

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS SOBRE LA CITOPATOGENICIDAD
DE LAS AMEBAS LIMAX: NAEGLERIA Y ACANTHAMOEBA.

MEMORIA QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTA LA LDA. MARIA ISABEL PEREZ LOPEZ

Granada, mayo 1987

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

Curso de 1986 a 1987

Folio _____

Número _____

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.ña M^a Isabel Pérez Lopez, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS SOBRE LA CITOPATOGENICIDAD DE LAS AMEBAS LIMAX: NAEGLERIA Y ACANTHAMOEBA".

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, éste le calificó de APTO "Cum Laude".

Granada, 8 de Julio de 1987

EL PRESIDENTE

El Secretario del Tribunal,

M. de Alfaro

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Antonio R. Martínez Peinado
Firma del Graduado.

José Miguel BARRA

INVESTIDURA . . } En el día de la fecha se ha conferido a D. _____
_____ el Grado de Doctor en la Facultad de _____
conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada, _____ de _____ de 19 _____

EL DECANO,

CERTIFICO: Que el Acta que antecede concuerda con la del expediente del interesado remitida a la Secretaría de la Universidad.

Granada, _____ de _____ de 19 _____

El Catedrático Secretario,

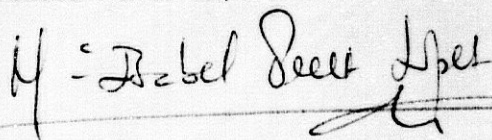
V.º B.º
EL DECANO,

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS SOBRE LA CITOPATOGENICIDAD
DE LAS AMEBAS LIMAX: NAEGLERIA Y ACANTHAMOEBA.

Tesis presentada para optar al grado
de Doctor en Farmacia por la Lda
M^a Isabel Pérez López



DIRECTORES

Prof. Dra. Dña.

M^a del Carmen Mascaró Lazcano

Prof. Dr. D.

Antonio Osuna Carrillo de Albornoz



Los trabajos de investigación que se exponen en la presente Memoria titulada: " ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS SOBRE LA CITOPATOGENICIDAD DE LAS AMEBAS LIMAX: NAEGLERIA Y ACANTHAMOEBA", han sido realizados en los laboratorios del departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada bajo la dirección de los profesores Dra. Dña. M^a del Carmen Mascaró Lazcano y Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz.

Granada 20 de Mayo de 1987

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. del Carmen Mascaró Lazcano', is written over a large, light-colored oval stamp or watermark.

La Directora del Departamento
Fdo: M^a del Carmen Mascaró Lazcano.

Este trabajo ha sido financiado en su totalidad por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. (proyecto nº 1227/84).

A mi familia

A David

MI SINCERO AGRADECIMIENTO

A los profesores Dra. Dña M^a del Carmen Mascaró Lazcano y Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, directores de esta Tesis, quienes con su gran preparación y dimensión humana, han servido de gran estímulo en la realización de la presente Memoria.

A las profesoras Dras. Josefa Segovia Parra y M^a José Alejandre Pérez y al Dr. D. Miguel Garcia Gonzalez del departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, por su inestimable colaboración, sin la cual no habrían podido realizarse algunas fases de este trabajo. He de hacer mención especial al ánimo mostrado por la Dra Segovia Parra, el cual ha sabido contagiarme sabiamente.

Al Dr. D. Santiago Castanys Cuello, compañero y amigo con quien sostuve frecuentes discusiones de las que surgió una parte importante de este trabajo. Por su paciencia, comprensión y valiosa ayuda, gracias.

Al Profesor Dr. D. José Aneiros Cachaza y a la Sra. Monique Boy del servicio de Microscopía Electrónica del departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, quienes me ayudaron en una parte importante de esta Tesis.

Al Sr. D. Alberto Valero por su colaboración en el trabajo fotográfico.

A mis compañeros de la línea de Amebas, quienes han vivido mas de cerca este trabajo, y al resto de los compañeros del Departamento.

A TODOS GRACIAS

INDICE

	pagina
1.- INTRODUCCION	12
2.- ANTECEDENTES	
2.1.- SOBRE PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.	25
2.2.- SOBRE LA EVALUACION DE LA CAPACIDAD PATOGENA SOBRE CULTIVOS CELULARES:EFECTOS CITOPATOGENICOS (ECP).	29
2.3.- SOBRE LA NATURALEZA DEL FACTOR O FACTORES IMPLICADOS EN LA CITOPATOGENICIDAD (FCP).	34
2.4.- SOBRE LAS ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES OBSERVADAS EN CULTIVOS CONJUNTOS DE AMEBAS-CELULAS.	39
2.5.- SOBRE LAS ALTERACIONES BIOQUIMICAS SUFRIDAS EN CUL- TIVOS CONJUNTOS DE AMEBAS-CELULAS.	42
3.- MATERIAL Y METODOS	
3.1.- MATERIAL BIOLOGICO UTILIZADO.	45
3.1.1.- El parásito. Amebas Limax.	45
3.1.1.1.- Mantenimiento de los cultivos amebianos en el laboratorio.	49
3.1.1.2.- Mantenimiento por criopreservación de las especies amebianas.	50
3.1.2.- Células Vero.	52
3.1.2.1.- Historia y procedencia de las células Vero.	52
3.1.2.2.- Mantenimiento de células Vero en el laboratorio por subcultivos sucesivos.	52
3.1.2.3.- Mantenimiento de células Vero el laboratorio por criopreservación.	55

	pagina
3.2.- CULTIVO "IN VITRO" DE LAS DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS SOBRE CELULAS VERO.	57
3.3.- SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS.	59
3.4.- ESTUDIO DE LA CITOPATOGENICIDAD DE LAS ESPECIES AMEBIA- NAS SOBRE CELULAS VERO.	63
3.4.1.- Fijación de los cultivos.	63
3.4.2.- Tinción con Gallocianina.	63
3.5.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS DAÑOS PRODUCIDOS SOBRE LAS CELULAS AFECTADAS.	65
3.5.1.- Procesamiento de las muestra	65
3.6.- ESTUDIO BIOQUIMICO DE LAS ALTERACIONES SUFRIDAS POR LAS CELULAS VERO.	67
3.6.1.- Determinación de proteínas totales.	68
3.6.1.1.- Determinación de la curva patrón.	69
3.6.2.- Extracción de lípidos.	69
3.6.3.- Determinación de colesterol.	70
3.6.3.1.- Fundamento del test.	70
3.6.3.2.- Proceso.	71
3.6.4.- Determinación de fosfolípidos.	72
3.6.4.1.- Fundamento.	73
3.6.4.2.- Proceso.	73
3.6.5.- Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos.	75
3.6.5.1.- Cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.	76
3.7.- ESTUDIO DE LA NATURALEZA Y ACCION DEL FACTOR O FACTORES CITOPATOGENICOS.	79
3.7.1.- Determinación de factores difusibles o no difusi- bles.	79

	página
3.7.1.1.- Experiencias.	80
3.7.1.2.- Efecto de la temperatura sobre el factor citopatogénico en algunas de las especies amebianas.	81
3.8.- AISLAMIENTO DE MEMBRANAS.	83
4.- RESULTADOS	
4.1.- SOBRE EL ESTUDIO DE LA CITOPATOGENICIDAD DE DISTIN- TAS ESPECIES AMEBIANAS FRENTE A CELULAS VERO.	87
4.2.- SOBRE LA NATURALEZA DEL FACTOR O FACTORES CITOPATO- GENICOS.	91
4.3.- SOBRE LA CAPACIDAD CITOPATOGENA ASOCIADA A LAS MEMBRA- NAS.	100
4.4.- SOBRE EL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS ALTERACIONES SUFRIDAS POR LAS CELULAS VERO EN CULTIVO CONJUNTO CON DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS.	104
A).- Microscopía óptica.	
B).- Microscopía electrónica.	
4.5.- SOBRE LAS ALTERACIONES BIOQUIMICAS OBSERVADAS EN LOS CULTIVOS CONJUNTOS CELULAS VERO-AMEBAS.	153
A).- Proteinas totales.	153
B).- Niveles de colesterol	155
C).- Contenido en fósforo lipídico	157
D).- Estudio de ácidos grasos.	159
5.- DISCUSION	
5.1.- SOBRE LA ACCION CITOPATOGENA DE DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS SOBRE CELULAS VERO. INFLUENCIA DEL TIEMPO	

	página
Y DE LA PROPORCION AMEBAS-CELULAS.	166
5.2.- SOBRE EL TIPO DE FACTORES (DIFUSIBLES O NO DIFUSIBLES) IMPLICADOS EN LA CITOPATOGENICIDAD DE LAS AMEBAS SOBRE LAS CELULAS VERO.	171
5.3.- SOBRE FACTORES ASOCIADOS A LAS MEMBRANAS.	180
5.4.- SOBRE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES OBSERVADAS EN LAS CELULAS VERO EN CULTIVO CONJUNTO CON DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS.	181
5.5.- SOBRE LOS CAMBIOS BIOQUIMICOS OBSERVADOS EN LOS CULTIVOS CONJUNTOS.	194
6.- CONCLUSIONES	199
7.- BIBLIOGRAFIA	202

1.- INTRODUCCION

Las amebas libres son conocidas desde antiguo. Ya Schardinger en 1899, descubrió la especie Amoeba gruberi conocida hoy día bajo el nombre de Naegleria gruberi.

Algunas de las pequeñas amebas de vida libre se conocen con el nombre de amebas "Limax", palabra del latín que quiere decir babosa, y alude a su especial modo de moverse. A las especies potencialmente patógenas se las llama también anfizóicas, indicando con ello que estos organismos pueden vivir en forma exozóica ó libre, ó en forma endozóica ó parásita.

El descubrimiento de la patogenicidad de algunas amebas libres para los animales superiores fue un hecho casual. Todo empezó por una observación accidental en 1957 cuando Jahnke y cols, hallaron un organismo contaminante, identificado como Acanthamoeba spp, en cultivos de células de riñón de mono.

En 1958, Culbertson y cols, volvieron a encontrar el mismo tipo de contaminación. Este autor observando los daños citopatológicos, inoculó los sobrenadantes de los cultivos a ratones y monos. Los animales inoculados murieron de una meningoencefalitis fatal, identificándose las amebas en el cerebro. La ameba identificada fue denominada Acanthamoeba castellanii, la cual fue descrita por Culbertson en 1961, como una especie libre, saprofita, cosmopolita y ampliamente distribuida.

Los géneros más importantes en Parasitología humana y animal, son los géneros Naegleria y Acanthamoeba, estando además implicados en afecciones humanas los géneros Vahlkampfia y Hartmannella, lo que no excluye la posible patogenicidad, para animales superiores, de especies pertenecientes a otros géneros, dado que se trata de descubrimientos relativamente recientes.

En 1965, Fowler y Carter en Australia, fueron los que descubrieron el primer caso humano con etiología demostrada. A esta enfermedad, la describieron como una meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), de curso rápidamente fatal en individuos que gozaban de buena salud. Las lesiones afectaban a los lóbulos olfatorios, frontales y temporales de los hemisferios cerebrales y del cerebelo, y eran la consecuencia de la invasión del epitelio neuroolfatorio por amebas de vida libre, (Naegleria fowleri), las cuales habían sido adquiridas probablemente mediante contacto con agua dulce contaminada con estas amebas.

Aunque algunos autores creyeron inicialmente que los organismos causantes pertenecían al género Acanthamoeba, diversos estudios demostraron en realidad que eran ameboflagelados de vida libre del género Naegleria. No obstante, se pudo comprobar que especies del género Acanthamoeba eran capaces de producir una encefalitis crónica, de curso clínico prolongado en sujetos debilitados, crónicamente enfermos ó inmunodeprimidos por cualquier circunstancia, pero sin ninguna historia de actividades relacionadas con el agua dulce.

Aunque Fowler y Carter en Australia en 1965, y un año más

tarde Butt en Estados Unidos, fueron los primeros en reconocer la infección del Sistema Nervioso Central por amebas de vida libre en seres humanos, la enfermedad probablemente ha existido desde hace muchos años, que en estudios retrospectivos, Symmers en Inglaterra en 1969, encontró un caso de un paciente de Irlanda del Norte que falleció en 1909, y Dos Santos en 1970, encontró un caso en Virginia que ocurrió en 1937. Flexner descubrió en 1892, un caso de absceso amebiano de la mandíbula que comunicata con la cavidad oral. Es posible que este absceso fuera causado por amebas de vida libre.

La afección producida en el hombre por especies del género Naegleria recibe el nombre, como ya hemos indicado de Menigoencefalitis amebiana primaria (MEAP), mientras que la afección cerebral producida por especies del género Acanthamoeba recibe el nombre de Encefalitis granulomatosa amebiana (EGA).

PROTOZOOLOGIA

Los dos géneros más conocidos, Naegleria y Acanthamoeba, poseen caracteres morfológicos bien distintos. Las especies del género Naegleria se han aislado de aguas dulces solamente, mostrando su ciclo biológico tres formas distintas: una forma ameboide de movimiento muy activo, de tamaño entre las 8 y 30 μm . Su forma de moverse es explosiva, mediante pseudópodos llamados lobópodos, con clara distinción entre el ecto y endoplasma. El citoplasma es granuloso, en el que se observa un único núcleo vesicular y varias vacuolas alimenticias y una ó varias pulsátiles. El núcleo posee un nucleolo central, Feulgen negativo, y un nu-

cleoplasma claro. En ciertas fases de su ciclo biológico las especies del género Naegleria pasan a una forma flagelar, desarrollando para ello dos flagelos de igual tamaño. Esta forma es incapaz de alimentarse, puesto que carece de pseudópodos y de citostoma, teniendo por lo tanto una existencia efímera, pasando de nuevo a forma ameboide.

Las formas quísticas son esféricas, con doble pared, exo y endocoste, observándose la presencia de poros u ostiolos en número variable dependiendo de la especie. La división celular, que ocurre solo en las formas ameboides, es de tipo promitótico.

Las especies del género Acanthamoeba pueden hallarse en aguas dulces, salobres e incluso marinas. Sólo presentan dos formas durante su ciclo biológico; la forma ameboide o trofozoica y una quística. El tamaño de la forma ameboide oscila entre las 15 y 50 μ m. Su desplazamiento es lento, mediante pseudópodos finos y alargados llamados acantópodos. Posee un núcleo único con un nucleolo central, Feulgen negativo, y un nucleoplasma claro. El citoplasma es granuloso y posee varias vacuolas alimenticias y algunas pulsátiles.

Las formas quísticas varían de unas a otras especies. La pared externa ó exina en muchas especies aparece plegada formando bucles más ó menos amplios. En algunas especies la intina tiene forma poligonal, con ángulos bien marcados que entran en contacto con la exina, en donde se localizan los poros u ostiolos. La división celular, sólo en las formas ameboides es de tipo mesomitótico.

Al microscopio electrónico los trofozoitos de N. fowleri, presentan numerosas mitocondrias y vesículas en el citoplasma. El cariosoma central denso y el núcleo granular. Acanthamoeba castellanii, muestra similares características, posee además aparato de Golgi, un abundante retículo endoplasmático y glucógeno.

DISTRIBUCION

La existencia de amebas libres potencialmente patógenas para el hombre y los animales, ha sido señalada en todos los continentes, y en todas las latitudes. Estos protozoos han sido aislados a partir de colecciones naturales de agua dulce (ríos, lagos) (Kasprzak y cols, 1974; Wellings y cols, 1977; Mascaró y cols, 1981); así como de colecciones artificiales (pantanos, piscinas) (Cerva, 1971; Pernin y cols, 1978; Dive y cols, 1978), e incluso de aguas salinas (Saygi, 1974). La cloración de las aguas no elimina la presencia de las amebas. Especies del género Acanthamoeba se han encontrado como parte integrante de la flora nasal normal de individuos sanos, (García Tigera y cols, 1978; Lawande y cols, 1980).

Es difícil por tanto, comprender como las afecciones producidas por estas amebas no se encuentran con más frecuencia, sobre todo en áreas de clima tropical, ya que se ha comprobado que crecen mejor a temperaturas relativamente elevadas. Aparentemente existe una relación entre crecimiento, proliferación a altas temperaturas y patogenicidad, (De Jonckheere y cols, 1975; Janitschke, 1977).

PATOLOGIA

La meningoencefalitis amebiana primaria o MEAP producida por Naegleria, se manifiesta en jóvenes de buena salud pero con antecedentes de baños o actividades acuáticas. La afección suele ser fulminante y puede producir la muerte en 72 horas, afectando las meninges y el encéfalo.

El mecanismo de infección es la inhalación de las formas ameboides, a través del epitelio olfatorio. El período de incubación es probablemente de 4 a 7 días.

La penetración de N. fowleri es a través del epitelio neuroolfatorio, a nivel de las células sustentaculares. Martínez y cols en 1973, demostraron en animales de experimentación que las amebas podían activamente invadir las células de Sertoli, o bien, pasivamente, se dejaban fagocitar por estas. A continuación, alcanzaban el espacio subaracnoideo por el plexo nervioso amielínico.

Por el contrario, la afección producida por especies del género Acanthamoeba afecta generalmente a individuos crónicamente enfermos y debilitados, bajo tratamiento inmunodepresor u otro tipo de tratamiento, no existiendo antecedentes de actividades acuáticas.

El mecanismo de infección y la vía de penetración en el SNC, no se conoce con exactitud. Se supone que es por vía hematógena, y muy probablemente a partir de un foco primario de infección que puede ser

el pulmón, la piel u otras localizaciones, como las amebas penetran en el SNC. El período de incubación se cree que oscila entre los 10 días, meses e incluso años.

La encefalitis granulomatosa amebiana es una afección, considerada de curso clínico subagudo, aunque recientemente se ha demostrado que especies del género Acanthamoeba son capaces de producir afecciones agudas.

SINTOMATOLOGIA

En cuanto a la sintomatología es variable en los casos descritos dentro de ciertos límites.

A) MEAP por Naegleria fowleri

En un 94-100% de los enfermos aparece malestar intolerable con fiebre alta, anorexia, náuseas y vómitos.

En un 86% de los pacientes, estos síntomas van seguidos de meningismo, (Martinez, 1983).

En un 66% aparecen anormalidades mentales. En la mayoría de los casos el paciente ha sido hospitalizado en estado de coma o semi-comatoso. Tardíamente, en un 13% de los casos, se han observado alteraciones visuales.

B) EGA por Acanthamoeba spp

En un 86% de los afectados por EGA, (Martinez y Amado-Ledo, 1979), aparecen anormalidades mentales y cambios de comportamiento. En 2/3 de los casos se han producido crisis epilépticas. En un 53%, fiebre y hemiparesia. Anormalidades visuales, en un 33% de los casos. El coma es el estado final en todos ellos.

C) Otras afecciones por Acanthamoeba spp

Se han señalado otros casos de afecciones oculares producidas por Acanthamoeba spp. Salvo en un caso, siempre han conducido a la enucleación del ojo afectado, (Sotelo-Avila y cols, 1974 ; Nagington y cols, 1974 ; Jones y cols, 1975 ; Visvesvara y Healy, 1975 ; Lundt y cols, 1978; Key y cols, 1980 ; Bos y cols, 1981).

Se supone que las amebas sólo invaden los tejidos en casos de infecciones mixtas o en córneas con una respuesta inmune disminuida por terapia con corticoides. Alguno de los casos de EGA, presentaban ulceraciones crónicas de la piel con Acanthamoeba spp en multiplicación activa, (Visvesvara y cols, 1983).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

La meningoencefalitis amebiana primaria y la encefalitis granulomatosa amebiana, deben de tenerse en cuenta para todos los diagnósticos diferenciales de meningitis o encefalitis donde el LCR se demuestra como estéril.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Se suele hacer tanto para la MEAP como para la EGA a partir del LCR, (Dos Santos, 1980), bien por observación directa en fresco, recién obtenido, o por el estudio de las células tras tinción.

En el caso de la MEAP, el color del LCR puede variar de blanco amarillento a gris. También puede aparecer teñido de color rosa, debido a la presencia de hematíes. La cantidad de eritrocitos en el LCR, según la fase de la enfermedad, puede alcanzar valores de 20-25.000/ml. El número de leucocitos puede llegar de unos 300 a 25.000/ml.

La citología es similar a la de una meningitis bacteriana, presencia de polimorfonucleares, pocos linfocitos y algunos monocitos. El contenido en proteínas es elevado, oscila de 75 a 987 mg/ 100 ml. En el caso de la EGA existen niveles elevados de gammaglobulinas. Los niveles de glucosa son muy bajos.

La búsqueda inmediata de amebas móviles es el único método de diagnóstico rápido de estas afecciones. Para ello es necesario la ayuda de un observador experimentado, capaz de diferenciar las amebas de otro tipo de células como, por ejemplo, los macrófagos.

TRATAMIENTO

No existe un tratamiento satisfactorio ni para la meningoencefalitis por N.fowleri, ni para la encefalitis por Acanthamoeba spp.

Los antiamebianos clásicos carecen totalmente de acción.

Entre los productos cuya acción ha sido evaluada, la hidroxiestilbamina, la 5-fluorcitosina, la sulfadiazina y la gentamicina, parecen ser los más efectivos frente a Acanthamoeba, mientras que la anfotericina B es la droga de elección frente a Naegleria.

La anfotericina B, en casos avanzados de afección cerebral de pacientes con MEAP, ha sido ineficaz, pero algunas personas se han curado bien solo con esta droga, o en combinación con otras, (Duma y cols, 1978 ; Apley y cols, 1970).

Ha sido también ensayada en animales de experimentación una vacuna con formas atenuadas de Acanthamoeba culbertsoni. Animales infectados con formas ameboides después de haber sido inyectada la vacuna, se comprobó no se volvían a infestar.

PREVENCIÓN

A pesar de su proliferativa presencia en la naturaleza, las afecciones por amebas libres no son tan comunes como podría esperarse. Culbertson en 1981, estudió las interacciones "in vitro" de neutrófilos y linfocitos con A. culbertsoni y N. fowleri. Los leucocitos normales humanos, atacan, rodean, y destruyen a Acanthamoeba, mientras que no se activan frente a Naegleria.

Propugnan como medida preventiva el control de colecciones

naturales o artificiales de agua dulce. Es desde luego utópico e impracticable.

De todas formas los estudios epidemiológicos llevados a cabo, fundamentalmente en la piscina de Usti en Praga, (Cerva, 1971 ; Cervova y cols, 1972), a raíz de los 16 casos epidémicos de MEAP, llevaron a Lapierre en 1976, al establecimiento de una serie de medidas profilácticas ó preventivas, que deberían considerarse especialmente en piscinas climatizadas, donde la temperatura del agua y la contaminación con residuos humanos favorecen la multiplicación de las cepas patógenas. Estas medidas deben de conjugarse con un análisis protozoológico del agua, cada cierto período de tiempo.

