

ARTÍCULO ORIGINAL

Cepas de *Naegleria* aisladas en Santiago de Cuba y estudiadas a través del microscopio electrónico de barrido

***Naegleria* strains isolated in Santiago de Cuba and studied using the scanning electron microscope**

Dra. C. S. Lillian Sierra Calzado¹

¹ Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora en Ciencias de la Salud. Profesora Auxiliar y Consultante. Facultad de Ciencias Médicas No.2, Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

A partir de 4 localidades donde se aislaron amebas del género *Naegleria fowleri* en Santiago de Cuba, se realizaron las técnicas necesarias para su adecuado estudio a través del microscopio electrónico de barrido. Con anterioridad, esas amebas fueron inoculadas en biomodelos experimentales (ratones), lo cual permitió determinar un nivel de patogenicidad diferente; y esto último, como es un aspecto controvertido en diversas teorías sobre sus causas (algunas analizadas aquí), entre las que se incluye la sustentada en la invaginación de su superficie (amebostomas o suctores), la autora de este trabajo se dio a la tarea de valorar la presencia (número y características) de los amebostomas o su ausencia a través del mencionado aparato, de donde se derivó que los ameboflagelados no patógenos apenas se diferenciaban de los que sí lo eran. Tal hallazgo pudo ser reafirmado cuando estos se compararon con 2 cepas reconocidas en el Instituto de Medicina Tropical de Checoslovaquia; por consiguiente, ese resultado descarta la citada causa en la patogenicidad de las amebas.

Palabras clave: *Naegleria fowleri*, patogenicidad, amebostoma, microscopio electrónico de barrido

ABSTRACT

Taking into account 4 localities where amebas of the genus *Naegleria fowleri* were isolated in Santiago de Cuba, necessary techniques for their adequate study using the scanning electron microscope were performed. Previously, those amebas were inoculated in experimental biomodels (mice), which allowed to determine a different level of pathogenicity, a controversial issue in several theories about their causes (some discussed here), including that maintained in their surface invagination (amebostomas or suckers). Thus, the author of this work evaluated the presence (number and characteristics) or absence of amebostomas through such device, and it is concluded that pathogenic ameboflagellates were similar to those that were not. This finding could be confirmed when they were compared with 2 strains recognized in the Institute of Tropical Medicine of Czechoslovakia. Consequently, that result rules out the above cause in the pathogenesis of amebas.

Key words: *Naegleria fowleri*, pathogenicity, amebostoma, scanning electron microscope

INTRODUCCIÓN

Desde la segunda década de 1980 hasta hoy, en diferentes países ¹⁻³ se continúa aislando la ameba *Naegleria fowleri* en lagos, piscinas y aguas de consumo; protozoo causante de la meningoencefalitis amébrica primaria (MEAP), letal en un altísimo porcentaje de los casos conocidos y, por tanto, con elevada patogenicidad, esto último atribuido a uno de los elementos presentes en su ultraestructura: los suctores o amebostomas.

En diversas teorías sobre las causas de su patogenicidad, lo cual deviene un aspecto muy controvertido, se incluye la sustentada en la invaginación de su membrana citoplasmática hacia el interior, de manera que para confirmar o refutar ese planteamiento se realizó este estudio sobre la especie.

MÉTODOS

En este estudio se utilizaron aislamientos de *Naegleria fowleri* purificados mediante resiembras en 4 localidades: 2 piscinas, una torre de enfriamiento y agua de consumo. Las amebas localizadas en la superficie de las placas de ANN con *Escherichia coli* fueron fijadas *in situ* con glutaraldehído al 2,5 % en 0,5 M de fosfato como sustancia amortiguadora. ¹

Después de enjuagadas en la superficie del agar con dicha sustancia, se realizó la posfijación en tetraóxido de osmio al 1 %. Luego del centrifugado y la deshidratación de las amebas, estas fueron embebidas en araldite para seccionarlas, hallar el punto crítico de humedad y sombreado en oro, con un voltaje de aceleración de 20 kV, a fin de estudiarlas mediante el microscopio electrónico JEM 100T XII con aditamento para barrido ASID4D, de fabricación japonesa, ² ubicado en el Departamento de Microscopia Electrónica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC).

Las amebas mantenidas *in vitro* de las cepas HB-1 de *N. fowleri* y M3-1 de *N. lovaniensis*, que permanecían en el Instituto de Medicina Tropical de Checoslovaquia, fueron procesadas a partir del medio axénico, para lo cual se introdujo un cubreobjeto estéril en el cultivo de este (durante 24 horas a 37 °C), posteriormente se fijaron por colocación del vidrio en glutaraldehído y cacodilato y se mantuvieron 24 horas en refrigeración. Se efectuaron lavados en alcohol y se adicionó bromhidrato de polilisina a 37 °C, con lavados subsiguientes en cacodilato con sacarosa.

