. y Patterson, D. (1997). Heterotrophic flagellates, centrohelid heliozoa and filose amoebae from marine and freshwater sites in the Antarctic. *Polar Biol* 18, 91-106 .
- Tymł, T., Skulinová, K., Kavan, J., Ditrich, O., Kostka, M. y Dyková, I. (2016). Heterolobosean amoebae from Arctic and Antarctic extremes: 18 novel strains of Allovahlkampfia, Vahlkampfia and Naegleria. *European journal of protistology*, 56, 119-133.
- Unciuleac, M., y Shuman, S. (2015). Characterization of a novel eukaryal nick-sealing RNA ligase from Naegleria gruberi. *RNA*, 21(5), 824-832.
- Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A., Vázquez-Morales, J., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J., y Lares-Villa, F. (2005). Successful treatment of Naegleria fowleri meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Archives of medical research*, 36(1), 83-86.
- Vesaluoma, M., Kalso, S., Jokipii, L., Warhurst, D., Pönkä, A. y Tervo, T. (1995). Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers?. *British journal of ophthalmology*, 79(2), 178-181.
- Visvesvara, G., Moura, H., y Schuster, F. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 1-26.
- Vørs, N. (1992): Heterotrophic Amoebae, Flagellates and Heliozoa from the Tvärminne Area, Gulf of Finland, in 1988-1990, *Ophelia*, 36(1), 1-109.
- Wang, H., Edwards, M., Falkinham, J., y Pruden, A. (2012) Molecular survey of the occurrence of Legionella spp., Mycobacterium spp., Pseudomonas aeruginosa, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol*, 78, 6285-6294.
- Zettler, L., Nerad, T., O'Kelly, C., Peglar, M., Gillevet, P., Silberman, J. y Sogin, M. (2000). A molecular reassessment of the leptomyxid amoebae. *Protist*, 151(3), 275-282.

Cuernavaca, Morelos a 17 de enero de 2022.

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **JUAN MANUEL ZURITA ARTALOITIA**, con el título del trabajo: **Diversidad molecular de amebas de vida libre en diferentes ecosistemas del Estado de Morelos.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el **voto aprobatorio** para que pueda optar por la Modalidad de **Titulación por Tesis** como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO

SECRETARIO: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

VOCAL: DR. PABLO VINUESA FLEISCHMANN

SUPLENTE: DR. FRANCISCO XAVIER GONZÁLEZ COZATL

SUPLENTE: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO | Fecha:2022-01-17 15:50:30 | Firmante

D2PIEj0BNbR4loJ9en3+CGHI+8kyxF0ahiCNcd9eil63VKs58Cpe3b7/zDIP55TcL50vbv714x3F3fTjrn++wFO+H0tHKXqW7uVvF1o5+00NqxKFVtFPQPSAhFumHZlesH2jBglE9bW5kF4Ct6yFDKCEdz6XMxcTScdlusEh2zW//9Y8OowjBPuTbo7iyW0mQ8AgQn7F6arvA/UaLBNgLTceO4kPur6TIT8c8tx9aRpi1S7+RZYroLTByS6MxMvBn+SeXBwU+phCocdM862stay8G50EkSd9kYBhkt3HsvTs2yGey2P0NRMRLJr8zatJeaTOM955bEeVrhKV4l0g==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-01-17 15:56:40 | Firmante

m5gt1tCyDJKB3Qb/tcTfJE3+jmCdCYUzUK4w2BEuscilA3yG/H5HwXXPMtPKptCxI9L0dPIN/WEm44CRqcVqX7ZMfzpDai4oZbLNY+rGHUI5yWyXiP7X+Ra25DvJo0kZTLur8/zPEsOZfnpAPvgSs03ApSAI4jvb0EgL7wRs0BCDT1Onl7muO10ejF82E5fjaBoCkX8127YzONRGnuhl7tkCh96wiDcra34lyT/lylk/QlduNVKhRmk6xQdEsPVQS+D13pgB932GtBOdGGFxCQE3AGmAXBS71wY3MpMpkzYsfX0WrfD1Suf4xyapPmGLN509xELq6ctInfvuJMCOxA==

PABLO VINUESA FLEISCHMANN | Fecha:2022-01-18 10:13:19 | Firmante

P5bOoRRtD9GS/o9A1kc1oiDgEUbgMD1wXtqPCS/39aj5T6xkr4jZEKU3SztPrtyh5ov12AmVvwrp62vy5txXbjeo+aeZilyqLGPiHC3soDYrEdgR/cB6CGh8U4AZwiwkocbJyYP7tCe dj+VqED8BMH7UiXdwjneioh60ZoFug/gY+0K4M8mJVeUhOJogSfgFMnds/txkpxhrOkupuuVEuROXoOOJN0sxGYM5UZw4RixO+2j615+NuraXJzyxyAyyKMc4V8TRFBb/xnVfA9dBTZBJ66qaR0FAaZDdf0kf7oaHp9pTG+Y9pDjBltgTfTDOV1qgoK4k/j+/SHvtig==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2022-01-18 12:25:39 | Firmante

WTH+d2RmA8edqzZ2ROApgYiDNBOxXAn9Dq6AA4HscTHEbdSrfcl4Mw1/fNHp57c8CZ1ysSPBn9ZYN22ZQ/9eR0T5HnxZbpjoJRddg+Xdd/hCR//RvidQ1N36OVkjRayErEG5SPstn+7qQGDoazaAZpoyD1AbNPDiuJyxjlerLUhAigLhfA03XBAB/4Hxl6vXhXc2FU6KmtTjymVd1TocJMxzGtjYTRzMMWVdtbRYvn4CWAf9B1VuhwFtlVJxPb/wW60Ya7QoNSZIPmOKM65a+Dk6VOKWxemvnlqSuX8UieqWjdv8j9zr1R48wQg5CvFZgzXFSxnQU3Kf8QoRgnT5g==

FRANCISCO XAVIER GONZALEZ COZATL | Fecha:2022-01-25 12:25:45 | Firmante

tSOIQZ4cJwa8/jbLZOguoRhRYxM9BM235zOBj+Z2S/oPSqMtlqPXNaKDdsZGD8MIhmMKZEuXJt5YREAFHSC5DL8xxJoSHz6xY/Kp2wf8Y9tudrgQofve7SWIZ/G6vSU4XofHE6gBBivbmlQUWrasKsdRSOJwDnF1qKs8b7LrUw9MrTf2okJ28bflcBCtI7ZypNrtzVqvDLpdhlzqU+ZyU158zS8T1yve/0mUIZFg/Pyo9TBXWwJ+xcVNirAyVszbMSRw6HlagVY90GG4AUORxjvAPf4nlKXkSflzWNLKJi0rjv00D1SUhfNdyK/E57FUGXWE0R/xmFkguBaYUw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



9sxmrfFe4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/OJePEncIcJDx5INSommM4PHZR3NQZ2>