Uno de los problemas que más complican la comprensión de la compleja epidemiología de estas afecciones, es la existencia dentro de una misma especie de cepas patógenas y apatógenas, (de alta y nula virulencia). La patogenicidad de una cepa dada, disminuye o desaparece tras cultivo axénico repetido, y, revierte de nuevo tras contacto " in vitro" o " in vivo" con tejidos de un hospedador.

Se desconocen prácticamente los factores que influyen esta patogenicidad, y, que podrían explicar tanto la existencia de casos esporádicos y aislados de las afecciones producidas por ellas, (Meningo-encefalitis Amebina Primaria), como de casos epidémicos, donde en una piscina, por ejemplo, y por circunstancias desconocidas, las cepas patógenas se han desarrollado extensivamente.

Las pruebas de citopatogenicidad sobre cultivos celulares, fundamentalmente con células Vero, han demostrado reflejar de modo directo la patogenicidad de una especie o cepa para el ratón albino, por vía intranasal. Las cepas avirulentas no son citopatogénicas ni aún tras repetidos pases en cultivo, y, todas las cepas patógenas muestran citopatogenicidad en Vero, directamente relacionada en el tiempo con su grado de virulencia. Los estudios relacionados con otras líneas celulares han ofrecido resultados dispares.

Los trabajos de investigación realizados en este tema por diferentes grupos de investigación, y, empleando distintas especies de amebas y líneas celulares, no han aportado por el momento ninguna luz al problema, a excepción de descripciones morfológicas de las alteraciones citopatogénicas inducidas sea, por las amebas vivas, o por extractos o lisados de ellas, y, se especula tanto que se trate exclusivamente de una acción directa de la ameba sobre la célula como de la liberación de sustancias o agentes citotóxicos al medio de cultivo.

2.-ANTECEDENTES

2.1.- SOBRE PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.-

Los factores determinantes de la virulencia, capacidad de invasión y patogenicidad de algunas cepas de amebas *Limax*, no son aún del todo conocidas.

Desde que se detectó el poder citopatogénico de algunas amebas *Limax* sobre células en cultivo, y, posteriormente su capacidad patógena para animales superiores, los métodos y técnicas ideadas para estudiar la patogenicidad han sido múltiples.

De todos ellos, la inoculación en ratones y primates, es el sistema aceptado por la generalidad de los autores como definitivo para la comprobación de la capacidad patógena de estos protozoos.

En las cepas patógenas en general, los pases seriados por animales conducen a un aumento de la virulencia, (Kasprzak y cols, 1974 ; Stevens y cols, 1974 ; Wong y cols, 1975 ; Wong y cols, 1977 ; De Jonckheere, 1978). Son varios los autores que han comprobado, sin embargo, el hecho de que los pases realizados en medios de cultivo axénico conducen a una disminución de la misma, (Visvesvara y Callaway, 1974 ; Wong y cols, 1975).

Griffin, en 1972, estudió la tolerancia a la temperatura de distintas especies de Naegleria y Acanthamoeba, hallando que esta tolerancia se encuentra directamente relacionada con la virulencia, llegando a la conclusión de que las cepas apatógenas son incapaces por regla

general de desarrollar cierta patogenicidad a temperaturas de 37°C ó mas elevadas (46°C).

Stevens y cols,(1977),seleccionan también las amebas patógenas en base a su resistencia a las altas temperaturas, (45°C). Dive y cols,(1978),utilizan el mismo criterio pero con temperaturas de 41°C.

Visvesvara y Balamuth, (1975), analizan los niveles de fosfolipasa para diferenciar las cepas patógenas,de las apatógenas de Acanthamoeba spp.

De Jonckheere y Van de Voorde, (1976), estudian el efecto del cloro sobre las cepas patógenas y apatógenas de Naegleria y Acanthamoeba, comprobando la existencia de diferencias en la sensibilidad.

Otro tipo de pruebas están basadas en la diferente sensibilidad que presentan las especies,Naegleria fowleri y Naegleria gruberi, frente a la Concanavalina A y a las aglutininas del germen de trigo, (Stevens y Stein, 1977).

Červa en 1977, se basa en la capacidad que tienen Naegleria fowleri y Naegleria gruberi, para crecer en un medio con viscosidad aumentada con metil celulosa y Thong y Ferrante (1978), en el comportamiento fagocítico de estas dos especies frente a levaduras (Sacharomyces).

Un sistema más sencillo es el utilizado por De Jonckheere, (1977). Este autor emplea el medio de Chang (SCGYEM), como medio dife-

nenciador de cepas virulentas y avirulentas de Naegleria fowleri, y demuestra que las que crecen en él de forma abundante se muestran altamente patógenas por vía intranasal para ratones.

Lal y cols en 1979, realizan un estudio con la especie Hartmannella culbertsoni, (Acanthamoeba), similar a los realizados por Sing, (1975), Das y Ghoshal, (1976); Meerovitch y Ghadirian, (1978), con Entamoeba histolytica.

Estudian el comportamiento de esta especie cuando se le añade al medio de cultivo colesterol. En Entamoeba histolytica, se comprobó que cuando se le adicionaba colesterol al medio de cultivo, aquellas cepas que habían perdido la capacidad patógena, comportándose como apatógenas, se volvían más virulentas.

Lal concluye, que el comportamiento bioquímico de la especie Hartmannella culbertsoni, cuando se le añade colesterol al medio de cultivo, es semejante al que sucede en las células del cerebro durante la meningoencefalitis.

Červa en 1980, propone un nuevo método para la diferenciación de cepas patógenas de apatógenas de Naegleria fowleri. Este método está basado en la diferente sensibilidad al trimetropin. El crecimiento de las cepas virulentas no se afectaba por la adición al medio de trimetropin (400 µg/ml de medio), mientras que las cepas avirulentas mostraban completa inhibición frente a esta droga a concentraciones de 4 µg/ml.

Recientemente John y cols, (1985), sugieren que la virulencia de una cepa depende del número de amebostomas que presenta dicha cepa. Ellos, con varias cepas de Naegleria fowleri comprobaron, que aquellas que eran mas virulentas presentaban pocos amebostomas, mientras que sí eran menos virulentas el número de amebostomas era mayor.

2.2.- SOBRE LA EVALUACION DE LA CAPACIDAD PATOGENA SOBRE CULTIVOS CELULARES:EFECTOS CITOPATOGENICOS (ECP).

Desde que en 1957, Jahnes, Fullmer y Li, detectaron el poder citopatogénico de amebas Limax del género Acanthamoeba, comprobándose mas tarde su virulencia "in vivo", empleando para ello primates como animales de experimentación, han sido múltiples los métodos y técnicas ideados para estudiar la capacidad patógena de estas amebas sobre células "in vitro".

Wang y Felman, en 1967, utilizaron varias líneas celulares (HeLa, Hep-2, WI-36 y MK), como soporte de crecimiento de varias especies de Hartmannella (Acanthamoeba).

Carter en 1970, observa el efecto citopatogénico que sobre células de mamíferos muestra la especie Naegleria fowleri.

Chang, (1972), utilizó como índice de virulencia, el poder citopatogénico sobre cultivos celulares: Hep-2, Vero y PMK. Este autor indica que la citopatogenicidad es en cierto modo selectiva, pues observó que 8 cepas de Naegleria mostraron ECP sobre células Vero ó PMK, aunque solo un ligero ECP sobre la línea Hep-2. Una cepa de Naegleria gruberi no mostró ningún efecto citopatogénico en PMK ni sobre células Vero, mientras que apareció un leve ECP en Hep-2.

Visvesvara y Callaway en 1974, observaron que dos cepas patógenas de Naegleria fowleri (HB-1 y Carter 66), eran capaces de produ-

cir un efecto citopatogénico evidente sobre una línea celular de Vero.

Dunnebacke y Schuster, (1974), realizaron ensayos de ECP sobre cultivos celulares de embrión de pollo llegando a la conclusión, de que especies patógenas y apatógenas del género Naegleria, (N.fowleri y N. gruberi), son capaces de destruir el cultivo celular mientras que especies del género Acanthamoeba, estan desprovistas de cierto material responsable del ECP en cultivos celulares.

Schuster y Dunnebacke en 1976, utilizaron cultivos celulares de embrión de pollo, células de cerebro embrionario humano, células HeLa y células de glioma de rata, observando que cuando se añadían lisados de varias especies del género Naegleria, estos causaban ECP del 3º al 4º dia postinoculación.

Asimismo, observaron que el sobrenadante de los cultivos conjuntos, causaba ECP en nuevos cultivos celulares. Este ECP no se daba, sin embargo, adicionando lisados de especies del género Acanthamoeba.

Wong y cols , (1977), mantuvieron sobre cultivos celulares de mono (MKC) dos cepas de Naegleria fowleri (cepa HB-1 y Carter 66), para estudiar la capacidad citopatogénica de estas y su virulencia.

En 1978, Visvesvara y Healy, estudiaron el ECP producido por Naegleria fowleri (cepa patógena HB-4), sobre cultivos celulares de embrión de pollo, fibroblastos pulmonares de embrión humano y células Vero.

Cursons y Brown (1978), utilizando células Vero, determinaron que las cepas de Naegleria fowleri, causaban una disrupción completa de la monocapa celular en dos días, al igual que con la especie Acanthamoeba culbertsoni. Con Acanthamoeba castellanii y Acanthamoeba polyphaga el tiempo es aún menor.

De Jonckheere (1978), para el estudio indirecto de la virulencia en ratones de varias especies del género Acanthamoeba, utiliza la citopatogenicidad sobre cultivos de células Vero.

Brown en 1980, descubre la citopatogenicidad de una especie no patógena (Naegleria gruberi), sobre cultivos celulares mantenidos a 30°C en vez de a 37°C. Llega a la conclusión este autor, de que el efecto citopatogénico es debido a la fagocitosis, considerando a la temperatura como un factor determinante, en relación a la citopatogenicidad entre N.fowleri y N.gruberi.

De Jonckheere (1980), estudia el ECP de varias cepas del género Acanthamoeba frente a células Vero. Este autor hace diferencias en relación a distintas temperaturas de cultivo, (30°C y 37°C).

Grillot y Ambroise-Thomas (1981), estudiaron el ECP de 12 cepas del género Acanthamoeba, (6 cepas patógenas y 6 cepas apatógenas), sobre cultivos celulares MRC5 y sobre células Vero. Los resultados obtenidos por estos autores se centraron en la aparición de un ECP, haciendo que en un tiempo mas ó menos prolongado la capa celular se destruyera.

John (1982), utiliza las líneas celulares BHK-21, Vero y WI-38, frente a la cepa HB-4 de Naegleria fowleri, comprobando la completa disrupción de la monocapa celular a las 24 horas postinoculación. No sucedía igual con las líneas celulares L-929, KtK⁻ y Neuro-2a, que tardaron unas 72 horas en desaparecer bajo los efectos de Naegleria fowleri.

Marciano-Cabral y cols (1982-1983), estudiaron el efecto citopatogénico de varias cepas de Naegleria fowleri y Naegleria gruberi, sobre nueve líneas celulares (L-929, BHK, B-103, HeLa, Hep-2, MRC-5, Neuro-2a, RK-13 y Vero). Ambas especies destruían las monocapas celulares con una sola diferencia: N. fowleri, lo hacía a una temperatura de 30-37°C, mientras que N. gruberi, lo lograba a 25-30°C. También observaron que N. fowleri, en el cultivo de células de neuroblastoma ingería porciones de estas células, sin causar la lisis. En cambio, observan que la especie N. gruberi, destruye la membrana plasmática y el citoplasma de las células mencionadas dejando intacto el núcleo.

Zubiaur y Alonso (1983), estudiaron el poder citopatogénico de dos cepas de Naegleria gruberi, (1518/1e y 1518/1f), y una de Naegleria lovaniensis, (Aq/9/1/450), frente a diferentes líneas celulares, (embrión de pollo, HeLa y células L de ratón), concluyendo que en un corto período de tiempo estas cepas eran capaces de destruir la monocapa celular.

Fulford y cols (1985), estudiaron la capacidad citopatogénica de algunas cepas de Naegleria fowleri, sobre células de neuroblastoma de rata. Para ello partían tanto de amebas vivas, como de lisados, comprobando que los lisados de algunas cepas destruían la monocapa celu-

lar, mientras que otras eran menos citotóxicas.

Una de las cepas, altamente patógena, obtenida tras pases por ratón, manifestaba un ECP menor que las cepas mantenidas en cultivo axénico. También comprobaron, que el máximo de citotoxicidad se alcanzaba con lisados de amebas en crecimiento en fase exponencial, ó en fase estacionaria.

Lowrey y McLaughlin (1985), estudiaron la actividad citolítica de la cepa ATCC30894 de Naegleria fowleri LEE frente a cultivos celulares de mamíferos, (CEM) y células Vero.

Marciano-Cabral y cols (1986), estudian el efecto citopatógeno de varias especies de Naegleria patógenas y no patógenas sobre cultivos de células de neuroblastoma (B-103). Solamente dos de las especies ensayadas (N.australiensis y N. lovaniensis), producen la lisis de las células B-103.

Fulford y Marciano-Cabral (1986), estudian la actividad citolítica de la cepa ATCC-30894 de Naegleria fowleri LEE, frente a células de neuroblastoma de rata (B-103).

2.3.- SOBRE LA NATURALEZA DEL FACTOR O FACTORES IMPLICADOS EN LA CITOPATOGENICIDAD (FCP).

El mecanismo básico de la acción citopatogénica de las amebas *Limax* no está aún dilucidado, siendo por ello actualmente objeto de numerosos estudios.

Es un hecho repetidamente señalado la capacidad fagocítica de las amebas *Limax* patógenas, que se manifiesta tras penetrar en el tejido cerebral del hospedador. Son diversos los autores que han observado restos de tejido neural y eritrocitos en el interior de las vacuolas de las amebas, tras inocularlas a animales de experimentación, (Visvesvara y cols, 1973 ; Martinez y cols, 1974 ; Maitra y cols, 1976 ; Schuster y Dunnebacke, 1977). Asimismo, Cursors y Brown, (1978), han demostrado la capacidad fagocítica sobre cultivos celulares.

Edelstein y cols (1967), comprobaron experimentalmente que los lisados de *Mayorella palestinesis* poseían capacidad proteolítica.

Brown (1979), sugiere que la citopatogenicidad de *N. fowleri* depende de la función fagocítica. Amebas que habían sido aglutinadas e inmovilizadas por antisueros específicos no presentan actividad citopatogénica. Asimismo, (*Naegleria fowleri*), a las que se le añade citochalasin B no presentan citopatogenicidad frente a cultivos celulares. Este autor llega a la conclusión de que *N. fowleri*, ataca y destruye a los cultivos celulares por un mecanismo de fagocitosis, sin ayuda de ninguna sustancia citotóxica ó de agentes citolíticos.

Tras las primeras observaciones, sobre el efecto citopatogénico que producían algunas amebas *Limax* sobre cultivos celulares, Wang y Felman, (1967), establecieron la hipótesis de que dicho efecto era debido a la acción de ciertas enzimas producidas por las amebas.

Otros autores también pensaron que la naturaleza de este material citopatogénico era enzimática, (Chang, 1971 ; Maitra y cols, 1976).

Así Chang (1974), sugiere que las amebas excretan una sustancia enzimática citolítica ó citotóxica, dado el comportamiento de cultivos celulares a los que les había añadido previamente el sobrenadante de un cultivo conjunto de *N.fowleri*- células.

Chang (1979), propone que la naturaleza del efecto citopatogénico en *N. fowleri* se puede atribuir a una enzima fosfolipolítica presente durante el crecimiento activo de dicha ameba, que hace materialmente "agujeros" en la membrana citoplasmática, (rica en lípidos), de las células, así como es capaz de desmielinizar el tejido nervioso.

Wong y cols (1977), observaron diferencias en la síntesis de enzimas citolíticas, entre cepas de alta y baja virulencia de *N. fowleri*. Así, cepas de alta virulencia producían mas cantidad de catalasa que las de baja virulencia.

Cursons y cols (1978), establecen que *N. fowleri* produce una gran cantidad de fosfolipasa A, cosa que no ocurre con la especie no patógena *N. gruberi*.

Hysmith y cols, (1981), midiendo niveles de esfingomielinasa en medios de cultivo de Naegleria, determinan que la actividad de esta es mucho mayor cuando se trata de cepas de N. fowleri patógenas, que cuando son de cepas apatógenas ó de N. gruberi.

La naturaleza del agente citopatogénico producido por estas amebas se ha supuesto de tipo proteínico, (Dunnebacke y Schuster, 1977). Para estos autores, el NACM ó material citopatogénico de la ameba Naegleria, es una proteína ó compuesto protéico con un peso molecular estimado de 50.000 daltons. Este NACM es capaz de destruir cultivos celulares. No obstante estos autores hacen referencia a la inexistencia en Acanthamoeba de un material citopatogénico similar.

Dunnebacke y Schuster (1985), estudian los cambios estructurales sufridos por los cultivos celulares frente al NACM, dependiendo de las diluciones hechas de este material.

Lowrey y McLaughlin (1985), determinan la presencia de una proteína citolítica termoestable asociada a la membrana de Naegleria fowleri. Esta proteína, al someterla a calentamiento de 75°C durante 30 minutos no se afectaba, manteniéndose la acción citolítica frente a células. Estos autores hacen referencia a una segunda actividad citolítica de esta ameba asociada a los lisosomas, y que es termolábil. Concluyen que el papel de esta citotoxina asociada a la membrana en relación a la citopatogenicidad no está aún demostrada.

Otros autores, Dunnebacke y Schuster (1974), estudiaron la

posible relación de unas partículas virales, descubiertas en una cepa de la especie N. gruberi, con la capacidad citopatogénica de esta. Pudieron comprobar, sobre cultivos de células de embrión de pollo, que tanto N. gruberi como N. fowleri mostraban ECP, siendo en la primera de las especies donde se manifestaba la presencia de las partículas virales y en la otra no.

Este efecto citopatogénico, no se demostró en cepas patógenas del género Acanthamoeba, ni en la especie Didymiun nigripes.

John (1982), ha examinado la susceptibilidad de varias líneas celulares frente a la actividad citopatogénica de cepas de N. fowleri de alta y baja virulencia para animales, llegando a concluir que el efecto citopatogénico se da en menor proporción en aquellos cultivos celulares inoculados con cepas de N. fowleri de baja virulencia.

Recientemente, Lowrey y McLaughlin (1986), proponen que son factores hemolíticos los responsables del efecto citopatogénico, (ECP). Ellos demuestran con lisados de N. fowleri conteniendo dos ó tres hemolisinas y fosfolipasas, presencia de hemólisis en células sanguíneas de rata.

Fulford y Marciano-Cabral (1986), estudian la actividad citolítica de N. fowleri frente a células de neuroblastoma de rata (B103). Ellos piensan que esta actividad en lisados de amebas radica en enzimas proteolíticas como fosfolipasas A y C. Asimismo comprueban que pequeñas cantidades de etanol cambia la actividad citotóxica de la fracción.

Actualmente, el mecanismo de la acción citopatogénica es materia de controversia. Las hipótesis formuladas para esclarecer este hecho han sido múltiples y variadas como hemos podido constatar; hay autores que defienden la propuesta de que las amebas liberan una sustancia citolítica y algunos que las amebas ingieren las células tras repetido "picoteo".

Que sea el contacto ameba-célula, el responsable absoluto del efecto que sobre la célula se advierte, ó que sea a raíz de este contacto cuando se liberen una serie de sustancias al medio que sean las responsables del efecto, es lo que tratamos de dilucidar en parte con el presente trabajo.

2.4.- SOBRE LAS ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES OBSERVADAS EN CULTIVOS CONJUNTOS DE AMEBAS-CELULAS.

Son escasos los trabajos realizados hasta el momento, sobre las alteraciones ultraestructurales sufridas en cualquier tipo de células, puestas en cultivo conjunto con especies de amebas *Limax*.

Debido el problema que representa la ausencia de antecedentes para tener un punto de referencia al que poder acudir, para confrontar resultados posteriormente, hemos pensado como primera pauta considerar los cambios sufridos por las células cuando se ponen en contacto con Entamoeba histolytica.

Así podemos ver que Eaton y cols, (1970), realizan un estudio sobre los cambios sufridos en varias líneas celulares, (entre las que se destacan Rk-13) al hacer un cultivo conjunto con E. histolytica.

Knight y cols, (1975), llevan a cabo un estudio ultraestructural para ver los cambios sufridos por las células Rk en cultivo conjunto con E. histolytica. Observan que los daños en las células vienen reflejados en degeneración de las mitocondrias; hay concentración en la periferia de la célula de lisosomas y microcuerpos; el RER se ve fragmentado y con tendencia a la vacuolización; los ribosomas y polirribosomas están en menor proporción que en las células control; el aparato de Golgi aparece activo y hay un incremento en las tonofibrillas periféricas. En la fase más avanzada de las alteraciones, observan una completa desintegración del citoplasma celular.

En cuanto a cambios sufridos en el parásito, estos autores hacen referencia a la presencia de unas pequeñas vesículas en la membrana, que podrían indicar la transferencia de material citoplasmático de la célula al parásito. Las vacuolas digestivas de las amebas contienen segmentos intactos de membrana, que posiblemente puedan ser restos procedentes de mitocondrias ó de la membrana de las células Rk-13.

Marciano-Cabral y cols. (1982), hacen un estudio sobre la citopatogenicidad de Naegleria fowleri y Naegleria gruberi sobre distintas líneas celulares. De todas las líneas celulares ensayadas, con las de neuroblastoma B-103 realizan un estudio al microscopio electrónico de transmisión. Las conclusiones y resultados obtenidos por estos autores no son muy explícitos, en cuanto a detallar las alteraciones observadas en este tipo de células, tras un contacto con las especies antes mencionadas.

Marciano-Cabral y Fulford (1986), estudian la citopatología de especies de Naegleria patógenas y no patógenas frente a cultivos celulares de neuroblastoma de rata B-103. En los estudios realizados al microscopio electrónico de transmisión, observan que especies como N. australiensis y N. lovaniensis dañan la membrana plasmática y el citoplasma de las células, en las zonas próximas con las amebas. El RE de las células nerviosas, se presenta dilatado y redondeado. Las células en contacto con las amebas presentaban la lisis después de 6 horas de cultivo. También observan que los núcleos permanecen intactos. Estos autores piensan en la posibilidad, de que la ingestión de las células por las amebas, se lleve a cabo por fagocitosis ó por arrastre del material lisa-

do de las células.

En cambio, Naegleria fowleri destruye las células por trogocitosis, es decir, ingiere piezas de las células en porciones.

2.5.- SOBRE LAS ALTERACIONES BIOQUIMICAS SUFRIDAS EN CULTIVOS CONJUNTOS AMEBAS-CELULAS.