Para la posfijación descrita se utilizó el microscopio electrónico de barrido Tesla 300 BS, de diseño checoslovaco, disponible en el Departamento de Microscopia Electrónica del Instituto de Parasitología de la Academia de Ciencias de Praga.

RESULTADOS

Se aislaron amebas del género *Naegleria fowleri* en 4 localidades, analizadas fundamentalmente en su estadio de trofozoito. Las imágenes vistas a través del microscopio electrónico de barrido de la superficie de los trofozoitos, mostradas en las figuras, permitieron observar los preamebostomas y amebostomas.

En algunas imágenes pueden visualizarse las bacterias en cuyo cultivo se encontraban las amebas, lo cual posibilitó realizar la actividad quimioatrayente necesaria para producir las copas de alimentación, llamadas también amebostomas y suctores.

La **figura 1** corresponde a las amebas de una de las piscinas que dieron muestra patogenicidad en biomodelos experimentales (ratones), donde se aprecia la presencia de un amebostoma de mediano tamaño y un preamebostoma en las zonas señaladas.

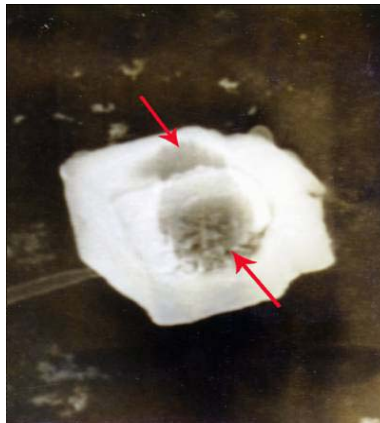


Figura 1. Aumento (4 000x)

En la **figura 2** se observan las cepas de la torre de enfriamiento, con preamebostomas, amebostoma evidente y gran amebostoma de contornos lisos, con gran cantidad de bacterias adheridas. Dichas cepas se comportaron como una ameba de relativa baja virulencia, en tanto el número de amebostomas se asemejó a lo anterior.



Figura 2. Aumento (5 000x)

La **figura 3** corresponde a una localidad estudiada, donde se muestra un pequeño amebostoma en aparente acción de canibalismo del fragmento de una ameba muerta. Estos protozoos no presentaron patogenicidad en los experimentos efectuados en ratones.



Figura 3. Aumento (5 000x)

En la **figura 4** se distinguen las amebas del agua de consumo T, con bacterias de clara apariencia de entrada a un amebostoma, que en el análisis experimental no demostraron patogenicidad.



Figura 4 Aumento (5 000x)

DISCUSIÓN

John *et al*³ definen las estructuras suctoras como un espacio centralmente deprimido que se desplaza por debajo y próximo a la superficie general de su contorno. Otros autores⁴ estiman que cada ameba posee entre 1-12 succionadores o amebostomas, con márgenes lisos e irregulares, y que las del género *N. fowleri* patógenas no presentan succionadores, por lo cual puede existir una correlación inversa entre el número de estos últimos y la virulencia de la cepa para ratones.

Al respecto, han sido analizadas estructuras similares para *Entamoeba histolytica* y *N. australiensi*; la segunda de las cuales presenta amebostomas, pero no resulta patógena para el ser humano.⁴

En este estudio se evidencia que tanto los trofozoitos patógenos, como los que no lo eran presentaron amebostomas.

Algunos investigadores⁵⁻⁸ emplean elementos que niegan absolutamente la relación del amebostoma con la patogenicidad, pues consideran que los principales eventos de *Naegleria*, causantes de la MEAP, se realizan con proteínas hemolíticas de calentamiento estable, la citolisina de lábil calentamiento, la fosfolipasa A y una cisteína proteasa que destruye células en contacto con el trofozoito o sin él. La afectación que produce la reacción hospedero-parásito en el sistema nervioso central, coincide con lo encontrado en este estudio.

Kim *et al*⁹ y Song¹⁰ se refieren de modo muy general a este fenómeno y plantean que se ha demostrado la presencia de anticuerpos en suero humano normal contra *Naegleria*.

Los elementos analizados en los últimos años,^{11, 12} concuerdan con lo hallado en el estudio, donde se demuestra que trofozoitos con diferentes grados de patogenicidad, observados a través del microscopio electrónico de barrido presentaron aproximadamente el mismo número de preamebostomas y amebostomas en las amebas de las distintas localidades muestreadas.

Al respecto, en las **figuras 5a y 5b** se observan cepas HB-1 de la especie *N. fowleri* y M3-1 de *N. lovaniensis*, ambas con amebostomas evidentes, clasificadas como patógena y apatógena, respectivamente.