La patogenicidad de Entamoeba histolytica, ha sido discutida en profundidad por varios autores, (Faust, 1961 ; Elsdon-Dew, 1968 ; y Neal, 1958). Ellos llegan a la conclusión que son varios los factores importantes que afectan a esta patogenicidad.

En 1959, Singh, comprobó que cepas no invasivas de Entamoeba histolytica, llegaban a ser invasivas y producían ulceraciones en ratas cuando a las amebas en crecimiento se las alimentaba con colesterol. Si al cultivo se le dejaba de administrar el colesterol, la virulencia adquirida gradualmente iba desapareciendo, hasta volver a no ser invasiva la cepa.

Basándose en estos hechos Rai y Rao (1978) y Lal y Garg (1979), coinciden en señalar que los niveles de colesterol en el cerebro de ratones afectados con meningoencefalitis decrecen. Esto es debido presumiblemente a la utilización del colesterol del cerebro del hospedador por el parásito.

Lal y Garg (1979), demostraron que cuando se añadía colesterol al medio de cultivo se estimulaba la multiplicación de las formas vegetativas de Hartmannella culbertsoni (Acanthamoeba). La multiplicación de los trofozoitos, dependía de la cantidad de colesterol añadida al medio. Cantidades nulas mantienen un buen crecimiento hasta las 96 horas. Con cantidades de 1 mg/l, también se mantiene un buen crecimien-

to hasta las 96 horas. A partir de 5 mg/l, las amebas crecen hasta las 48 horas, no estimulándose el crecimiento a cantidades mayores.

Paralelo a este fenómeno, observan que con cantidades pequeñas de colesterol (1 mg/l), añadidas al medio de cultivo aparecen cambios en la composición lipídica de los trofozoitos. Así, los fosfolípidos y los ácidos grasos libres disminuyen, hay un aumento de la fosfatidilcolina y un descenso en la fosfatidiletanolamina. Las enzimas lisosomales (fosfolipasa A, fosfatasa ácida y esfingomielinasa), presentan un aumento en presencia del colesterol.

En la actualidad autores como Saxena en 1986, estudian los efectos del colesterol sobre una cepa de E. histolytica (NIH 200), llegando a la conclusión que alto contenido en colesterol conduce a un aumento de la fagocitosis por parte del parásito, mientras que cuando los niveles son bajos esta fagocitosis disminuye. Asimismo, observan un mayor contenido en fosfolípidos en aquellos cultivos en los que la presencia del colesterol es mayor.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

3.1.1.- EL PARASITO. AMEBAS LIMAX.

Para la realización de este trabajo hemos dispuesto de una serie de amebas de vida libre (Limax), que creemos, constituyen una muestra lo suficientemente representativa para el estudio de los factores implicados en la citopatogenicidad de estas especies.

Las especies y/o cepas empleadas son las siguientes:

-FAMILIA VAHLKAMPIIDAE. Jollos 1977.

-GENERO NAEGLERIA. Alexxeieff, 1912 emend Calkings, 1913.

Naegleria fowleri (cepa 76/14/S₃). Carter, 1970.

Esta cepa fué aislada en mayo de 1976, por el Prof. De Jonckheere, a partir del agua de refrigeración procedente de una factoría metalúrgica. Lleva algo mas de 6 años mantenida en cultivo axénico, por resiembras sucesivas, en nuestro laboratorio, en estufa a 37°C.

Está involucrada en un caso humano mortal de meningoencefalitis amebiana primaria, (MEAP), producida tras haberse bañado el paciente en esas aguas. Se trata pues, de una cepa cuya patogenicidad está probada no sólo en animales, sino también en el hombre.

-FAMILIA ACANTHAMOEBIDAE. Sawyer y Griffin, 1975.

-GENERO ACANTHAMOEBEA. Volkonsky, 1931 emend Page, 1967.

Acanthamoeba castellanii (cepa DPG-82). Douglas, 1930. Volkonsky, 1931.
Page, 1967.

Esta especie se aisló en marzo de 1982, de muestras de ambiente de uno de los quirófanos destinados a operaciones de urgencia, es decir, no reglados (Pabellón viejo) del Hospital Clínico San Cecilio de Granada, por Mascaró y cols., (1985).

La especie se mantiene en nuestros laboratorios tanto a 28°C como a 37°C, en Bacto Agar Difco al 2% en placas Petri, junto a sus bacterias asociadas, así como en cultivo axénico en medio C.G.V., a las dos temperaturas anteriormente señaladas.

Se estudió su patogenicidad tras inoculación, por vía intranasal, en animales de experimentación, falleciendo estos entre los 4 y 8 días postinoculación. Se considera, por lo tanto, una especie altamente patógena.

Acanthamoeba culbertsoni (cepa A₁). Singh y Das, 1970.

Cepa aislada por C. Culbertson en 1958, a partir de un cultivo de riñón de mono. Esta cepa demostró ser patógena para ratones y monos, tras inoculación intranasal.

Esta cepa fué posteriormente estudiada por K.G.M. Adam en 1964, quién la envió en cultivo axénico a E. Willaert, (1976), también para ser estudiada.

La cepa que se mantiene en nuestro laboratorio en cultivo axénico en medio C.G.V. a 28 y 37 °C, nos fué enviada por el Prof. De Jonckheere en 1985.

Acanthamoeba lenticulata (cepa PD₂). Molet y Ermolieff-Braun, 1976.

Cepa aislada por Molet y cols, (1976), del agua de una piscina (termal), medicinal de Estrarburgo, y mantenida a una temperatura de 35°C constantemente.

Fue enviada a nuestro laboratorio por el Prof. De Jonckheere en 1985, manteniéndose en cultivo axénico desde entonces.

Acanthamoeba lugdunensis (cepa DPGr-82). Pussard y Pons, 1977.

Especie descrita por primera vez por Pussard y Pons, a partir de tres cepas distintas; una aislada por ellos de una piscina de Lyon, (1977); otra por Perrin, (1976), y otra por Molet de heces humanas, (1976).

La cepa que usamos en este estudio se aisló en repetidas ocasiones, del quirófano número 2 del Hospital Clínico San Cecilio de Granada, por Mascaró y cols, (1985). Se mantiene en cultivo axénico a 28 y 37°C en medio de cultivo C.G.V.

Las pruebas de patogenicidad sobre ratones albinos, con inoculación por vía intranasal, demostraron que la cepa posee un alto grado de patogenicidad, produciendo la muerte de los animales entre los 4 y 16 días postinoculación.

Acanthamoeba Gr-1

Es una especie no identificada, específicamente del género Acanthamoeba, próxima morfológicamente al grupo Astronyxis-comandoni, que fue aislada en nuestro laboratorio por Mascaró y cols en 1975, (DPGr-75), a partir de un cultivo sobre tierra en placas Petri del alga Oscillatoria formosa, que era utilizada para el mantenimiento en el laboratorio de Lymnaea truncatula. (Mascaró y cols, 1977).

Se mantiene en nuestro laboratorio desde 1982, en cultivo axénico en medio C.G.V. a 28 y 37°C.

Acanthamoeba lugdunensis (cepa SH₅₆₅). Pussard y Pons, 1977.

Especie descrita por Pussard y Pons en 1977, a partir de una cepa aislada por Molet y cols, (1976), de heces humanas.

La cepa fue enviada a nuestro laboratorio en 1985 por el Prof De Jonckneere, manteniéndose en cultivo axénico en medio C.G.V. a 28 y 37°C.

Acanthamoeba griffini (cepa S₇). Sawyer, 1971.

Cepa aislada y descrita por Sawyer, T.K. en 1971. Fue aislada de aguas marinas en Long Island Sound, New London, Conn. en 1962 por Griffin, J.L., quién designó a la cepa aislada como S₇. La cepa se mantuvo por cultivos sucesivos en agar, por el Prof. Griffin.

Fue enviada esta cepa a nuestro laboratorio por el Prof De Jonckheere en 1985, manteniéndose en cultivo en medio axénico C.G.V. a 28 y 37°C.

3.1.1.1.- Mantenimiento de los cultivos amebianos en el laboratorio.

Los medios utilizados para el mantenimiento de los cultivos amebianos "in vitro", dependen de las especies en cuestión.

Para el caso de las especies del género Acanthamoeba, el medio de cultivo usado fue C.G.V., (Willaert, 1976), (apartado 3.3). Al medio, una vez preparado, se le puede añadir ó no, SBF (Gibco) exento de virus y micoplasmas, inactivado previamente a 56°C durante 30 minutos, según los requerimientos del cultivo.

El proceso de esterilización del medio C.G.V., es a través de filtración en filtros Sartorius (SM16510), (esterilizados previamente a 120°C durante 30 minutos), de 0,45 µm de tamaño de poro y bajo presión positiva de 1,2 kg/cm², suministrada por una bomba Millipore (XX60 22050). Una vez esterilizado, el medio se almacena en frascos estériles

rellenados en el interior de una cámara de flujo laminar, para evitar posteriores contaminaciones. Estos frascos se conservan hasta su utilización en frigorífico a 4°C, comprobándose su esterilidad mediante controles depositados en estufa, a 37°C.

Para las especies del género Naegleria, el medio de cultivo empleado fue el medio Nelson, (Nelson Y Jones, 1970), (apartado 3.3).

Este medio puede ser esterilizado bien por filtración, como anteriormente se ha detallado, ó esterilizado en el autoclave a 120°C durante 15 minutos, sin añadirle el suero. Posteriormente, cuando el medio esté lo suficientemente enfriado se le añade el suero estéril.

Los cultivos de Naegleria fowleri, 76/14/S₃, se realizaban en frascos de vidrio Leighton de 17 cc de capacidad, con tapón a rosca previamente esterilizados a 120°C durante 30 minutos en autoclave.

Los frascos con 2 ml de medio de cultivo aproximadamente, se mantenían en estufa a 37°C, cambiando el medio cada 48 horas.

Las especies del género Acanthamoeba se cultivaban en frascos de plástico ya esterilizados, (frascos Roux, Falcón de 25 cm² de superficie) con tapón a rosca, en los que se depositaban 5 ml aproximadamente de medio. Los cultivos se mantenían en estufa a 28 y 37 °C, cambiando el medio cada 6 ó 7 días.

3.1.1.2.- Mantenimiento por criopreservación de las especies amebianas.

Para la criopreservación, se parte de frascos de cultivo amebianos a los que se somete a agitación, (manual), para conseguir desprender las amebas del fondo del recipiente contenedor. Estas se pasan a un tubo estéril de fondo cónico, (Eurotubo), y se centrifugan a 2.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se retira el sobrenadante y se añade medio fresco, C.G.V. ó Nelson, (mas SBF), a los que se les ha adicionado un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

El contenido de los eurotubos se traspasa mediante pipeta estéril, a unas ampollas de vidrio que han sido previamente esterilizadas, y, que una vez rellenas se cierran a la llama con un mechero Bunsen. Las ampollas, una vez cerradas, son sometidas a temperaturas decrecientes hasta alcanzar la temperatura de -80°C , temperatura a la cual se almacenan. Esta temperatura se consigue en un arcón congelador Sow-Low, ó en recipientes contenedores de nitrógeno líquido.

Cuando se han de utilizar de nuevo las amebas, se descongelan rápidamente, en baño maría a 37°C , para evitar posibles recristalizaciones, y el contenido de las ampollas se completa al doble de su volumen con medio fresco, centrifugándose a 2.000 rpm de 5 a 10 minutos. El sobrenadante es retirado, y al centrifugado se le adiciona medio fresco. Se pasa a frascos estériles y se lleva a estufa de 28°C .

3.1.2.- CELULAS VERO.

3.1.2.1.- Historia y procedencia de las células Vero.

Como sustrato vivo de nuestras experiencias, en el estudio de los factores implicados en la citopatogenicidad de las distintas especies de amebas libres estudiadas, se utilizaron células Vero.

La línea celular Vero se estableció a partir de riñón de mono verde africano, Cercopithecus aethiops, en 1962 por Kasumura y Kawakita, de la Universidad de Chiba, Japón. Esta línea celular ha sido extensivamente empleada en estudios de replicación de virus, (SV-40, SV-5, arbovirus, reovirus y polivirus).

La utilizada en nuestras experiencias, proviene de una cepa mantenida en los laboratorios Flow, y donada a nuestro laboratorio por el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada en el año 1982; a partir de esta fecha se mantiene en el laboratorio. Tanto las células Vero, como otras líneas celulares que se mantienen igualmente en nuestro laboratorio son conservadas, bien por subcultivos sucesivos ó por criopreservación.

3.1.2.2.- Mantenimiento de células Vero en el laboratorio por subcultivos sucesivos.

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las células, es el medio MEM (Minimun essential medium), con L-glutamina (Gib-

co), y enriquecido con un 20% de SBF de la misma casa comercial, al que se añaden 100 UI/ml de penicilina G-sódica; 100ug/ml de sulfato de estreptomina y 50 µg/ml de kanamicina, para evitar las posibles contaminaciones.

Una vez preparado el medio con los antibióticos, se le añade el SBF (Gibco), exento de virus y micoplasmas, inactivado previamente a 56°C durante 30 minutos, y se ajusta el pH del medio a 7,2.

El proceso de esterilización del medio MEM, es a través de filtración en filtros Sartorius (SM 16510) previamente esterilizados, de 0,45 µm de tamaño de poro, bajo presión positiva de 1,2 kg/cm² suministrada por una bomba Millipore (XX6022050). Una vez esterilizado, el medio se almacena en frascos estériles rellenos en el interior de una cámara de flujo laminar, para evitar posteriores contaminaciones. Los frascos se conservan a 4°C en frigorífico hasta su uso, comprobándose su esterilidad mediante controles depositados en estufa a 37°C.

Los frascos empleados en el cultivo de células Vero son de plástico con tapón a rosca, esterilizados en fábrica, (frascos Roux, Falcon, de 25 cm² de superficie).

Para obtener los subcultivos, partimos de cultivos en monocapa, (los cuales son tratados en esterilidad). El primer paso a seguir es retirar el medio de cultivo, y a continuación se "tripsinizan" las células, con el fin de que estas se despeguen del fondo del frasco donde están adheridas.

Para la "tripsinización", se prepara una solución de tripsina (Difco 1:250) a la concentración de 0,25% en solución PBS (apartado 3.3), y se agita. Seguidamente, se prepara una solución de EDTA al 0,05% en PBS y se agita también. Una vez disueltas por separado ambas, se mezclan y se esterilizan por filtración, tras ajustar el pH a 7,5.

La mezcla, una vez esterilizada, se pasa a frascos de tapón a rosca estériles, mediante pipeteo estéril en cámara de flujo laminar, separando un control para comprobar la esterilidad a 37°C; el resto se almacena a - 20°C. Cuando es necesario usar esta mezcla se descongela en baño maría a 37°C.

Una vez descongelada la mezcla, es añadida al frasco que contiene las células y se mantiene durante 30 segundos a 1 minuto. Se retira el sobrenadante, y se deposita una nueva cantidad de mezcla, y los frascos se llevan a un incubador automático de CO₂ (Assab), regulado a 37°C, con una atmósfera de CO₂ del 5%, de 5 a 10 minutos.

La solución de EDTA-Tripsina, actúa sobre la monocapa celular durante el tiempo de incubación. Al final de este tiempo, por observación directa al microscopio de contraste de fases, se comprueba si las células se han despegado de la superficie del frasco al que estaban adheridas. En caso afirmativo, se añaden al frasco aproximadamente 3 ml de medio MEM, y se agita muy bien la suspensión, para que de esta forma las células se distribuyan uniformemente en el mismo.

A continuación, se cuenta el número de células por ml en una

cámara de Neubauer y se calcula la viabilidad, mediante la tinción con el colorante vital azul Tripán. El número de células por frasco se ajusta a 1×10^5 células/ml, inoculándose una cierta cantidad de esta suspensión a cada frasco nuevo. Se completan después con medio fresco hasta los 5 ml.

Seguidamente los frascos son llevados al incubador automático de CO_2 en las condiciones anteriormente señaladas. Aproximadamente a las 6 horas de cultivo, las células comienzan a adherirse a fondo de los frascos, y a multiplicarse hasta formar una monocapa celular. Cada 48-72 horas se retira el medio y se le adiciona medio fresco. Los subcultivos se pueden realizar aproximadamente cada 8 días.

3.1.2.3.- Mantenimiento de células Vero en el laboratorio por criopreservación.

Para la criopreservación se parte de un cultivo en monocapa, que es tripsinizado de forma estéril, para que las células se despeguen del soporte a donde están adheridas. Ya despegadas, se le añade el medio MEM con 20% de SBF y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solución es pasada a ampollas de vidrio estériles, que son posteriormente cerradas al fuego. Las ampollas con la suspensión celular, son sometidas a temperaturas decrecientes hasta llegar a la temperatura de -80°C , almacenándose en un arcón congelador regulado a esta temperatura.

Para su uso posterior, se descongelan rápidamente las ampollas en baño maría a 37°C para evitar recristalizaciones. Se centrifuga

y se desecha el sobrenadante, añadiéndose medio fresco a los frascos, que se depositan en estufa a 37°C y atmósfera del 5% de CO₂.

Siempre que se empleaba este método de conservación, se calculaba el % de viabilidad tras descongelación, tiñéndose con el colorante azul Tripán las células.

3.2.- CULTIVO " IN VITRO" DE LAS DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS SOBRE CELULAS VERO.

Los cultivos se realizaron en pocillos de placas de microtitulación, con fondo plano, estériles y especiales para cultivo de tejidos (Roux, Falcon).

Tras cortar, a la medida del pocillo, unos cubreobjetos de vidrio borosilicado, se lavan según requiere la limpieza del material para el cultivo de tejidos, y se esterilizaban al autoclave a 121°C durante 30 minutos. Los cubreobjetos así preparados, se colocaban uno por uno en los pocillos de la placa, con ayuda de unas pinzas estériles. Seguidamente, con una jeringa estéril, se depositaba en cada uno de los pocillos una cantidad igual de medio MEM+ 10% de SBF. A continuación, con un dosificador, se inoculaban cantidades iguales, (según requerimiento de cada experiencia), y conocidas, en cada pocillo, de células Vero, (obtenidas tras tripsinización).

Cerrada la placa de microtitulación, se llevaba a incubar a una estufa a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂. Pasadas unas 12 horas, a las células, ya adheridas a los cubreobjetos, se les retiraba el medio MEM el cual se sustituía por medio CGV + 10% de SBF, y se inoculaban las distintas especies amebianas, obtenidas tras centrifugación de los distintos cultivos de mantenimiento.

Este tipo de cultivo conjunto, también puede ser llevado a cabo en frascos Roux (Falcon), en donde una vez las células adheridas

en medio MEM + 10% de SBF, se les retiraba este y se les añadía medio CGV + 10% de SBF. A continuación se les añadían los distintos cultivos amebianos. Este último procedimiento, ha sido empleado para obtener las muestras para el estudio de microscopía electrónica de transmisión.

3.3.- SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS.

MEDIO C.G.V.S. (Willaert, 1976).

Bacto Casitone (Difco).....	20 g
Na Cl.....	5 g
Glucosa.....	1 g
Acido fólico.....	2 mg
Biotina.....	20 mg
Penicilina.....	147 mg
Estreptomicina.....	14,7 mg
Agua bidestilada.....	1.000 ml
S.B.F.....	10%

MEDIO NELSON (Nelson y Jones , 1970).

Extracto hepático (Panmede).....	0,1%
Glucosa.....	0,1%

Ambos compuestos en solución Neff modificada (Page, 1967).

Na Cl.....	0,12 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O.....	0,004 g
Ca Cl ₂ · 2H ₂ O.....	0,004 g
Na ₂ PO ₄ H.....	0,142 g
K PO ₄ H ₂	0,136 g
Agua bidestilada.....	1.000 ml
S.B.F. ó Suero New Born.....	10 %

MEDIO MEM.

MEM (Eagle) (10X) con sales Earle y con L-Glutamina
sin $\text{Na CO}_3 \text{ H}$ (Gibco) 80 ml
Agua bidestilada c.s.p.....1.000 ml
 $\text{Na CO}_3 \text{ H}$ (Merck).....1.200 mg
Hepes (Sigma).....4.000 mg
Penicilina G-sódica (Antibióticos S.A.) 56 mg
Estreptomina $\text{SO}_4^=$ 100 mg
Kanamicina $\text{SO}_4^=$ 48 mg
SBF (Gibco) 200 ml
pH = 7,2

SOLUCION PBS.

Na Cl 8 g
K Cl 0,20 g
 $\text{Na}_2 \text{ PO}_4 \text{ H}$ 1,16 g
 $\text{K PO}_4 \text{ H}_2$ 0,16 g
Agua destilada 1.000 ml

SOLUCION EDTA.

EDTA Na_2 (merck) 200 mg
Glucosa 1.000 mg
K Cl 400 mg
Na Cl 8.000 mg

Na CO ₃ H	580 mg
Agua bidestilada	1.000 ml

pH = 7,2

SOLUCION EDTA- TRIPSINA.

Tripsina (Difco 1:250)	0,25 g
PBS	100 ml
EDTA Na ₂ (Merck)	0,05 g
PBS	100 ml

Se disuelven ambos componentes por separado en PBS y a continuación se juntan para posterior esterilización por filtración.

FIJADOR CARNOY.

Alcohol absoluto	6p
Cloroformo	3p
Acido acético glacial.....	1p

REACTIVO DE COLESTEROL . (Método de Chod-Pad).

Tampón fosfato	200mmol/l
4-amino fenazona	1mmol/l
Fenol	5mmol/l
3,4 dicloro fenol	5mmol/l
Eter poliglicólico de alcohol graso	0,48%
Colesterol esterasa.....	±0,1 U/ml

Colesterol oxidasa 0,14 U/ml
Peroxidasa 0,12 U/ml
Agua destilada 100 ml
pH = 7,9

3.4.- ESTUDIO DE LA CITOPATOGENICIDAD DE LAS ESPECIES AMEBIANAS SOBRE CELULAS VERO.

Se prepararon cultivos celulares, y se inocularon con las distintas especies amebianas como se detalla en el apartado 3.2.

En los cultivos conjuntos se mantuvo una relación de número de amebas/número de células para lo cual, se partió de un cultivo de 1.000 células, a las que se les añadió las amebas en la proporción de 10/1, 1/1 y 1/10. Los cultivos se sacrificaban a las 6, 12, 18, 24, 48 y 72 horas postinoculación.

Tras interrumpir los cultivos, se procedió de acuerdo con la metodología que a continuación se detalla.

3.4.1.- Fijación de los cultivos.

Los cubreobjetos, con las células adheridas, se lavaron con solución PBS, y se fijaron durante aproximadamente 20 minutos con fijador Carnoy (Alcohol absoluto, cloroformo, ácido acético glacial, 6:3:1). A continuación, se pasaban por una serie decreciente de alcoholes, lavando por último con agua destilada, con el fin de eliminar totalmente el fijador e hidratar las preparaciones.

3.4.2.- Tinción con Gallocianina.

Los cubreobjetos, a continuación, se sometieron a tinción con

Gallocianina (Sigma), según el método de Einarson, (1932), durante 72 horas a temperatura ambiente. Las preparaciones teñidas se montaron con DePx entre porta y cubreobjetos.

Este colorante, tiñe específicamente los enlaces fosfato existentes en los ácidos nucleicos. La solución de Gallocianina (Sigma), está formada por:

- Alumbre crómico5 g
- Gallocianina0,15 g
- Agua destilada 100 ml

La mezcla colorante se prepara vertiendo el alumbre crómico sobre el agua destilada, y disolviendo la Gallocianina hasta conseguir que al enfriar no precipite el colorante. Después de ello se completa con agua destilada hasta 100 ml y se deja enfriar.

Las preparaciones, una vez teñidas, se lavan con agua destilada para arrastrar los restos del colorante y se montan. La coloración que se obtiene es de color violeta, de intensidad dependiente de la concentración.

Mediante el empleo de esta técnica de tinción, se obtienen datos relativos a la morfología nuclear en reposo y en división.

3.5.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS DAÑOS PRODUCIDOS SOBRE LAS CELULAS AFECTADAS.

Para observar los daños producidos por las amebas en cultivo conjunto con células Vero, se hicieron estudios al microscopio electrónico de transmisión.

Se prepararon cultivos celulares, a los que se les añadió un número de amebas conocido, para que la proporción de amebas/células se mantuviese a 1/1 en medio CGV + SBF. Durante períodos de tiempo de 6, 12 y 24 horas, estuvieron en contacto amebas/células en estufa a 37°C. Transcurridos los tiempos estipulados, se retiraba el medio de cultivo y se lavaban los frascos con solución PBS estéril.

3.5.1.- Procesamiento de las muestras.

Las pautas a seguir hasta conseguir los cortes semifinos de las muestras fueron:

- Fijación con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato durante 30 minutos, en caliente (37°C).
- Recogida de las células mediante una espátula, (Ruber polisman), (Costar).
- Centrifugación en tubos "eppendor", en una centrifuga microfuge (Beckman).
- Retirada del sobrenadante, adición de glutaraldehído al 2,5% en frío, y conservación a 4°C.

- Postfijación con tetraóxido de Osmio en solución PBS durante 1 hora.
- Lavado con PBS durante 10 a 15 minutos.
- Deshidratación por serie creciente de alcoholes hasta alcohol absoluto.
- Epoxipropano durante 30 minutos.
- Epón II (50% Epoxipropano y 50% Epón final), durante 90 a 120 minutos.
- Epón III (25% Epoxipropano y 50% Epón final), durante 12 horas.
- Epón final durante 24 a 60 horas a una temperatura de 60°C.

3.6.- ESTUDIO BIOQUIMICO DE LAS ALTERACIONES SUFRIDAS POR LAS CELULAS VERO.

Preparación de las muestras.

Se prepararon cultivos celulares en frascos estériles Falcon (Roux), de 75 cm² de superficie, en los que se hizo una siembra de células Vero en número fijo, (500.000), por frasco de cultivo en medio MEM suplementado con 20% de SBF, manteniéndose los cultivos durante 7 días, a fin de obtener un número de células igual en cada uno de los frascos.

Al finalizar el período de tiempo prefijado, se cambiaba el medio de cultivo a C.G.V. suplementado con 10% de SBF, y se inoculaban los frascos con cultivos de Naegleria fowleri (76/14/S₃) y Acanthamoeba griffini (S₇) en proporción 1/1 durante un período preestablecido de tiempo, que fué de 6 horas. La elección de estas dos especies, se hizo en base a su diferente comportamiento en cuanto a la citopatogenicidad. En cuanto al tiempo de 6 horas de cultivo conjunto, fué elegido por que ya hay evidencia de alteraciones a nivel ultraestructural, y existe un número considerable de células sobre las que estudiar las alteraciones bioquímicas. Tiempos superiores a este anteriormente dicho, nos impide el estudio por disminución excesiva del número de células a estudiar.

Después del tiempo de contacto, los frascos controles se lavaban con solución PBS, y se recogían las células despegándolas con solución EDTA. Los frascos que contenían los cultivos conjuntos, se sometían a enfriamiento durante unos segundos, para conseguir despegar las amebas de las células sin daño para estas últimas. Las amebas se recogían del sobrenadante

y las células adheridas a los frascos se despegaban, como anteriormente habíamos expuesto para las células controles. Una vez recogidas las células Vero control, las amebas controles y las células y amebas de los cultivos conjuntos, se contaban en cámara de Neubauer, y se congelaban a -20°C . Como método de ruptura, tanto para células como para amebas, se utilizó la sonicación. Para ello los cultivos se llevaron a un sonicador Sonifier B-12 a 50-100, vatios durante aproximadamente 1 minuto.

Obtenidos los extractos celulares, se procedió a realizar las distintas pruebas bioquímicas que a continuación se detallan:

3.6.1.- Determinación de proteínas totales.

Para la determinación de proteínas se utilizó el método descrito por Bratfor, (1976), kit comercializado por los laboratorios BIO-RAD, el cual está basado en el diferente cambio de color que sufre un colorante, en respuesta a las diferentes concentraciones de proteínas en una muestra.

En investigación, este método es recomendado en lugar de otros como por ejemplo el de Lowry, (1951), por su rapidez, mayor estabilidad de la absorbancia del complejo proteína-colorante, y por poseer menor número de interferencias.

El principio de este método está basado, en la aparición de un máximo de absorbancia entre 465 , 595 nm, cuando ocurre la unión de la proteína al complejo colorante coloreado Coomassie Brilliant blue G-250, en solución ácida.

3.6.1.1.- Determinación de la curva patrón.

Para proceder a la determinación colorimétrica de las proteínas totales, se preparó una curva patrón hecha a partir de una solución de albúmina de 1 mg/ml de solución salina PBS.

Alícuotas de esta solución, de 0, 2, 4, 8 y 16 μ l, son añadidas a 800 μ l de tampón PBS, al que se restan las añadidas de solución patrón. Para la muestra problema se toman alícuotas de cantidad variable según requiera la experiencia. A este preparado se le añaden 200 μ l de reactivo concentrado de tinción BIC-RAD. Se agitan las cubetas, y se procede a su lectura después de un período mínimo de 15 minutos en un espectrofotómetro Zeiss (PM2K) a 595nm, representando gráficamente la curva patrón y determinando, a partir de ella, la concentración protéica del problema.

3.6.2.- Extracción de lípidos.

La suspensión celular, una vez sonicada, se trató con ClO_4H 0,6 N, para dar una concentración final de 0,3 N y se centrifugó a 0°C en una centrífuga refrigerada Beckman TJ-6, a 1000 xg durante 15 minutos. Siguiendo la técnica de Santiago y cols, (1968), se extrajeron los lípidos del precipitado.

A este precipitado, se añadió 1 ml de la mezcla cloroformo-metanol-ácido clorhídrico (200:100:1), renovando con una varilla de vidrio varias veces, durante media hora. A continuación, se añadieron 3 ml de ClH

0,1 N y se centrifugó a 1000 xg durante 25 minutos. En el centrifugado se observaron tres fases:

- a.- capa superior, acuosa
- b.- capa inferior, orgánica
- c.- interfase, constituida por proteínas desnaturalizadas y precipitadas.

De ellas, la fase acuosa se elimina succionando con una pipeta Pasteur provista de una perilla de goma. En cuanto a la fase clorofórmica se separa de la película protéica por decantación cuidadosa, a un segundo tubo de boca esmerilada. El precipitado de proteínas se somete a una nueva extracción, siguiendo el mismo procedimiento. La fase clorofórmica de nuevo obtenida, se mezcla con la de la extracción anterior. Esta última fase es llevada a sequedad con nitrógeno, y resuspendida en un volumen adecuado de cloroformo que contenía BHT al 0,05% (2,6-diterc-butil-4-metil fenol), para prevenir la peroxidación de los lípidos.

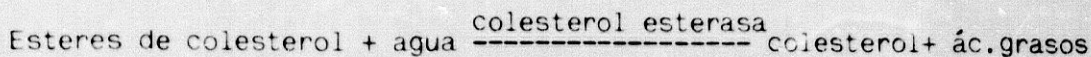
3.6.3.- Determinación de colesterol.

Para la determinación de colesterol se ha seguido un test enzimático-colorimétrico, (método CHOD-PAD), realizado con un kit de la casa Boehringer, y basado en el método de Siedel y cols, (1981).

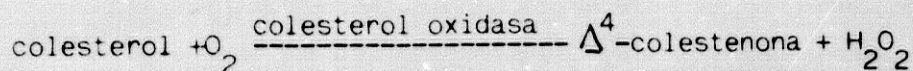
3.6.3.1.- Fundamento del test.

Los ésteres de colesterol se hidrolizan en presencia de la en-

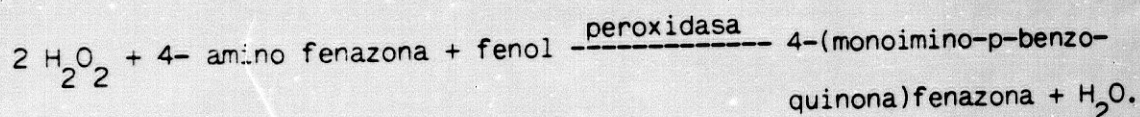
zima colesterol esterasa, produciendo colesterol y ácidos grasos:



La oxidación del colesterol en presencia de colesterol oxidasa, da lugar a la formación de Δ^4 -colestenona y peróxido de hidrógeno.



Este peróxido, junto con 4-amino fenazona y fenol, y en presencia de una peroxidasa da lugar a la formación de 4-(monoimino-p-benzoquinona) fenazona y agua.



3.6.3.2.- Proceso.

Para proceder a la determinación colorimétrica de colesterol, se preparó una curva patrón a partir una solución de 1 mg/ml.

Se tomaron alícuotas de 25 y 50 μl del patrón y 50 y 100 μl del extracto lipídico problema, y se evaporaron ambos en atmósfera de nitrógeno, y se redisolviéron en 25 μl de isopropanol. Se agitaron vigorosamente los tubos de ensayo de forma que todo quedase bien disuelto, y se añadieron 2 ml del reactivo (CHOD-PAD) (apartado 3.3) a cada uno, incluido un blanco que también llevaba 25 μl de isopropanol. Se mezcló bien y a continuación

se incubó 15 minutos a 37°C, dejando enfriar unos minutos antes de proceder a la lectura en un espectrofotómetro a 500 nm.

Cálculos.

La concentración total de colesterol se ha estimado según la fórmula:

$$C_t = \frac{D_o \times a \times V_l}{V_t \times P \times V_I}$$

donde

- C_t = ug de colesterol por mg de proteína
- D_o = Absorbancia debida al colesterol total
- a = Pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por minimos cuadrados en $\mu\text{g}/\text{U.D.O.}$
- V_l = Volumen de extracto lipídico obtenido en ml
- V_t = Volumen de la alícuota de extracto lipídico utilizado para la colorimetría, (ml).
- V_I = Alícuota de la suspensión de la que se parte (ml).
- P = Concentración de proteínas de la suspensión en mg/ml.

3.6.4.- Determinación de fosfolípidos.

Se ha seguido el método de Fiske y Subbarow, (1925), modificado por Bartlett, (1959), partiendo de los extractos obtenidos según se

describió en el apartado 3.6.2.

3.6.4.1.- Fundamento.

Por lo general, este tipo de técnicas consisten en efectuar primeramente una fosforilisis ácida, y determinar luego fosfatos mediante una reacción coloreada, cuantitativa, con ácido molibdico. El ácido molibdico pasa a fosfomolibdico, el cual se reduce selectivamente en presencia de ácido 1- amino-2 naftol-3- sulfónico, dando un compuesto de color azul intenso con un máximo de absorción de 830 nm.

3.6.4.2.- Proceso.

Para poder extrapolar las concentraciones a partir de las densidades ópticas de las muestras, se utiliza una solución patrón de fosfato disódico equivalente a 10 $\mu\text{g/ml}$ de fósforo.

En tubos graduados de 10 ml de capacidad, lavados con detergente especial exento de fosfatos, se añaden alícuotas de extracto lipídico del orden de 50-100 μl , y asimismo volúmenes de 0,15, 0,3 y 0,6 ml de la solución patrón.

A todos los tubos se les adiciona 1,2 ml de ácido perclórico al 70% y dos gotas de molibdato amónico al 5%, completándose con agua bi-distilada hasta 2 ml. Se agitan los tubos manualmente con suavidad, y se colocan en un baño de arena tapados con bolas de cristal.

La digestión se lleva a cabo dejando subir la temperatura hasta 180°C, donde se mantiene unos 30 minutos, hasta que el color haya desaparecido completamente.

Se dejan entonces enfriar lentamente y se añade 0,4 ml de molibdato amónico al 5% en ácido sulfúrico 2M, y 0,4 ml de reactivo de Fiske y Subbarow, (2g/l de 1- amino-2 naftol-3- sulfónico; 120 g/l de metabisulfito sódico y 12 g de sulfito sódico anhidro disueltos en agua bidestilada, calentando 1 minuto al baño maría para su perfecta disolución). Finalmente se completan hasta los 10 ml con agua bidestilada, se agitan y se colocan en un baño maría a 100°C durante 15 minutos, apareciendo una coloración azul. Una vez fríos, los tubos se leen a 830 nm frente a un blanco de agua bidestilada, tratada de igual manera.

Cálculos.

La concentración de fósforo lipídico se calcula por la siguiente fórmula.

$$P_t = \frac{D_{op} \times a \times V_l}{V_p \times V_i \times P}$$

en la cual

P_t = Concentración de fósforo lipídico total en $\mu\text{g/ml}$ de proteínas.

D_{op} = Absorbancia debida al fósforo total.

a = Pendiente de la recta de regresión calculada para la curva patrón por mínimos cuadrados en $\mu\text{g/ U.D.O.}$

- V_1 = Volúmen en ml de extracto lipídico obtenido inicialmente
 V_p = Volúmen de extracto lipídico utilizado para la colorimetría en ml.
 V_i = Alicuota de la suspensión de la que se parte (ml).
 P = Concentración de proteínas de la suspensión en $\mu\text{g/ml}$.

3.6.5.- Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Para la extracción de ésteres metílicos de lípidos totales, se evaporan las muestras hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno, y se continúa siguiendo la técnica de Morrison y Smith, (1964).

A las muestras contenidas en los tubos de ensayo se les añade 1 ml de BF_3 en metanol al 14%, cerrando herméticamente los tubos después de haber pasado una corriente de nitrógeno. Se ponen en baño maría a 100°C durante 30 minutos. Se enfrían, se añaden 2 ml de n-heptano y se agita mediante un vibrador. Se añade después 1 ml de agua bidestilada y se centrifuga a 600 xg durante 5 minutos, apareciendo dos fases líquidas perfectamente diferenciadas.

La fase superior, formada por el n-heptano con los ésteres metílicos de los ácidos grasos en disolución, se extrae con una jeringa y se vierte en otros tubos de ensayo. Esta operación se repite varias veces y se guarda en frío el n-heptano con los ésteres metílicos en tubos cerrados, y atmósfera de nitrógeno.

Para el análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, la disolución de estos en n-heptano se evaporó totalmente en corriente de nitrógeno, y se redisolvió en n-heptano (20-50 μ l) hasta alcanzar la concentración adecuada.

3.6.5.1.- Cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Para la cromatografía en fase gaseosa, se utilizó un cromatógrafo HEWLETT PACKARD modelo 5880 A, con detector de ionización de llama.

El análisis se realizó en una columna de vidrio, de 2 m de longitud por 2 mm de diámetro interior, con una fase estacionaria de SP 2340 al 12% sobre Chromosorb WAW 100/120 mesh, suministrada por Teknokroma (Barcelona), similar a la empleada por Heckers y cols, (1977).

Los flujos utilizados para el análisis fueron de 20 l/min para el nitrógeno, 30 l/min para el hidrógeno y para el aire 30 l/min; la atenuación en todos los casos fue de 2^4 .

De la muestra, previamente disuelta en 20-30 μ l de n-heptano se inyectaron de 0,4-1 μ l, según la muestra, empleando una microjeringa de 10 μ l.

La programación de temperaturas fue como sigue: temperatura inicial de 185 $^{\circ}$ C, mantenida durante 8 minutos y se incrementó a razón de 3 $^{\circ}$ C por minuto hasta alcanzar los 260 $^{\circ}$ C, temperatura a la cual se mantuvo el

horno otros 15 minutos para eliminar posibles impurezas existentes en las muestras.

Para la identificación de los ácidos grasos, se utilizó una solución estándar compuesta por una mezcla al 0,02% de ésteres metílicos de los ácidos grasos siguientes:

Caprílico (C-8)
Cáprico (C-10)
Láurico (C-12)
Mirístico (C-14)
Palmítico (C-16)
Palmitoléico (C-16:1)
Esteárico (C-18)
Oléico (C-18:1)
Linoléico (C-18:2)
Linolénico (C-18:3)
Aráquico (C-20)
11,14- Ecicosadienóico (C-20:2)
Araquidónico (C-20:4)
Docosatetraenóico (C-22:4)
Lignocérico (C-24)

Tratamiento estadístico de los resultados

Las concentraciones de ácidos grasos se han expresado en todos los casos como porcentajes relativos, calculando las correspondientes medias el error estandar de la media, valores que son los consignados en las correspondientes tablas.

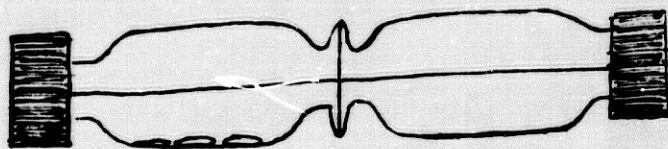
La comparación entre diferentes medias se ha llevado a cabo mediante un test de "t" de Student.

3.7.- ESTUDIO DE LA NATURALEZA Y ACCION DEL FACTOR O FACTORES CITOPATO- GENICOS.

3.7.1.- Determinación de factores difusibles o no difusibles.

Para dilucidar si el ECP es debido a la acción de un factor o factores difusibles en el medio, o, por el contrario, es necesario el estrecho contacto del parásito con la célula, se montaron una serie de experiencias.

Se hicieron cultivos de amebas y células por separado, en cámaras de difusión intercalándose filtros de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, previamente esterilizadas al autoclave a 121°C durante 30 minutos.



Los cultivos celulares se hicieron sobre cubreobjetos, con un número fijo de células (3.000) por cristal. Las cámaras se llenaron con medio C.G.V. suplementado con 5% de SBF. En uno de los compartimentos se depositaron los cubreobjetos con las células ya adheridas, mediante pinzas esterilizadas, y en el otro compartimento se depositaron los distintos cultivos amebianos. Se montaron asimismo los oportunos controles.

Los cristales eran retirados a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de cultivo. Para ello los cristales eran extraídos de las cámaras de difusión en esterilidad, depositados en una placa de microtitulación, fijados y teñidos con Gallocianina y finalmente observados al microscopio óptico.

Para poder constatar los resultados obtenidos con esta experiencia, se procedió a montar otras nuevas experiencias a las que nombramos A, B y C.

3.7.1.1.- Experiencias.

A.- Se hicieron cultivos conjuntos en placas de microtitulación (apartado 3.2), de células Vero y cada una de las especies amebianas antes mencionadas.

En placas de microtitulación se mantuvieron cultivos de las distintas especies amebianas, durante 5 y 24 horas en medio de cultivo C.G.V., suplementado con 5% de SBF. Los medios de cultivo fueron centrifugados, y los sobrenadantes depositados sobre cultivos celulares nuevos. Se estudiaron al microscopio óptico durante 24, 48 y 72 horas con el fin de poder advertir posibles alteraciones en las células.

B.- Sobre un cultivo en placa de microtitulación de células Vero (3.000), se depositaron los distintos cultivos amebianos, en número ligeramente superior, en medio C.G.V. suplementado con 5% de SBF. Se mantuvieron

durante un tiempo de 5 y 24 horas en contacto, período este último en el cual prácticamente había desaparecido el cemento celular, y se recogieron en tubos "eppendor ". Estos medios se centrifugaron a máxima velocidad en una centrifuga "microfuge" (Beckman), para evitar que en los sobrenadantes quedase alguna forma amebiana y estos, se añadieron a cultivos celulares nuevos. Se observaron durante 24, 48 y 72 horas al microscopio óptico.

C.- A cultivos celulares, a los que se mantiene durante 5 y 24 horas con medio C.G.V. suplementado con 5% de SBF, se les retiró el medio de cultivo y se le puso en contacto con cultivos amebianos durante 5 y 24 horas.

Posterior a este tiempo se le recogieron los medios de cultivo, se centrifugaron y se depositaron los sobrenadantes sobre cultivos nuevos de células Vero. Se observaron al microscopio óptico a las 24, 48 y 72 horas.

3.7.1.2.- Efecto de la temperatura sobre el factor citopatogénico en algunas de las especies amebianas.

Comprobadas las especies cuyos sobrenadantes mostraban un efecto citopatogénico, sobre cultivos celulares nuevos de células Vero, se pensó en estudiar el efecto que la temperatura podía ejercer sobre el factor existente en el sobrenadante.

Se montaron, para ello, en placas de microtitulación unos cul-

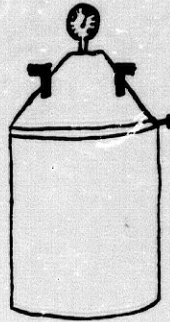
tivos conjuntos de células Vero y las cuatro especies de amebas cuyo sobrenadante mostraba efecto sobre las células. Después de estar en contacto las células y las amebas, hasta que las primeras prácticamente habían desaparecido, se recogían los sobrenadantes y se centrifugaron. Los nuevos sobrenadantes, se depositaron en tubos "eppendor" estériles y se sometieron a la acción de distintas temperaturas. Se ensayaron temperaturas de 44°C durante 1 hora; 56°C durante 30 minutos; 100°C durante 1 minuto, 4°C y -20°C durante 4 horas. Asimismo, se montaron unos pocillos iguales con los sobrenadantes a temperatura de 37°C. Se montaron los oportunos controles. La observación se llevó a cabo bajo microscopio óptico durante 24, 48 y 72 horas.

Posterior a este ensayo, se montó una nueva experiencia para comprobar si los resultados obtenidos, sobre el efecto de la temperatura, en la línea celular Vero eran reproducibles en otras líneas celulares. Para ello, sobre placa de microtitulación se depositaron unos cultivos de células HeLa. El tratamiento de los cultivos fué igual al descrito anteriormente. La observación se realizó a las 24, 48 y 72 horas al microscopio óptico.

3.8.- AISLAMIENTO DE MEMBRANAS.