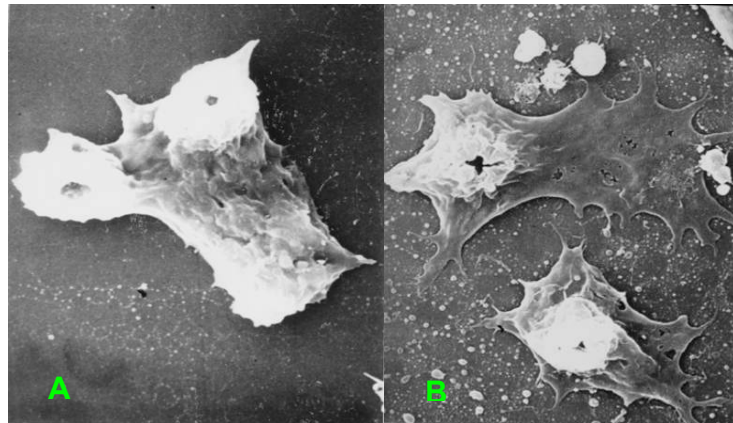


Figura 5a. (8 000x) Cepa HB-1 de la especie *N. fowleri* al microscopio de barrido en medio de cultivo axénico BCS
Figura 5b. (5 000x) Cepa M3-1 *N. lovaniensis* al microscopio electrónico en medio axénico BCS (Cerva L. Instituto de Medicina. Tropical, Praga)

En esta investigación, el microscopio electrónico de barrido permitió observar las características morfológicas de los amebostomas con su estructura en forma de orificio, provocada por una invaginación de la membrana citoplasmática hacia el interior, cuyos bordes son lisos o rugosos y su número puede variar indistintamente en amebas que se comportan con evidente patogenicidad (ligera o no definida) en el tiempo estudiado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cerva L. Laboratory diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis and method for the detection of *Limax amoeba* in the environment. *Folia Parasitol Prague*, 1980; 27:1-9.
2. John DT, Cole TB, Bruner RA. Correlated scanning a transmission electron microscopy of *N. fowleri* amoebastomes. *Proceedings of Electron Microscopy Society America*, 1984.
3. John DT, Cole TB, Marciano-Cabral FM. Suckerlike structures on the pathogenic amoeba *N. fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47(1):12-4.
4. De Jonckheere JF, John DT. Isolation of *N. australiensis* from an Oklahoma Lake. *J Protozool* 1985; 32(4):571-5.
5. John Bennett N, Domachowsk J, Khan A, King J, Thomas Cross J. Pediatric *Naegleria* <<http://emedicine.medscape.com/article/972044-overview>> [consulta: 3 septiembre 2009].
6. Cervantes Sandoval J, Serrano Luna JJ, García Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology* 2008; 154:3895-3904 <<http://mic.sgmjournals.org/cgi/content/full/154/12/3895>> [consulta: 3 septiembre 2009].
7. González Robles A, Castañón G, Cristóbal Ramos AR, Hernández Ramírez VI, Omaña-Molina M, Martínez Palomo A. Cell surface differences of *Naegleria fowleri* y *N. lovaniensis* exposed with surface markers. *Experimental Parasitology* 2007; 117(4):399-404.
8. Kang Su YS, Kyoung Ju J, Seok Ryoul K, Jong Hyun P, Sun K, Kyongmin K, Myung Hee S, *et al* . Role of the Nfa1 protein in pathogenic *N. fowleri* with CHO target cells. *Clin Diagn Lab Inmunol* 2005; 12(7):873-876.
9. Kim JH, Kim D, Shin HJ. Contact independent cell death of human microglial cells due to pathogenic *N. fowleri trophozoites*. *Korean J Parasitol* 2008; 46(4):217-21. <<http://www.parasitol.or.kr/kjp/Synapse/Data/PDFData/0066KJP/kjp-46-217.pdf>> [consulta: 3 septiembre 2009].
10. Song KJ. Hot shock protein 70 of *N. fowleri* is important factor for proliferation and "in vitro" cytotoxicity. *Parasitol Res* 2008; 203(2):313-7.
11. Bonilla Lemus P, Ramírez Flores E, Ortiz Ortega R, Eslava Campos CA. Ecología de las amebas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. <<http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap3.html>> [consulta: 3 septiembre 2009].

MEDISAN 2011; 15(4):468

12. Tolan RW. Amebic meningoencephalitis.
<<http://emedicine.medscape.com/article/996227-overview>> [consulta: 3
septiembre 2009].

Recibido: 19 de enero 2011
Aprobado: 10 de febrero 2011

Dra. C. Lillian Sierra Calzado. Facultad de Ciencias Médicas No. 2, avenida
Cebreco, km 1 ½, reparto Pastorita, Santiago de Cuba, Cuba.
Dirección electrónica: lillian@medired.scu.sld.cu