Para la obtención de las membranas amebianas, partimos de cultivos en frascos Falcon (Roux), de 75 cm² de superficie, con medio C.G.V. estéril. Estos frascos se lavaban con solución PBS, y las amebas se recogían por agitación y posterior succión con una pipeta Pasteur, y se pasaban a tubos "esteriline" de fondo cónico, y se centrifugaban a 2.000 rpm durante 10 minutos.

Una vez centrifugadas, se calculó el número de amebas por ml de solución, tras recuento en una cámara de Neubauer. Finalmente, se depositaban las amebas en tubos "eppendor" para llevarlas a un disruptor celular para facilitar la ruptura de las amebas. Esta se llevó a cabo en el mencionado disruptor, por descompresión de nitrógeno a 2.500 psi, durante dos períodos de tiempo de 5 minutos cada uno.



La suspensión amebiana obtenida de cada una de las especies, se someten a centrifugación en gradiente de Percoll, con el fin de obtener las membranas. Para ello se preparó el Percoll de la siguiente forma:

Solución madre de Percoll	9 p
Na Cl 1,5 M	1 p

De esta solución anterior, se tomaba el 22% y se añadía hasta el 100% con Na Cl 0,15 M. Todo el proceso se llevaba a cabo bajo condiciones estériles.

En tubos "eppendor " con 1 ml de esta solución de Percoll se depositaban las suspensiones amebianas. La centrifugación se realizó en una centrifuga "microfuge" (Beckman), durante 10 minutos. Después de la centrifugación se observan tres zonas:

Zona superiormembranas
Zona intermediaPercoll
Zona inferiorRestos de amebas y contaminantes

La zona superior con las membranas, se recogía con una pipeta Pasteur y se pasaba a otro "eppendor ", congelándose este a continuación.

Una vez obtenida la fracción con las membranas, se hizo determinación de proteínas totales por el método del Bio-Rad. Conocida la concentración de proteínas de las membranas de cada especie amebiana, y para estudiar el comportamiento de estas frente a cultivos celulares y comprobar si en estas radica el efecto citopatogénico, se montó una nueva experiencia.

Sobre cultivos de células Vero, alícuotas de extracto de membranas de cada una de las especies ensayadas, en cantidades variables, (proteínas), siendo la cantidad de aproximadamente 30 ug la más efectiva; se mantuvieron durante 24 y 48 horas, evaluándose los resultados al mi-

microscopio óptico. Posteriormente los cultivos eran fijados y teñidos para su estudio.

5

4.- RESULTADOS

5

5

4.1.- SOBRE EL ESTUDIO DE LA CITOPATOGENICIDAD DE DISTINTAS ESPECIES
AMEBIANAS FRENTE A CELULAS VERO.

Los resultados obtenidos sobre la acción citopatógena de distintas especies amebianas frente a células Vero aparecen reflejados en el Cuadro nº1.

Dependiendo de el grado de citopatoogenicidad y del tiempo en el cual se alcanza dicho grado, podemos decir que las especies mas citopatógenas son: Naegleria fowleri 76/14/S₃ y Acanthamoeba Gr-1 ya que, a las 18 horas de cultivo conjunto han destruido la monocapa celular.

Por el contrario, las especies que demuestran un bajo poder citopatógeno son: Acanthamoeba lugdunensis (SH₅₆₅) y Acanthamoeba griffini (S₇), puesto que ni a las 72 horas de cultivo conjunto son capaces de destruir la monocapa celular.

El resto de las especies estudiadas presentan un grado medio de citopatoogenicidad, respecto a unas y otras anteriormente mencionadas. Las células controles permanecieron hasta las 72 horas de cultivo sin ninguna alteración manifiesta.

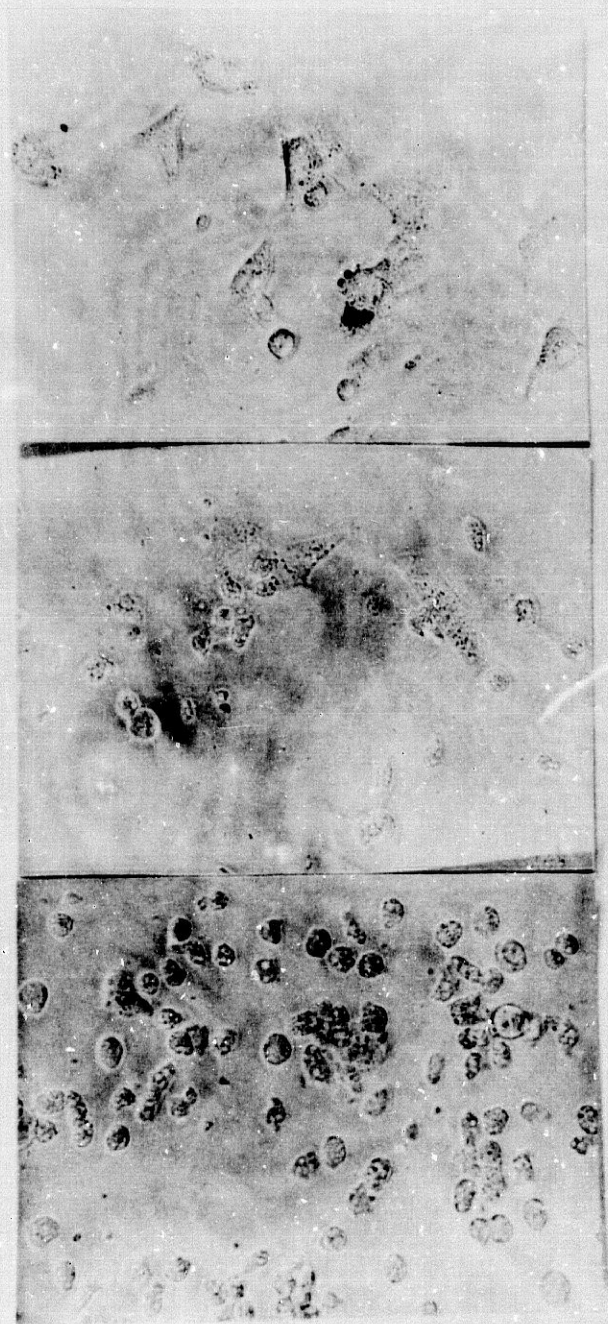
CUADRO Nº 1. ACCIÓN CITOPATOGENICA DE DISTINTAS ESPECIES DE AMEBAS SOBRE CULTIVOS DE CELULAS VERO A DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO Y DISTINTA RELACION Nº AMEBAS/Nº CELULAS VERO.

Especie amebiana	a/c	5H	12H	18H	24H	48H	72H
NAEGLERIA FOWLERI 76.14/S ₃	A	2	4	4	4	4	4
	B	1	2	4	4	4	4
	C	1	1	3	3	4	4
ACANTHAMOEBA CASTELLANIT	A	2	3	4	4	4	4
	B	1	2	2	3	4	4
	C	1	1	1	2	3	3
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS	A	2	3	3	4	4	4
	B	1	3	3	3	3	4
	C	1	1	1	2	2	3
ACANTHAMOEBA GP-1	A	3	4	4	4	4	4
	B	2	2	4	4	4	4
	C	1	1	1	3	4	4
ACANTHAMOEBA CULBERTSONI (A ₁)	A	3	3	4	4	4	4
	B	1	2	3	3	3	4
	C	1	1	2	2	2	3
ACANTHAMOEBA LENTICULATA (PD ₂)	A	2	4	4	4	4	4
	B	1	2	3	3	4	4
	C	1	1	2	2	3	3
ACANTHAMOEBA GRIFFINI (S ₇)	A	2	3	3	4	4	4
	B	1	2	3	3	3	3
	C	1	1	1	1	2	2
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS (SH ₅₆₅)	A	2	2	3	3	4	4
	B	1	1	1	1	2	3
	C	1	1	1	1	1	1
CONTROLES	A	1	1	1	1	1	1
	B	1	1	1	1	1	1
	C	1	1	1	1	1	1

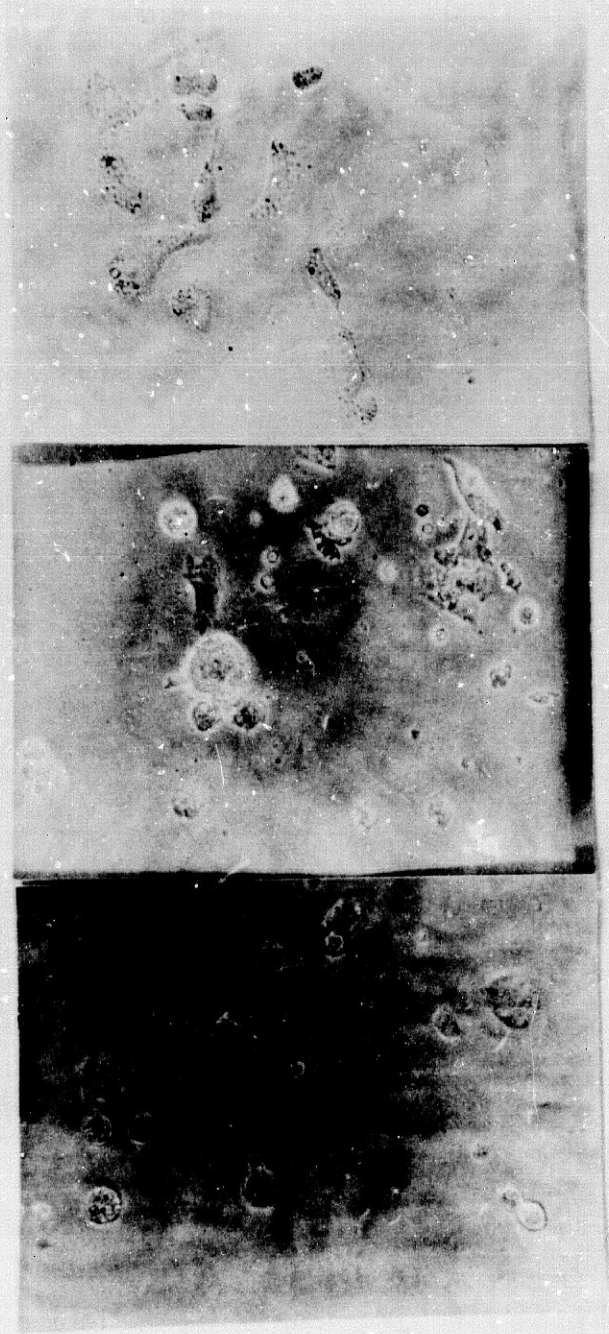
a/c = Relación nº amebas/nº células (A= 10/1 ; B= 1/1 ; C= 1/10)

1= Células normales. 2= Células redondeadas y refringentes. 3= Células aisladas

4= Desaparece el tapiz celular.



Microfotografía nº1.- Estudio "in vivo" de la acción citopatogénica de A. Gr-1 sobre células vero; (6 , 12 y 24 horas de cultivo).



Microfotografía nº2.- Estudio "in vivo" de la acción citopatogénica de A. lugdunensis (SH₅₆₅) sobre células vero; (24, 48 y 72 horas de cultivo).

4.2.- SOBRE LA NATURALEZA DEL FACTOR O FACTORES CITOPATOGENICOS.

Los resultados obtenidos con las cámaras de difusión, no fueron satisfactorios para dilucidar si el factor responsable de la citopatogenicidad era difusible, ó no, en el medio de cultivo.

Las experiencias que se montaron a continuación, si dieron resultados satisfactorios, los cuales se reflejan en los Cuadros nº 2 al 4. En el cuadro nº 3, se observa que existen varias especies las cuales causan alteraciones en las células, al añadir solamente los sobrenadantes de los cultivos conjuntos, sin existir contacto directo entre célula-parásito. Asimismo, hay otras especies que si necesitan de un contacto directo con la célula para que se manifieste el efecto, pensando en la posibilidad de que sea a nivel de membrana donde radique el efecto citopatogénico.

Posterior a estas experiencias, se llevó a cabo una nueva experiencia con los sobrenadantes de los cultivos con acción citopatogénica manifiesta. Se estudió el efecto de la temperatura sobre los sobrenadantes de las 4 especies amebianas con efecto manifiesto. Los resultados obtenidos se reflejan en el Cuadro nº 5. A continuación se realizó una nueva prueba para ver si sobre una línea celular distinta conseguimos idénticos resultados. La experiencia se montó con células HeLa y los resultados obtenidos están reflejados en el Cuadro nº 6.

CUADRO Nº 2. EXPERIENCIA A. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS DE CELULAS VERO AL ADICIONAR LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS.

<u>Especies amebianas</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Alteraciones</u> 72H
NAEGLERIA FOWLERI 76/14/S ₃	A	-
	B	-
ACANTHAMOEBA CASTELLANI	A	-
	B	-
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS	A	-
	B	-
ACANTHAMOEBA Gr-1	A	-
	B	-
ACANTHAMOEBA CULBERTSONI (A ₁)	A	-
	B	-
ACANTHAMOEBA LENTICULATA (PD ₂)	A	-
	B	-
ACANTHAMOEBA GRIFFINI (S ₇)	A	-
	B	-
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS (SH ₅₆₅)	A	-
	B	-
CONTROLES VERO	A	-
	B	-

A= tiempo de cultivo conjunto de 5H
 B= tiempo de cultivo conjunto de 24H

- Ausencia de alteraciones
 + Presencia de alteraciones

CUADRO Nº 3. EXPERIENCIA B. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS DE CELULAS VERO AL ADICIONAR LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS CONJUNTOS DE DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS-CELULAS VERO.

Especies amebianas-Células Vero	Tiempo	Alteraciones		
		24H	48H	72H
NAEGLERIA FOWLERI 76/14/S ₃	A	-	-	-
	B	-	-	-
ACANTHAMOEBA CASTELLANII	A	-	-	-
	B	-	-	-
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS	A	-	+	+
	B	-	+	+
ACANTHAMOEBA Gr-1	A	-	-	-
	B	-	-	-
ACANTHAMOEBA CULBERTSONI (A ₁)	A	-	+	+
	B	-	+	+
ACANTHAMOEBA LENTICULATA (PD ₂)	A	-	-	-
	B	-	-	-
ACANTHAMOEBA GRIFFINI (S ₇)	A	-	+	+
	B	-	+	+
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS (SH ₅₆₅)	A	-	+	+
	B	-	+	+
CONTROLES VERO	A	-	-	-
	B	-	-	-

A= tiempo de cultivo conjunto 5H

B= tiempo de cultivo conjunto 24H

- Ausencia de alteraciones

+ Presencia de alteraciones

CUADRO Nº 4. EXPERIENCIA C. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS DE CELULAS VERO AL ADICIONAR LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE DISTINTAS ESPECIES MAEBIANAS LOS CUALES PREVIAMENTE HAN ESTADO EN CONTACTO CON SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE CELULAS VERO.

<u>Cultivo Vero I</u>	<u>Especies amebianas</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Cultivo Vero II (72 H)</u>
A	NAEGLERIA FOWLERI 76/14/S ₃	A	-
B		B	-
A	ACANTHAMOEBA CASTELLANII	A	-
B		B	-
A	ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS	A	-
B		B	-
A	ACANTHAMOEBA Gr-1	A	-
B		B	-
A	ACANTHAMOEBA CULBERTSONI (A ₁)	A	-
B		B	-
A	ACANTHAMOEBA LENTICULATA (PD ₂)	A	-
B		B	-
A	ACANTHAMOEBA GRIFFINI (S ₇)	A	-
B		B	-
A	ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS (SH ₅₆₅)	A	-
B		B	-
A	CONTROLES VERO	A	-
B		B	-

A= Tiempo de cultivo de 5 H

B= Tiempo de cultivo de 24 H

- Ausencia de alteraciones en las células Vero

+ Presencia de alteraciones

CUADRONº 5. RESULTADOS OBTENIDOS SOBRE LA ACCION DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS
 CONJUNTOS DE VARIAS ESPECIES AMEBIANAS-CELULAS VERO, EN CULTIVO DE CELULAS VERO.

<u>Especies maebianas</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Temperaturas</u>					
		<u>37°C</u>	<u>44°C</u>	<u>56°C</u>	<u>100°C</u>	<u>4°C</u>	<u>-20°C</u>
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	+	+	+	+	-	-
	72H	+	+	+	+	-	-
ACANTHAMOEBA CULBERTSONI (A ₁)	24H	+	+	+	-	+	+
	48H	+	+	+	*	+	+
	72H	+	+	+	-	+	+
ACANTHAMOEBA GRIFFINI(S ₇)	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	+	-	-	-	-	-
	72H	+	-	-	-	-	-
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS (SH ₅₆₅)	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	+	-	-	-	-	-
	72H	+	-	-	-	-	-
CONTROLES	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	-	-	-	-	-	-
	72H	-	-	-	-	-	-

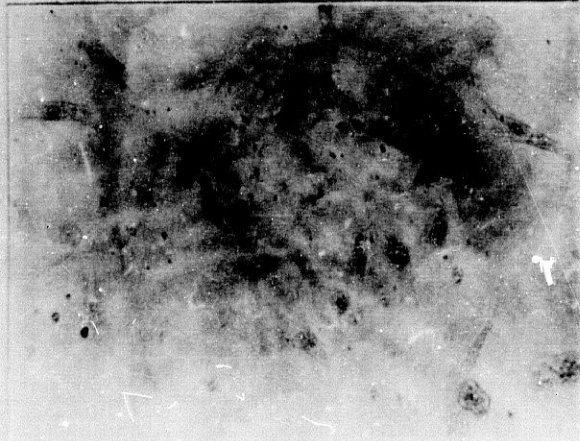
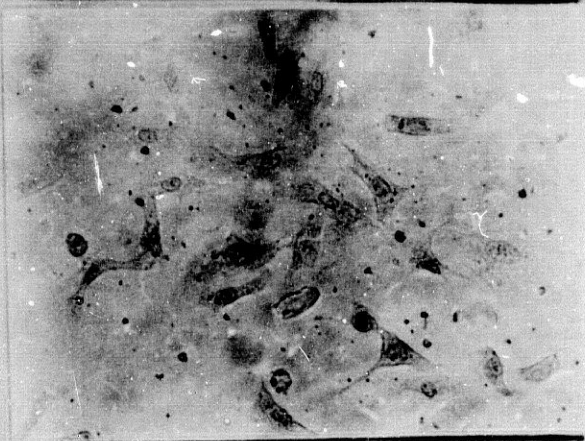
* Ausencia de alteraciones, células Vero
 en mejor estado que las controles

- Ausencia de alteraciones
 + Presencia de alteraciones

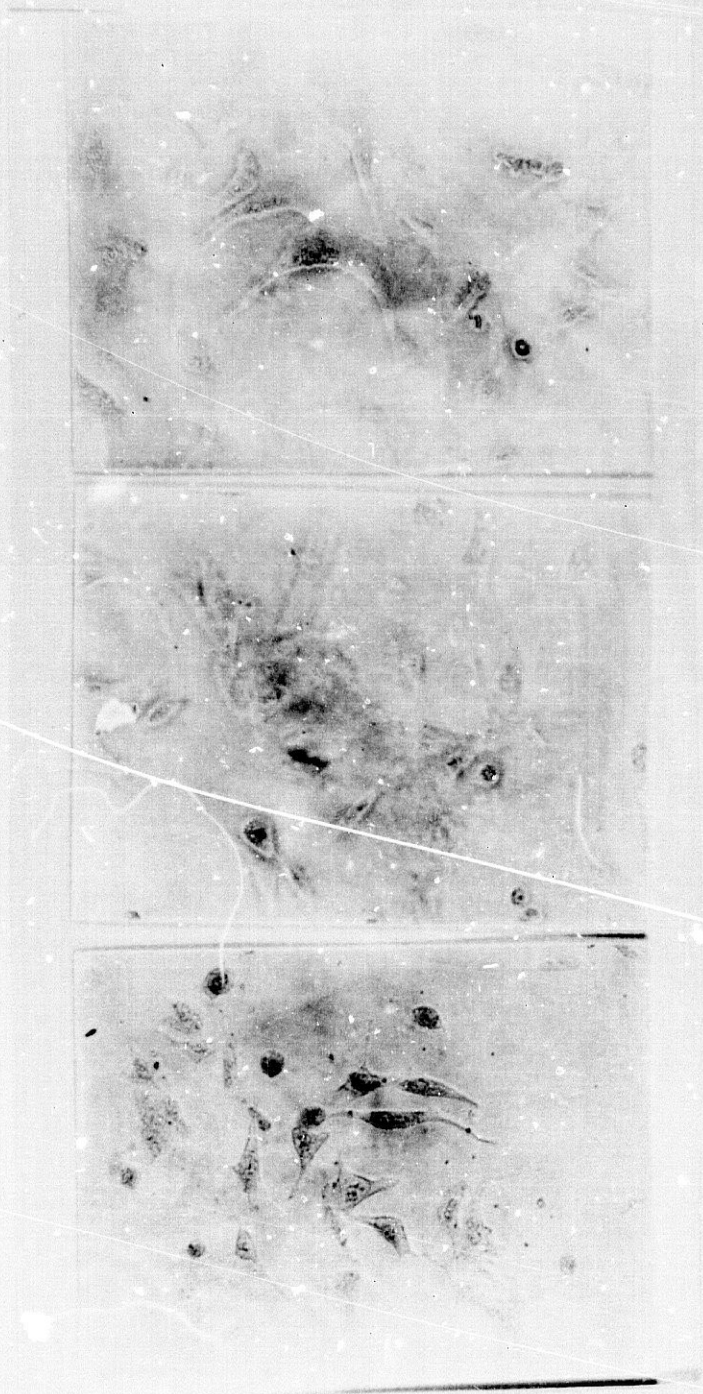
CUADRO Nº 6. RESULTADOS OBTENIDOS SOBRE LA ACCION DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS SOBREVIVIENTES DE LOS CULTIVOS
 CONJUNTOS DE VARIAS ESPECIES AMEBIANAS-CELULAS VERO, EN CULTIVO DE CELULAS HELA.

Especies amebianas	Tiempo	Temperaturas					
		37°C	44°C	56°C	100°C	4°C	-20°C
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	-	-	-	-	-	-
	72H	-	-	-	-	-	-
ACANTHAMOEBA CULBERTSONI (A ₁)	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	-	-	-	-	-	-
	72H	-	-	-	-	-	-
ACANTHAMOEBA GRIFFINI (S ₇)	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	-	-	-	-	-	-
	72H	-	-	-	-	-	-
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS (SH ₅₆₅)	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	-	-	-	-	-	-
	72H	-	-	-	-	-	-
CONTROLES HELA	24H	-	-	-	-	-	-
	48H	-	-	-	-	-	-
	72H	-	-	-	-	-	-

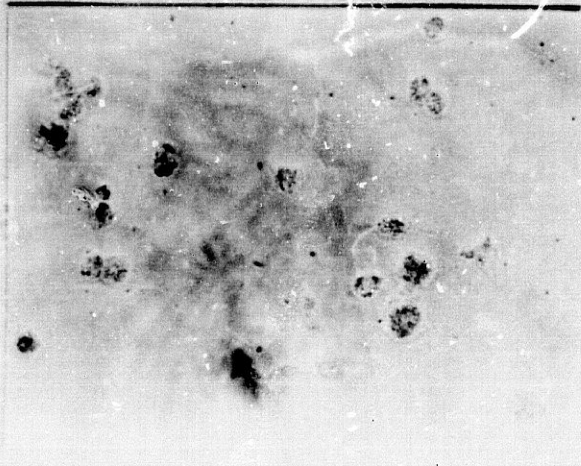
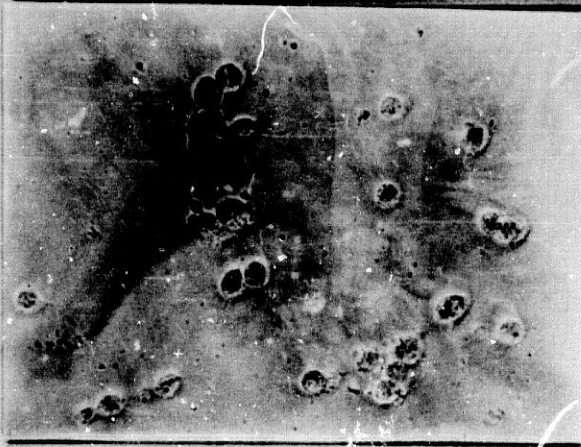
- Ausencia de alteraciones
 . Presencia de alteraciones



Microfotografía nº3.- Estudio de la presencia de factores difusibles o no difusibles citopatogénicos, excretados por las amebas sobre células Vero. Cultivo de células Vero control (24, 48 y 72 horas de cultivo).



Microfotografía nº 4.- Ausencia de factores difusibles citopatogénicos.
Cultivo de células Vero incubado con el sobrenadante de A.lenticulata
(PD₂) a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.



Microfotografía nº 5.- Presencia de factores difusibles citopatogénicos.
Cultivo de células Vero incubado con el sobrenadante de A. castellanii
a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.

4.3.- SOBRE LA CAPACIDAD CITOPATOGENA ASOCIADA A LAS MEMBRANAS.

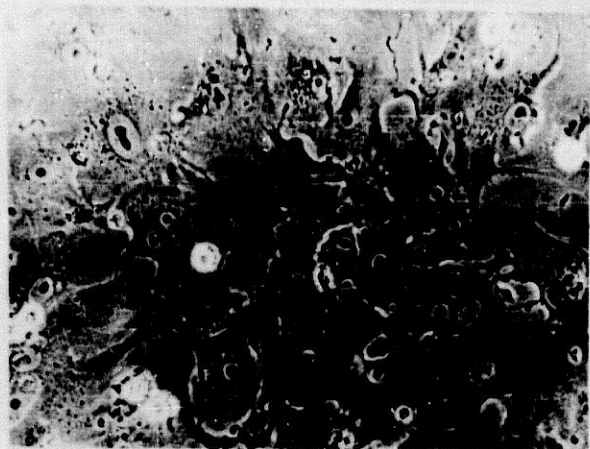
En el cuadro N° 7 de resultados, se reflejan las especies amebianas cuyas membranas presentan una acción citopatógena sobre cultivos celulares.

Aquellas especies que provocan alteraciones sobre las células Veró, lo hacen ya a las 24 horas de cultivo. Estas especies son Acanthamoeba castellanii y Acanthamoeba griffini (S₇).

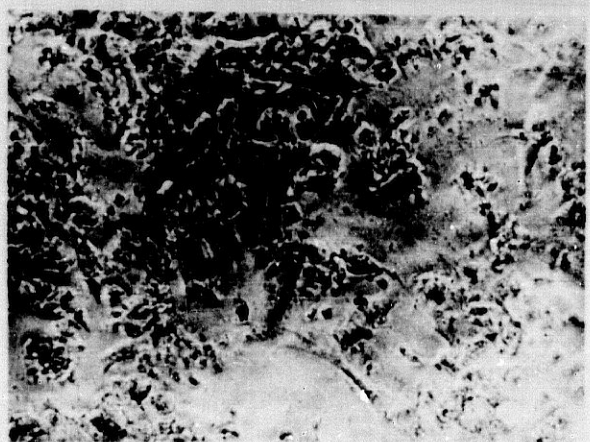
CUADRO Nº 7. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS DE CELULAS VERO AL ADICIONAR LAS MEMBRANAS DE LAS
DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS.

<u>Especies amebianas</u>	<u>Presencia de alteraciones en células vero</u>	
	<u>24H</u>	<u>48H</u>
NAEGLERIA FOHLERI 76/14/S ₃	-	-
ACANTHAMOEBA CASTELLANTI	+	+
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS	-	-
ACANTHAMOEBA GP-1	-	-
ACANTHAMOEBA CULBERTSONI (A ₁)	-	-
ACANTHAMOEBA LENTICULATA (PD ₂)	-	-
ACANTHAMOEBA GRIFFINI (S ₇)	+	-
ACANTHAMOEBA LUGDUNENSIS (SH ₅₆₅)	-	-
CONTROLES VERO	-	-

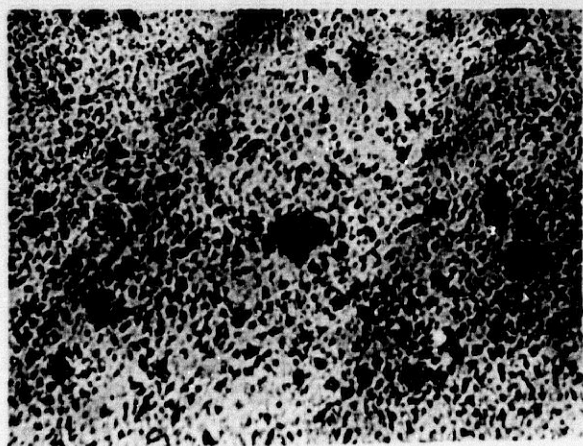
- Ausencia de alteraciones en las células Vero
+ presencia de alteraciones en las células Vero



A

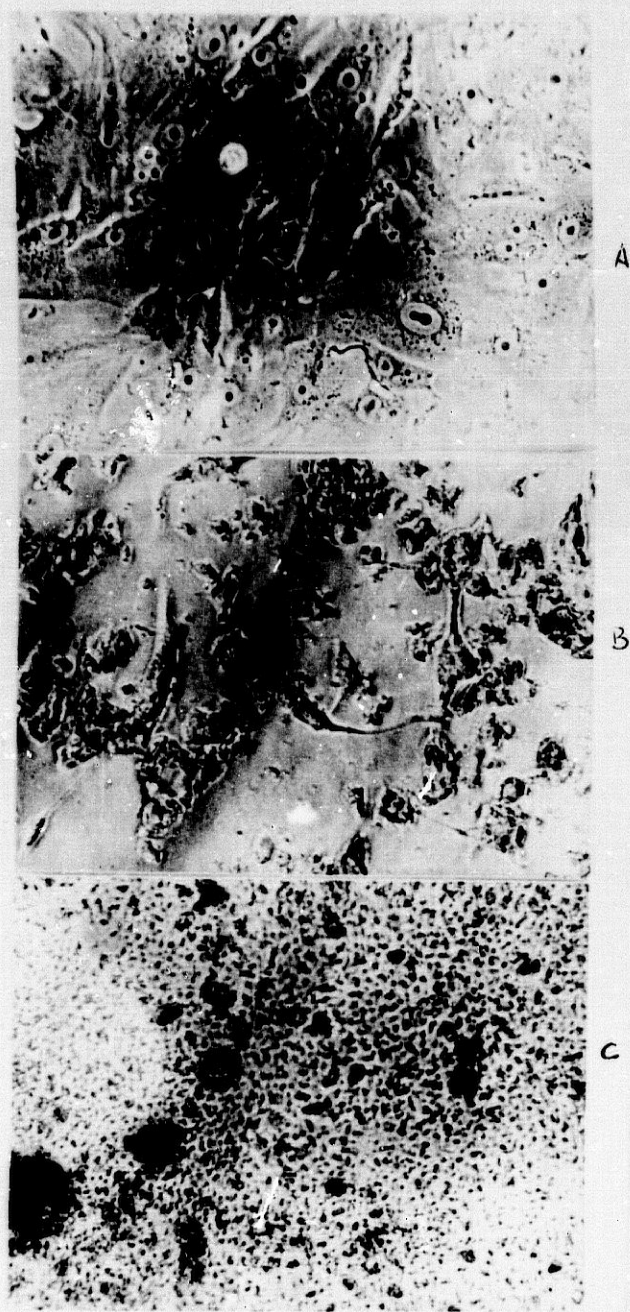


B



C

Microfotografía nº6.- Estudio de la capacidad citopatógena asociada a las membranas amebianas sobre células Vero a las 24 horas de cultivo.
A- Cultivo células Vero control. B- Cultivo células Vero- A.Gr-1.
C- Cultivo células Vero- A. castellanii.



Microfotografía nº 7.- Estudio de la capacidad citopatógena asociada a las membranas amebianas sobre células Ver0 a las 48 horas de cultivo. A- Células Ver0 control. B- Células Ver0-A. Gr-1. C- Células Ver0-A. castellanii.

4.4.- SOBRE EL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS ALTERACIONES SUFRIDAS POR LAS CELULAS VERO EN CULTIVO CONJUNTO CON DISTITAS ESPECIES AMEBIANNAS.

A.) Microscopía óptica. Vero control.

Los cultivos de células Vero a microscopía óptica, muestran una morfología muy variable. Transcurrido un cierto tiempo de cultivo las células aparecen próximas unas a otras, aunque no estrechamente adosadas.

No muestran expansiones ectoplasmáticas, sino que el citoplasma se colorea uniformemente. El núcleo, generalmente único, suele ocupar una posición central en la región celular mas ensanchada. Las regiones distales al núcleo se adelgazan progresivamente, hasta los extremos celulares que son muy finos. La mayoría poseen un solo núcleo, que en otras ocasiones no se observa, apareciendo cromatina difusa por el nucleoplasma y adherida a la membrana nuclear, (fot. 8).

B.) Microscopía electrónica. Vero control.

La membrana plasmática aparece perfectamente delimitada, carente de glicocalix, y con ultraestructura típica de unidad de membrana. No se aprecian extensiones citoplasmáticas aparentes de gran tamaño. De forma irregular, (Fot 9), a ciertos intervalos existen pequeñas prolongaciones digitiformes, de sección circular. Su diámetro es a veces regular, y otras menor en la base, dándole aspecto estrangulado. La elec-

trodensidad de estas prolongaciones es similar a la del resto del citoplasma. En su interior, (fot 9), se aprecian fibrillas dispuestas paralelamente al eje mayor. Estas digitaciones parecen formarse a partir de paqueñas verrugas de la superficie celular, que se alargan progresivamente. La función de estas digitaciones nos es desconocida, (adhesión al sustrato), pero, en ocasiones, pudieran estar relacionadas con procesos fagocíticos, pues al fusionarse dos de ellas pueden dar lugar a vacuolas próximas a la superficie celular, (fot 10).

No se aprecian vacuolas lipídicas.

El citoplasma muestra una electrodensidad muy uniforme, de modo que no pueden diferenciarse regiones citoplasmáticas. Los ribosomas libres se distribuyen de forma irregular.

El retículo endoplasmático rugoso, se organiza en cadenas de corto y largo recorrido, dispuestas de modo anárquico en el citoplasma, sin que se compruebe una clara asociación a mitocondrias, (fot 9). Existen cadenas de retículo liso, a veces con contorno ondulado y próximas unas a otras, (fot 10).

Dispersos por el citoplasma, se aprecian cuerpos electrodensos de tamaño variable, forma oval ó esférica y, algunos, claramente delimitados por una unidad de membrana, (fot 9).

El citoplasma muestra abundantes estructuras filamentosas y microtubulares, a veces de longitud considerable.

El aparato de Golgi se aprecia en algunas células. No parece estar asociado al núcleo ó en su proximidad. Aparece formado, (fot 10), por una serie de sáculos aplanados en el centro y engrosados en los extremos, (dictiosomas), en número elevado. De los sáculos mas ensanchados parten vesículas ó lisosomas.

No hemos observado centriolos, en ninguna de las células estudiadas ultraestructuralmente.

Las mitocondrias son abundantes. Se encuentran dispersas irregularmente por el citoplasma. En sección transversa su contorno es circular u ovalado. En sección longitudinal, aparecen alargadas, (fot 10), ovoides ó con los extremos mazudos, (fot 10). La matriz mitocondrial es mas electrodensa que el contenido citoplasmático. No existen cuerpos densos intramitocondriales. Las criptas mitocondriales se disponen paralelas unas a otras en sección longitudinal, lo que da lugar en cortes transversos a espacios lacunares circulares.

El núcleo aparece en posición central, en la región celular mas engrosada. Su forma es alargada, (fot 9), con diámetro mayor paralelo al eje mayor celular. La envoltura nuclear está formada por dos unidades de membrana contiguas. Sobre la membrana interna se observan adheridos abundantes ribosomas. El contorno nuclear es a veces de trazo continuo, otras aparecen evaginaciones e invaginaciones netas, que le dan un contorno sinuoso, (fot 9).

El aspecto nuclear es el típico de un núcleo compacto, donde, sobre un nucleoplasma poco electrodense, se aprecian condensaciones

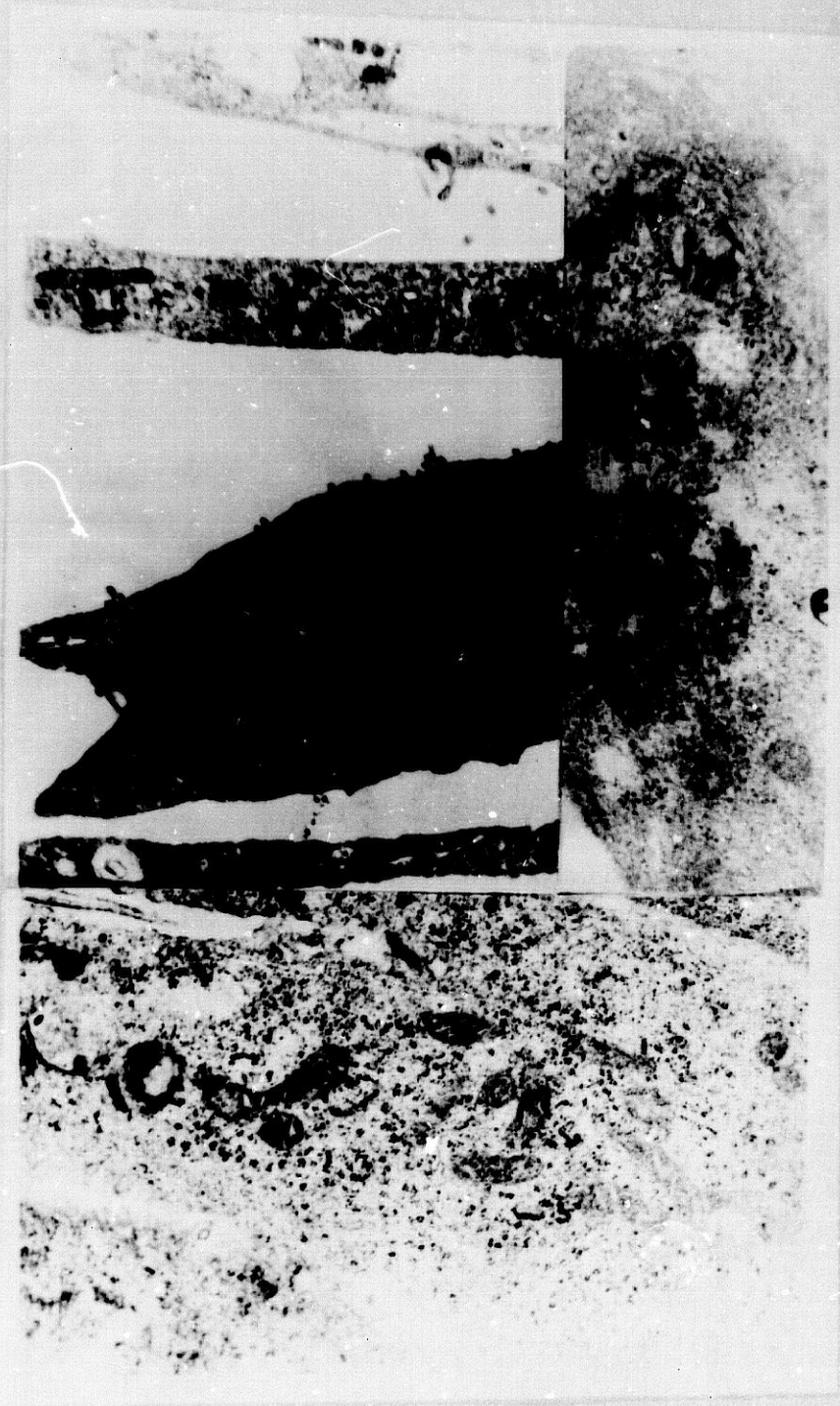
cromatínicas dispersas, muy frecuentemente adosadas a la membrana nuclear interna y libres en el nucleoplasma. Algunos núcleos no muestran nucleolo aparente, ó este no está bien delimitado. En los núcleos que poseen nucleolo este es, generalmente, único.



Microfotografía nº 8.- Estudio de la morfología normal de las células Vero a microscopía óptica. (x 1000). (6, 12 y 24 horas de cultivo)



Microfotografía nº 9.- Estudio de la morfología normal de las células Vero a microscopía electrónica de transmisión (x 8000 ; x 15000). (6, 12 y 24 horas de cultivo).



Microfotografía nº 10.- Estudio de la morfología normal de las células Vero a microscopía electrónica de transmisión (x15000 ; x40000; x25000) (6, 12 y 24 horas de cultivo)

A.) Microscopía óptica células Vero- Acanthamoeba castellanii.

Tras 6 horas de cultivo conjunto, en los cortes semifinos pueden diferenciarse fácilmente las células amebianas de las Vero. Muestran estas últimas una morfología normal, similar a la de los cultivos control, y, también es normal su disposición sobre el substrato. Las amebas aparecen en los espacios intercelulares y destacan por su vacuolización, núcleo vesicular y prolongaciones pseudopodiales. Apparentemente, no se observa un contacto estrecho entre las células amebianas y las Vero, (fot 11).

Tras 12 horas de cultivo conjunto, las alteraciones en los cultivos son más patentes. Las células Vero han perdido su morfología habitual, no presentan ya la forma de huso típica de los cultivos control, las porciones distales han desaparecido y el contorno celular se ha ensanchado, al tiempo que sus márgenes son irregulares, ondulados. Las mayores alteraciones, no obstante, son relativas a la morfología nuclear. Los núcleos aparecen dilatados, con un nucleoplasma claro en el que destacan grandes acúmulos de cromatina en número y disposición variable.

Las amebas, vacuoladas, con extensiones pseudopodiales, aparecen en los espacios intercelulares, sin que pueda apreciarse un estrecho contacto físico con las Vero, (fot 11).

Transcurridas 24 horas de los cultivos conjuntos, siguen permaneciendo las alteraciones celulares, se aprecian células ovales

con núcleos distendidos y fuertes condensaciones cromáticas, y células alargadas con iguales alteraciones nucleares. Los márgenes suelen ser irregulares. No puede apreciarse, sin embargo, un estrecho contacto entre las amebas y las células, (fot 11).

B.) Microscopía electrónica células Vero- Acanthamoeba castellanii.

Al igual que sucede en el estudio a microscopía óptica, las alteraciones celulares van siendo más patentes a medida que transcurre el tiempo de los cultivos de interacción amebas-células.

A las 6 horas de cultivo, las células conservan aún su aspecto fusiforme. Puede apreciarse, al estudiar la membrana plasmática, una clara disminución de las extensiones digitiformes de la membrana que aparecían en los cultivos controles. Hay un aumento general de la vaculización celular, (fot 12), y, es muy notable en la mayoría de las células, la aparición de vesículas lipídicas. Estas vesículas, no envueltas en membrana, alcanzan en algunas células un número y un tamaño considerables. Junto a estas vesículas lipídicas se aprecian pequeñas vesículas de membrana lisa, (fot 12).

Se observa a nivel citoplasmático agrupaciones ribosomales en pequeñas rosetas, (fot 12).

La morfología nuclear es normal. No se aprecian alteraciones mitocondriales.

Las amebas, (fot 12), se disponen en los espacios intercelulares. Pueden apreciarse pequeñas extensiones pseudopodiales claramente ectoplasmáticas que contactan con las superficie de las células adyacentes. El citoplasma amebiano aparece muy vacuolado, si bien no posee materiales celulares fagocitados. Sí se aprecian cadenas pinocíticas en las proximidades de las extensiones citoplasmáticas. Hay vesículas de membrana lisa que pudieran interpretarse como lisosomas primarios.

A las 12 horas las alteraciones celulares son ya muy patentes. La membrana plasmática muestra discontinuidad en algunas regiones celulares, y, como indicábamos antes las proyecciones digitiformes de la membrana son muy escasas en relación con lo observado en las células controles. Son notables las vesículas lipídicas citoplasmáticas no envueltas en membrana, (fot 13), de tamaño considerable y adyacentes. En algunas células se aprecian granales complejos vacuolares con sistemas de membrana y figuras mielínicas ó pseudomielínicas., (fot 13).

El aparato de Golgi muestra una ultraestructura normal, (fot 14), y, dispersas por el citoplasma, aparecen vesículas de membrana lisa.

Las mitocondrias muestran criptas bien definidas, (fot 13), y, al menos aparentemente parece haberse producido una fragmentación mitocondrial, que lleva a acúmulos de mitocondrias en determinadas regiones del citoplasma, donde la mayoría son de tamaño pequeño.

En estas células, la envoltura nuclear aparece dilatada, hin-

chada, con un contorno muy neto, (fot 14), no hay cromatina adosada a la membrana nuclear interna; la electrodensidad del nucleoplasma es menor al de las células normales, y en él se aprecian grandes masas fuertemente electrodensas de material cromático con márgenes bien definidos. También hay zonas difusas de una electrodensidad intermedia, (fot 14).

Transcurridas 24 horas de los cultivos conjuntos, podemos observar alteraciones celulares más profundas y algunas células que han sufrido una lisis, observándose tan sólo restos celulares que pueden apreciarse también fagocitados en vacuolas amebianas. La membrana plasmática permanece con iguales características a las señaladas con anterioridad. No se aprecia una estrecha relación ameba-célula en estos estudios, aunque sí proximidad. Siguen existiendo vesículas lipídicas citoplasmáticas, (fot 15), hay pérdida de la continuidad citoplasmática en algunas células, vacuolas carentes aparentemente de contenido ó con membranas, vacuolas autofágicas con mitocondrias más ó menos degeneradas, asociaciones circulares del R.E.R., y, acúmulos electrodensos citoplasmáticos.

El número de mitocondrias es, en general, elevado. Las criptas se aprecian con claridad. Hay tanto mitocondrias fragmentadas, (fot 16), como mitocondrias de ultraestructura normal, (fot 16), y otras sumamente alargadas con extremos ligeramente ensanchados, que difieren claramente de los observados con anterioridad.

Las amebas próximas a las células muestran muchas vesículas de membrana lisa, algunas de ellas rodeadas por ribosomas.

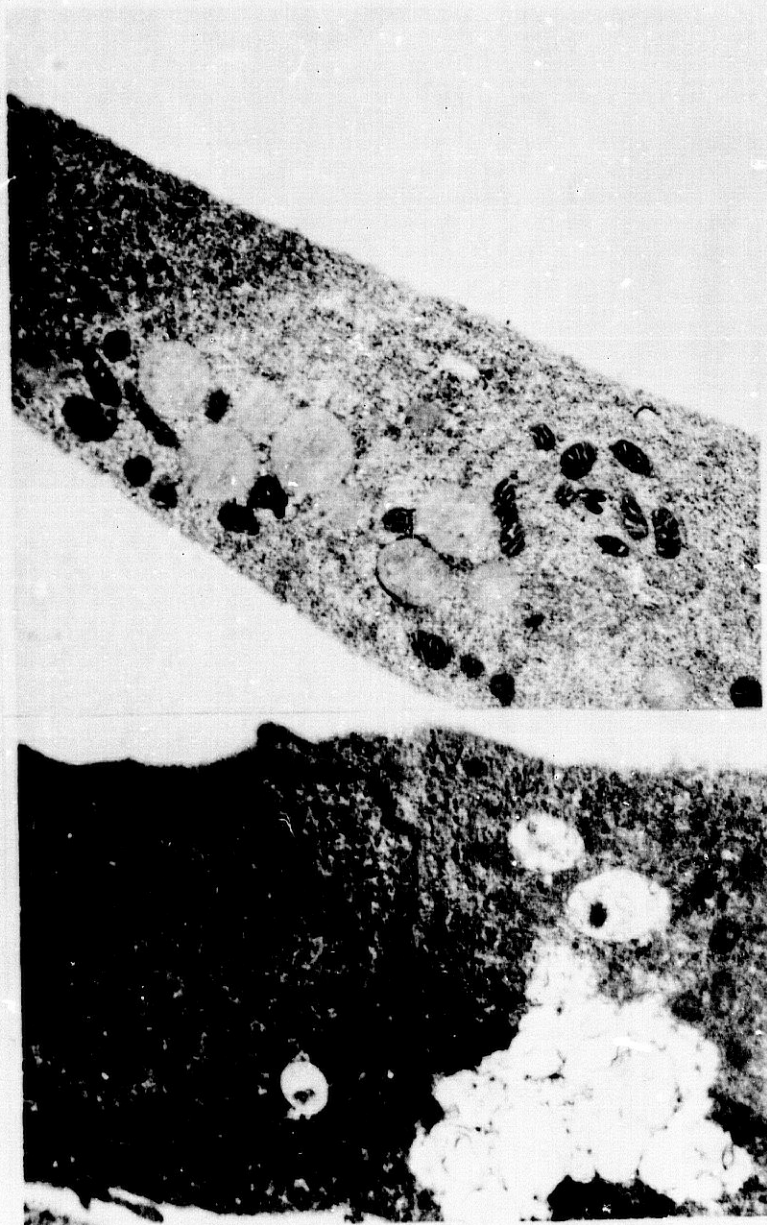
En las células que permanecen a las 24 horas la morfología nuclear, si bien alterada, difiere de la descrita previamente. La envoltura nuclear forma inflexiones muy amplias que dan al contorno un aspecto extraño, apreciándose igualmente secciones transversas, (fot 15). Hay algo de cromatina adherida a la membrana nuclear interna y, en general, una condensación cromática ó nucleolar en el nucleoplasma, de tamaño desigual.



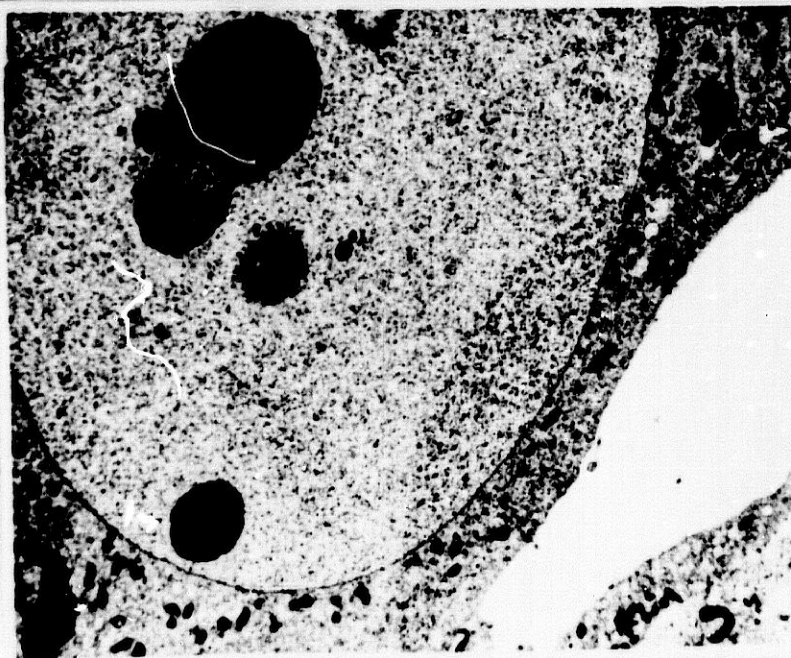
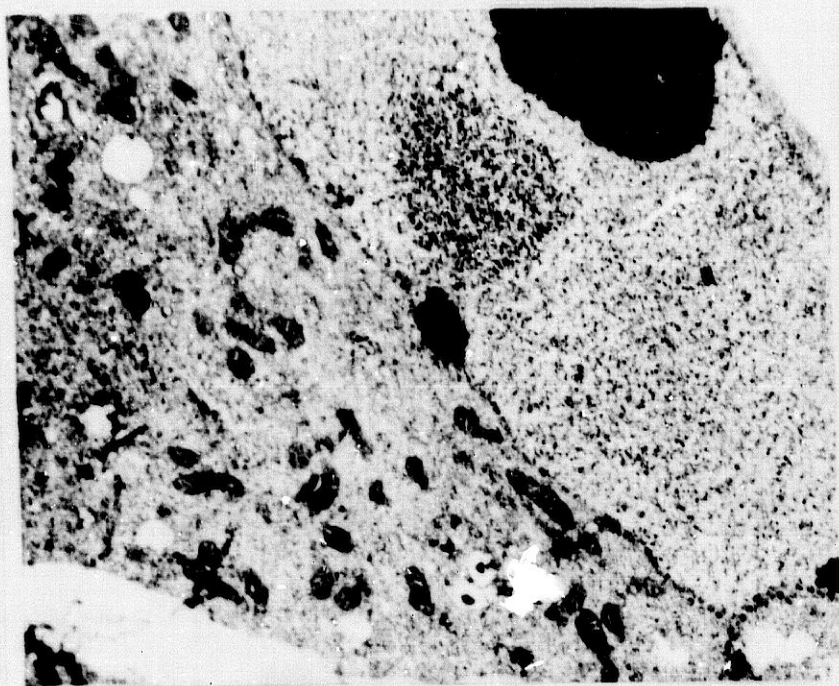
Microfotografía nº11.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. castellanii a microscopía óptica (x 1000) (6, 12 y 24 horas de cultivo)



Microfotografía nº 12.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A.castellanii. (x 15000) (6 horas de cultivo). Microscopía electrónica de transmisión.



Microfotografía nº 13.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. castellanii. (x 15000) (12 horas de cultivo). Microscopía electrónica de transmisión.



Microfotografía nº 14.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. castellanii. (x 15000; x 8000) (12 horas de cultivo). Microscopía electrónica de transmisión.



Microfotografía nº 15.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. castellanii (x 8000) (24 horas de cultivo).
Microscopía electrónica de transmisión.



Microfotografía nº 16.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. castellaanii. (x 15000) (24 horas de cultivo).
Microscopía electrónica de transmisión.

A.) Microscopía óptica células Vero- Acanthamoeba Gr-1.

En los cortes semifinos pueden diferenciarse las amebas de las células Vero con facilidad, tanto a las 6 como a las 12 horas de cultivo.

A las 6 horas se aprecian células alargadas y células mas ó menos ovales ó redondeadas. Las acantamebas aparecen entre las células con bastante proximidad. Los núcleos celulares no aparecen alterados, la mayoría muestran un nucleolo único, (fot 17).

A las 12 horas del cultivo conjunto, las amebas aparecen igualmente en los espacios intercelulares con un estrecho contacto con las células Vero. Los núcleos celulares aparecen normales pero el contorno celular se muestra alterado; las células estan retraídas; su tamaño es menor y los márgenes de algunas de ellas están desflecados, (fot17).

B.) Microscopía electrónica células Vero- Acanthamoeba Gr-1.

A las 6 horas de cultivo conjunto la microscopía electrónica muestra interesantes imágenes. Se evidencia en primer lugar una relación muy estrecha entre células y amebas. Las acantamebas se aproximan a las células y emiten pequeños pseudópodos para establecer contacto, (fot 18); en su citoplasma se observan abundantísimas mitocondrias; cadenas de retículo endoplasmático rugoso y vesículas de membrana lisa que indican una gran actividad lisosomal. El contacto de las prolongaciones pseudopodiales con las células, lleva a inflexiones en el contorno celu-

lar.

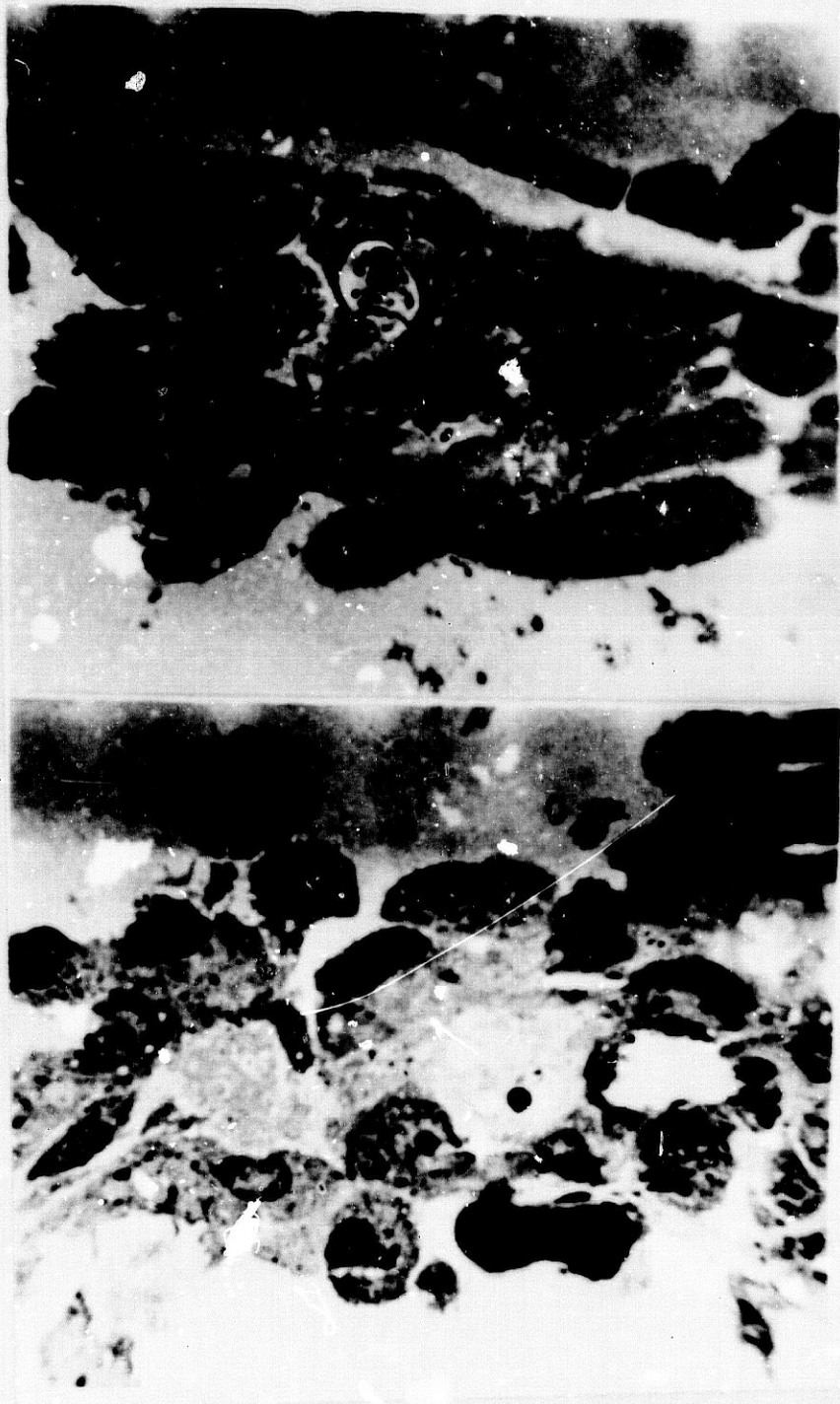
En otros casos, (fot 19), la relación amebas-células es mucho más estrecha, siendo incluso difícil establecer los límites entre ambas. Puede evidenciarse claramente que las amebas están ejerciendo una fagocitosis activa sobre las células, apareciendo vacuolas de mayor ó menor tamaño que contienen restos celulares, y delgadas prolongaciones pseudopodiales amebianas que conectan con una ó varias células a la vez, creando figuras ultraestructurales muy complejas.

La microscopía electrónica de las células Vero muestra alteraciones muy notables. La forma se aleja mucho de la observada en las células control; el contorno es redondeado u oval, no hay proyecciones digitiformes citoplasmáticas. Las mitocondrias son escasas, muy alargadas en sección longitudinal, con criptas poco patentes. Hay zonas citoplasmáticas lacunares, vacías, ó con sáculos de membrana lisa, siendo el resto de los componentes citoplasmáticos muy poco netos. No se aprecian vesículas lipídicas. Los núcleos muestran un contorno, generalmente, irregular, con inflexiones muy profundas, que difiere claramente con lo observado en las células control. La cromatina aparece irregularmente dispuesta, adherida en parte a la membrana nuclear interna.

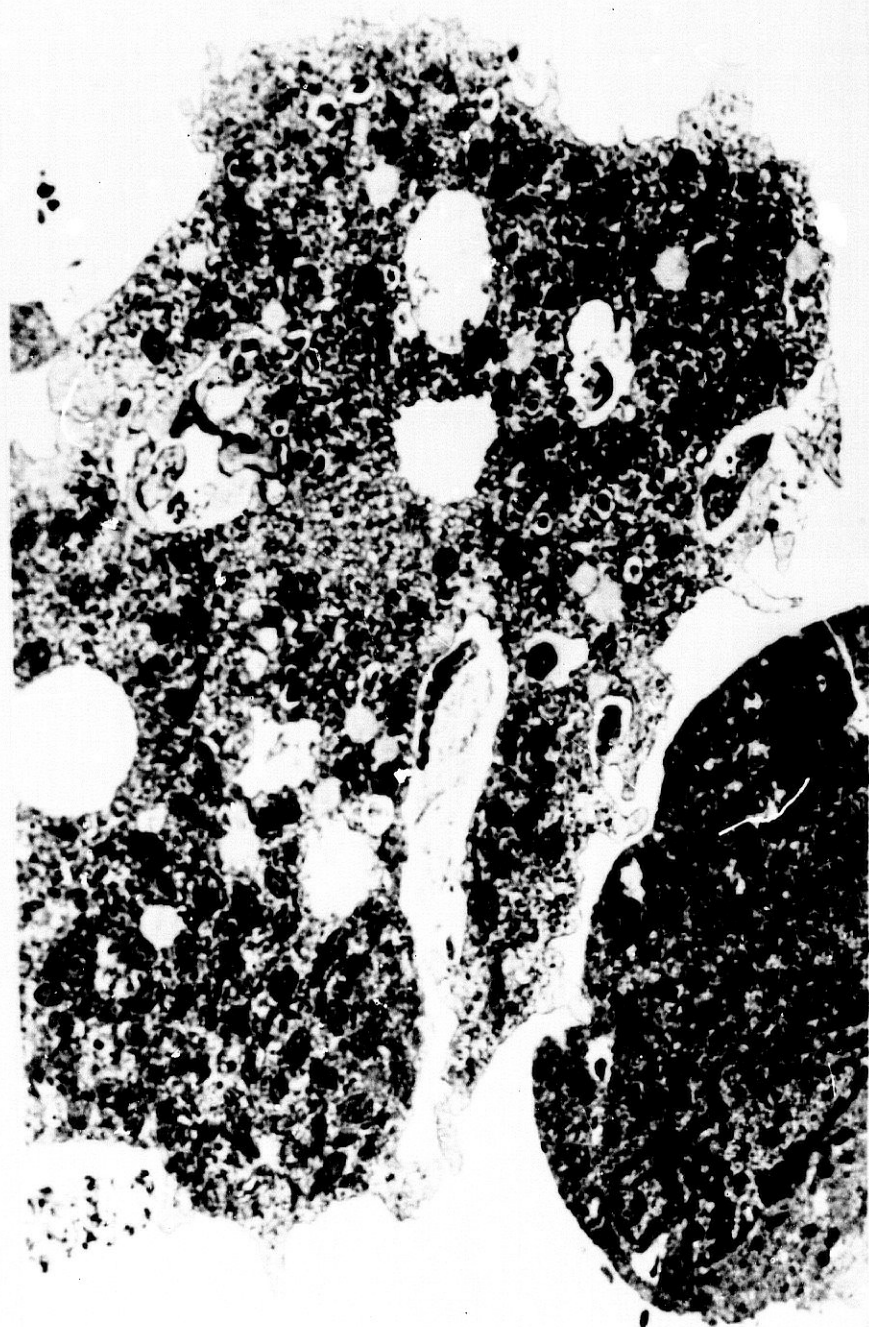
A las 12 horas de cultivo conjunto el proceso de fagocitosis sigue efectuándose y de igual modo la relación células-amebas es muy estrecha. Las amebas muestran extensiones citoplasmáticas de gran tamaño que se dirigen hacia las células y conectan con las membranas celulares " adhiriéndose " a ellas, (fot 20). En el citoplasma amebiano aparecen

vesículas lipídicas y amplias vacuolas con escaso contenido.

Las células muestran un contorno alterado con formas ovales redondeadas, estranguladas ó trapezoides, determinadas por el contacto con amebas ó células próximas. Existen proyecciones citoplasmáticas digitiformes, a veces anastomosadas ó muy próximas entre unas células y otras. Las mitocondrias tienen un contorno longitudinal muy alargado. En el citoplasma se aprecian grandes vesículas lipídicas, zonas con membranas que delimitan pequeños espacios vacíos, y, en algunas células formaciones membranosas en huella digital. La morfología nuclear es similar a la observada a las 6 horas, la envoltura nuclear muestra inflexiones muy profundas que lleva a contornos sinuosos muy extraños, (fot²⁰). La cromatina aparece dispuesta en masas electrodensas próximas a la membrana nuclear, y, en algunos núcleos hay un nucleolo patente.



Microfotografía nº 17.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. Gr-1 a microscopía óptica. (x1000) (6 y 12 horas de cultivo).



Microfotografía nº 18.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. Gr-1 a microscopía electrónica de transmisión. (x 10000) (6 horas de cultivo).



Microfotografía nº 19.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. Gr-1 a microscopía electrónica de transmisión. (x 15000) (6 horas de cultivo).



Microfotografía nº 20.- Estudio de la morfología de las células Vero
invuadas con A. Gr-1 a microscopía electrónica de transmisión (x 8000)
(12 horas de cultivo).

A.) Microscopía óptica células Vero- Acanthamoeba lugdunensis
(cepa SH₅₆₅).

A las 6 horas de cultivo pueden diferenciarse con claridad las células amebianas de las Vero. Aparecen aquellas, en los espacios intercelulares sin que se aprecie una estrecha relación amebas-células. Las Vero muestran morfología variada; hay células alargadas; fusiformes con extremos puntiagudos y otras más retraídas con extremos ovales ó romos. Los núcleos aparecen igualmente diversos, con cromatina dispersa, con condensaciones y algunos con nucleolo único, (fot 21).

A las 12 horas de cultivo la proporción de células retraídas es mayor, al tiempo que se aprecian menos células fusiformes y el número de amebas se ha incrementado. No se aprecia tampoco una relación íntima entre ambas y células Vero. Los núcleos de las células Vero muestran un contorno sinuoso con inflexiones profundas en la envoltura nuclear, cromatina dispersa ó un solo nucleolo más ó menos céntrico. Las amebas muestran un citoplasma profusamente vacuolado y numerosas proyecciones pseudopodiales, (fot 21).

B.) Microscopía electrónica células Vero- Acanthamoeba lugdunensis (cepa SH₅₆₅).

A las 6 horas del cultivo conjunto las observaciones concuerdan con lo observado a microscopía óptica. Las amebas aparecen próximas a las células y muestran una intensa actividad fagocítica; su superficie tiene abundantes prolongaciones pseudopodiales de pequeño tama-

ño que contactan con la membrana de las células Vero. El citoplasma amebiano aparece muy rico en vacuolas, la mayoría de ellas con material fagocitado muy electrodensó y presumiblemente de origen celular (Vero). Igualmente se aprecian numerosas cadenas de retículo endoplasmático rugoso. En la fotografía **22**, se aprecia una gran vacuola en un citoplasma amebiano que contiene material fagocitado, y una compleja figura mielínica con membranas estrechamente adosadas.

Las células Vero muestran una membrana plasmática inalterada, de la que parten pequeñas proyecciones que se sitúan entre membranas plasmáticas adyacentes, y no en otras superficies celulares. En algunas células el citoplasma muestra zonas de discontinuidad con espacios lacunares vacíos no limitados por membranas. No se aprecian vesículas lipídicas.

Las mitocondrias son abundantes, las criptas se observan con claridad y su forma, en sección longitudinal, es alargada u oval.

A las 12 horas de cultivo conjunto se evidencia una relación muy estrecha de las amebas con las células Vero. Las amebas aparecen de gran tamaño y ejerciendo una fagocitosis activa. Pueden apreciarse proyecciones pseudopodiales que se dirigen hacia las células ó a los restos de ellas, pues se aprecian restos celulares aislados desprovistos de membrana celular, que, al parecer, van siendo fagocitadas e incluidas en vacuolas fagocíticas, (fot **23**). Las vacuolas contienen material de distinta electrodensidad y no identificable si bien parece ser tanto citoplasmático como cromatínico, algunas incluyen pequeñas figuras mielínicas

poco complejas. El citoplasma amebiano muestra abundantes mitocondrias, ribosomas libres, cadenas de retículo rugoso y vesículas de membrana lisa que demuestran una intensa actividad, así como vesículas lipídicas.

Aquellas células Vero que permanecen intactas, aparecen fuertemente alteradas. El contorno es sumamente irregular con prolongaciones de pequeño ó mediano tamaño que en ocasiones se bifurcan, con excavaciones profundas en las que se incluyen digitaciones. El citoplasma celular aparece rico en formaciones microtubulares en ocasiones de gran longitud ó muy próximas. Se parecían numerosas vesículas lipídicas de gran tamaño, algunas envueltas en membranas ó formaciones rígidas.

Se parecían también figuras mielínicas dispersas y asociaciones de vesícula de membrana lisa. Las mitocondrias aparecen con contornos poco netos, muchas son ovales, otras de gran longitud; impresiones en huella digital.

Los núcleos de las células muestran morfología muy diversa, siendo general la existencia de grandes inflexiones en la envoltura nuclear. En algunos núcleos el contorno es impreciso, otros aparecen deformados por la presión inducida en ellos por pseudópodos amebianos contiguos, (fot 24).



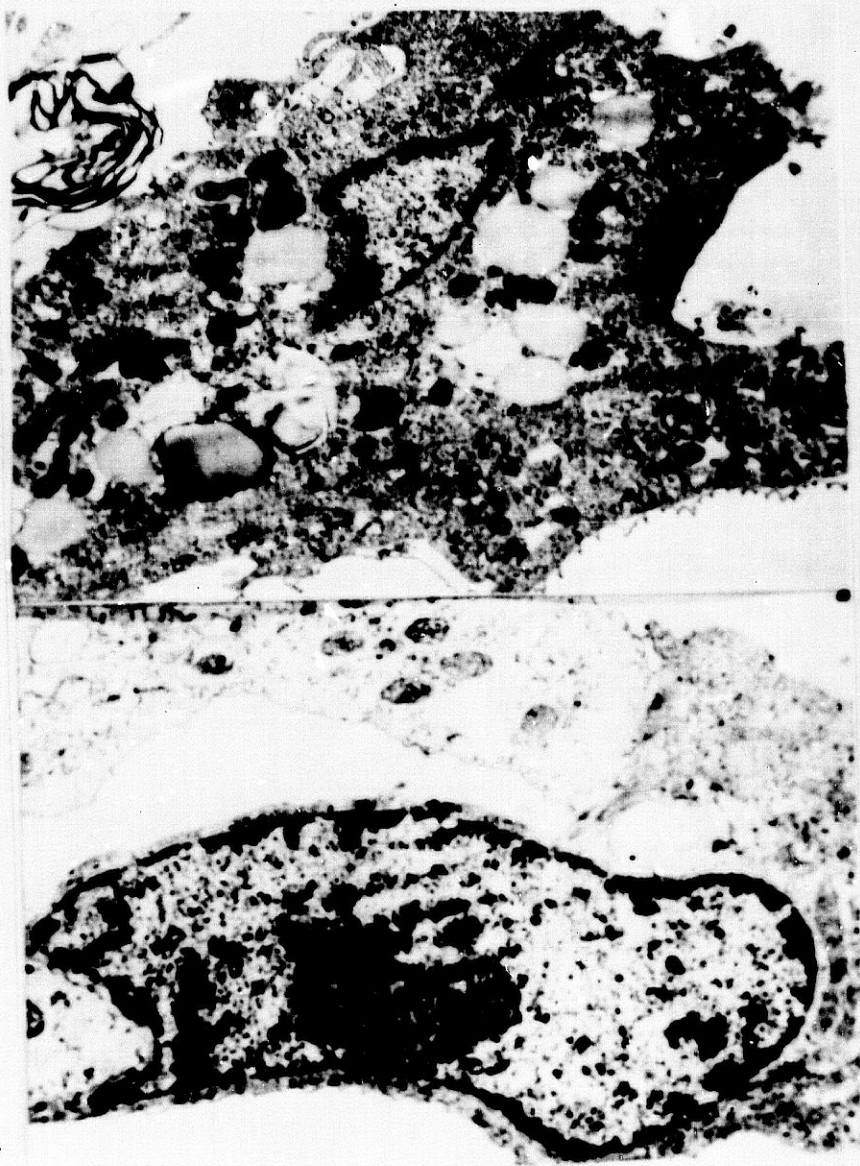
Microfotografía nº 21.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. lugdunensis (SH₅₆₅) a microscopía óptica (x 1000) (6 y 12 horas de cultivo).



Microfotografía nº 22.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. lugdunensis (SH₅₆₅) a microscopía electrónica de transmisión (x 15000) (6 horas de cultivo).



Microfotografía nº 23.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A. lugdunensis (SH₅₆₅) a microscopía electrónica de transmisión (x 15000) (12 horas de cultivo).



Microfotografía nº 24.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A.lugdunensis (SH₅₆₅) a microscopía electrónica de transmisión (x 15000) (12 horas de cultivo).

A.) Microscopía óptica células Vero- Acanthamoeba griffini
(cepa S₇).

A las 6 horas del cultivo conjunto, ambas poblaciones celulares son perfectamente diferenciables al microscopio óptico. Las células Vero aparecen alargadas con la región central ensanchada y núcleo normal, generalmente con nucleolo único. Las amebas se observan contiguas a las células y con citoplasma vacuolado, (fot 25).

Con el transcurrir del tiempo, (a las 12 horas), la morfología celular se altera, algunas células se han retraído ó redondeado, aparece granulación citoplasmática y algunos núcleos muestran grandes manchas de cromatina adosadas a la membrana. Las amebas, próximas a las células, tienen proyecciones pseudopodiales y un citoplasma profusamente vacuolado, (fot 25). La vacuolización amebina se hace mas intensa a las 24 horas, y el contacto con las células menos patente, al tiempo que las células Vero aparecen muy alargadas, algunas aparentemente multinucleadas, y con grandes condensaciones cromáticas adosadas a la membrana nuclear, (fot 25).

B.) Microscopía electrónica células Vero- Acanthamoeba griffini
(cepa S₇).

A las 6 horas de cultivo conjunto, si bien las células Vero muestran una morfología nuclear normal, en su membrana y citoplasma se aprecian alteraciones.

Hay una reducción de las prolongaciones digitiformes de la membrana plasmática, que es especialmente notable en las zonas próximas a las amebas. En algunas regiones celulares el contorno celular es difuso, no apreciándose la membrana. El citoplasma celular muestra zonas discontinuas no rodeadas de membrana. Hay vacuolas autofágicas con contenido diverso, y vacuolas que incluyen figuras de membrana. No se aprecian inclusiones lipídicas. Las mitocondrias son poco electrodensas, con margenes poco definidos, algunas redondeadas, otras alargadas de mayor tamaño. El citoplasma de algunas células es muy rico en lisosomas y vesículas de membrana lisa. En la mayoría de las células se puede observar la presencia de microtúbulos citoplasmáticos.

Las amebas aparecen próximas a las células y las fotografías indican una relación muy estrecha en algunas zonas, con emisión de pseudópodos que contactan con la membrana de las células Vero a la que se aplican estrechamente, (fot 26). La superficie amebiana es irregular, con una gran actividad en la emisión tanto de pequeñas prolongaciones como de grandes pseudópodos ectoplasmáticos que se dirigen hacia las células. Excluyendo las vacuolas pulsátiles, el citoplasma es pobre en vacuolas y las que aparecen son de pequeño tamaño y sin material fagocitado.

A las 12 horas, las células Vero siguen mostrando las alteraciones ya observadas anteriormente. A nivel de membrana hay escasas prolongaciones que no llegan a ser digitaciones, y que no existen en la proximidad de las membranas amebianas. El citoplasma continúa con espacios lacunares vacíos y mitocondrias de pequeño tamaño. Hay estrangulaciones

del citoplasma celular a ciertos niveles, y pudiera pensarse en una elongación del citoplasma. Igualmente la superficie celular muestra estran-tes y salientes bastante patentes. No se observan inclusiones lipídicas. El contorno celular es irregular, con inflexiones amplias. La cromatina aparece dispersa en algunas células, en otras existe un nucleolo único.

Las amebas continúan próximas a las células, emitiendo pseudópodos que contactan con la membrana de las células Vero y se aplican a ella, así como pequeños pseudópodos cuya sección puede verse en las fotografías, (fot 27).

Transcurridas 24 horas de cultivo, las células Vero aparecen con alteraciones notables. Se muestran muy alargadas, algunas multinucleadas con porciones estrechas que se estrangulan a ciertos niveles. La membrana nuclear aparece poco neta en algunas zonas. Hay escasas prolongaciones digitiformes que, en este caso, parecen dirigirse a la superficie celular, a la amebiana y de una a otra célula. El citoplasma celular muestra zonas discontinuas no vacuolares. Las escasas vacuolas existentes no muestran contenido, no hay vacuolas autofágicas y muy escasas inclusiones lipídicas. Las mitocondrias son numerosas, electrodensas y de tamaño variable.

Las amebas aparecen en los espacios intercelulares, próximas a las células, con activa emisión de pseudópodos e intensa actividad citoplasmática. Cada trofozoito muestra dos ó tres grandes vacuolas que no incluyen material celular fagocitado, aunque sí figuras de membrana, (fot 28).



Microfotografía nº 25.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A.griffini (S_7) a microscopía óptica (x 1000) (6, 12 y 24 horas de cultivo).



Microfotografía nº 26.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A.griffini (S₇) a microscopía electrónica de transmisión (x 15000) (6 horas de cultivo).



Microfotografía nº 27.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con A.griffini (S_7) a microscopía electrónica de transmisión (x 8000) (12 horas de cultivo).



Microfotografía nº 28.- Estudio de la morfología de las células Vero
infectadas con A.griffini (S₇) a microscopía electrónica de transmisión
(x 15000) (24 horas de cultivo).

A.) Microscopía óptica células Vero- Naegleria fowleri
(cepa 76/14/S₃).

Tras 6 horas de cultivo conjunto, las amebas se observan entre las células Vero sin que se aprecien alteraciones morfológicas. en ninguna de las dos poblaciones al microscopio óptico, (fot29). A las 12 horas la población amebiana se ha incrementado notablemente, siendo su número muy superior al de células. Las amebas aparecen muy vacuoladas y algunas de gran tamaño. La mayoría de las células Vero conservan su forma alargada y los núcleos tienen un aspecto normal, sin alteraciones, (fot29). A las 24 horas de cultivo existe ya una cierta proporción de células morfológicamente diferentes a las iniciales, algunas han perdido su forma alargada y aparecen ovales, al tiempo que su contorno nuclear presenta notables inflexiones, otras están degeneradas con los bordes difusos y pérdida de citoplasma. En este tiempo, como en los anteriores, no se aprecia un contacto patente entre las células amebianas y las Vero, aunque sí una evidente contigüidad, (fot29).

B.) Microscopía electrónica células Vero- Naegleria fowleri
(cepa 76/14/S₃).

Las células Vero a las 6 horas de cultivo conjunto aparecen alargadas, con extremos puntiagudos y núcleo central. La membrana aparece inalterada con escasas digitaciones, el citoplasma muy rico en microtúbulos, gran cantidad de mitocondrias de pequeño tamaño y algunas vacuolas sin contenido y relativamente grandes. Algunas células poseen

acúmulos lipídicos y vacuolas autofágicas, así como un número elevado de pequeñas vacuolas. Algunos acúmulos citoplasmáticos, fuertemente electrodensos, pueden ser interpretados como vacuolas autofágicas.

Las amebas aparecen progresando entre las células por la emisión de pseudópodos, sin que se parezca un contacto entre la membrana celular y la amebiana, aunque sí parece existir en aquellas una activa fagocitosis que se evidencia por la existencia de grandes vacuolas, algunas con figuras mielínicas. Las inclusiones lipídicas se aprecian también en el citoplasma amebiano, (fot30).

A las 12 horas del cultivo conjunto, las células muestran notables alteraciones. La membrana plasmática ha perdido continuidad en algunas células y, en aquellas que permanece casi normal, no se aprecian apenas prolongaciones digitiformes de la membrana. La forma de las células sigue siendo alargada, con núcleo en posición central. En el citoplasma celular aparecen vesículas lipídicas aunque no en número elevado, se aprecian también grandes espacios vacuolares vacíos, con ó sin membrana limitante neta. Se aprecian vacuolas autofágicas, y algunas con pequeñas vesículas formadas de membranas. En algunas células existen complejos membranosos electrodensos. El número de mitocondrias es muy elevado, algunas de ellas de gran longitud; las criptas aparecen laxas, separadas, (fot31), lo que lleva a una menor electrodensidad mitocondrial en estas células.

Los núcleos muestran ó no, un nucleolo, y algunos tienen

contorno sinuoso con inflexiones, aunque su ultraestructura es normal.

Las amebas aparecen progresando entre las células, la mayoría tienen un gran tamaño y muestran una intensa actividad. A nivel de la membrana amebiana se forman largas cadenas pinocíticas, que denotan una activa ingestión de nutrientes. La adhesión de la membrana amebiana a la de las células contiguas es muy estrecha no apareciendo, en algunas zonas, una delimitación clara entre una y otra. El citoplasma amebiano aparece muy rico en ribosomas tanto libres como asociados a vesículas de membrana; se aprecian igualmente vesículas lipídicas y grandes vacuolas. El contenido vacuolar es muy diverso, hay figuras mielínicas, acúmulos electrodensos, lípidos y materiales amorfos, (fot 32).

A las 24 horas la mayoría de las células Vero han perdido su morfología normal, los contornos son difusos, y muestran numerosas prolongaciones filiformes, que en algunos casos se arborizan.

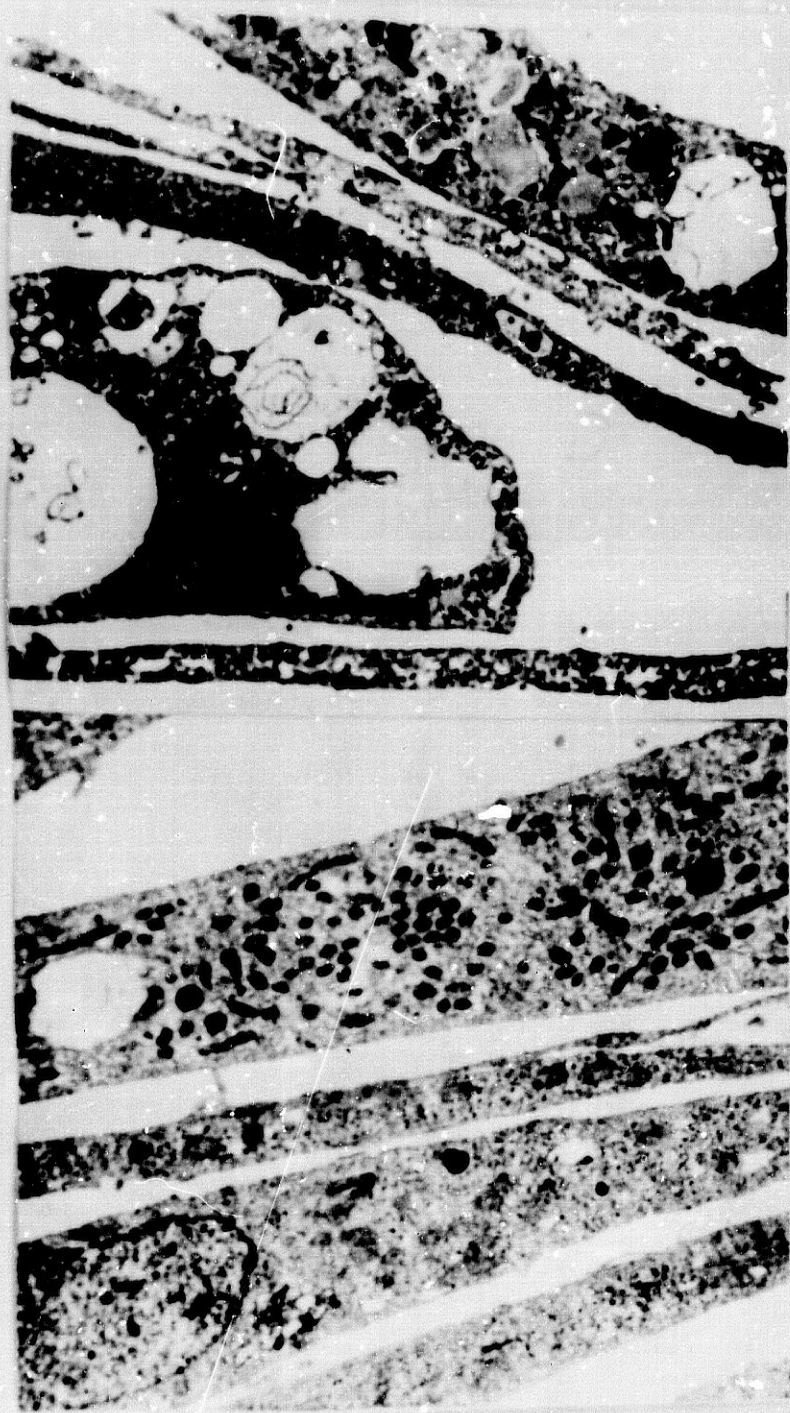
Los citoplasmas aparecen vacuolados, ricos en microtúbulos y con escasas mitocondrias. No se aprecian vesículas lipídicas, sí figuras mielínicas intracitoplasmáticas, algunas muy compactas, (fot 33). Los microtúbulos citoplasmáticos son largos, numerosos, y se observan con gran claridad, (fot 34).

En aquellas células en las que se aprecia el núcleo, este aparece distendido, con grandes inflexiones en la envoltura nuclear y sin acúmulos cromatínicos nucleoplasmáticos, (fot 34).

Las amebas aparecen entre las células, progresando en los espacios intercelulares gracias a su movimiento pseudopodial, y mostrando una gran actividad. La proximidad de las amebas a las Vero sigue siendo muy acusada, y hay una gran actividad con pseudópodos de diferente tamaño en varias direcciones. Los citoplasmas amebianos tienen vesículas lipídicas y numerosas vacuolas de diferente tamaño con diverso contenido, aunque no puede demostrarse una acción fagocítica directa sobre las células intactas, (fot 33).



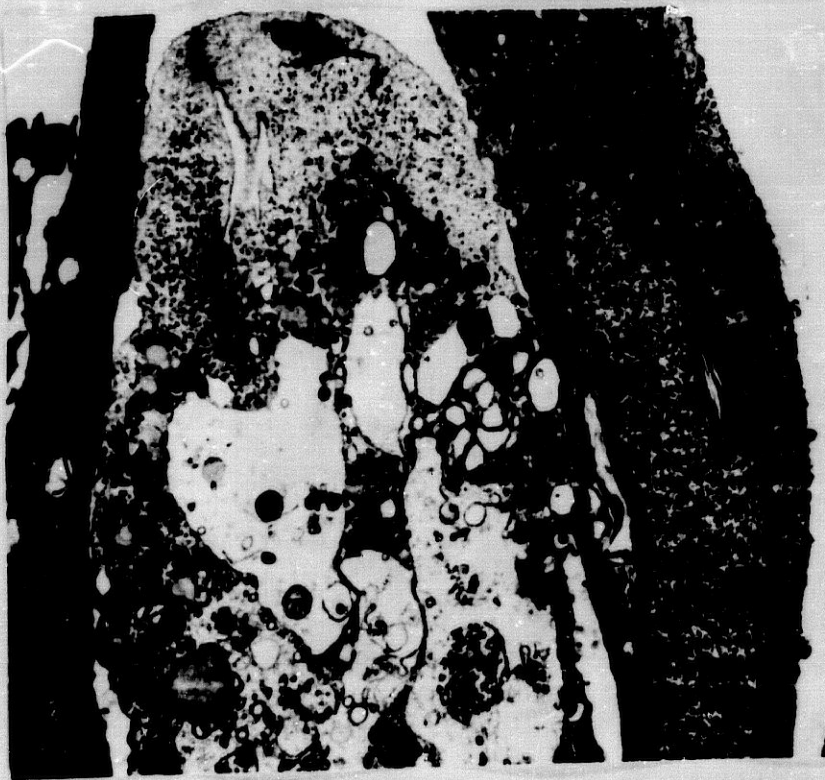
Microfotografía nº 29.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con N. fowleri (76/14/S₃) a microscopía óptica (x 1000) (6, 12 y 24 horas de cultivo).



Microfotografía nº 30.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con N.fowleri (76/14/S₃) a microscopía electrónica de transmisión (x10000, x 15000) (6 horas de cultivo).



Microfotografía nº 31.- Estudio de lamorfología de las células Vero incubadas con N.fowleri (76/14/S₃) a microscopía electrónica de transmisión (x 15000) (12 horas de cultivo).



Microfotografía nº 32.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con N.fowleri (76/14/S₃) a microscopía electrónica de transmisión (x 10000) (12 horas de cultivo).



Microfotografía nº 33.- Estudio de la morfología de las células Vero incubadas con N.fowleri (76/14/S₃) a microscopía electrónica de transmisión (x 15000) (24 horas de cultivo).



Microfotografía nº 34.- Estudio de lamorfología de las células Vero incubadas con N.fowleri (76/14/S₃) a microscopía electrónica detransmisión (x 15000) (24 horas de cultivo).

4.5.- SOBRE LAS ALTERACIONES BIOQUIMICAS OBSERVADAS EN LOS CULTIVOS CONJUNTOS CELULAS VERO-AMEBAS.

Las pruebas bioquímicas efectuadas, se han realizado con el fin de caracterizar los lotes controles, y analizar las posibles modificaciones surgidas en los cultivos conjuntos.

A).- Proteínas totales.

Los resultados obtenidos en los diferentes lotes controles y cultivos conjuntos de células Vero-amebas, en cuanto al contenido protéico están reflejados en la tabla nº 1.

De estos valores se desprende que existe una diferencia notable en cuanto al contenido protéico de los tres lotes controles. Las células Vero poseen mayor cantidad de proteínas que los lotes amebianos.

Comparando el lote de células Vero control con aquellas que han sido incubadas con las amebas, no se observa una gran diferencia entre ellos. Sin embargo, sí es digno de mención el cambio experimentado por las amebas control y las que han sido incubadas con células Vero. En el caso de la especie N. fowleri (S₃) se aprecia un aumento de casi el doble en contenido protéico, caso similar al que ocurre con la otra especie amebiana A. griffini (S₇).

TABLA Nº 1. CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES EN LOS DIFERENTES LOTES DE CULTIVO AMEBAS-CELULAS VERO
A LAS 6 HORAS DE CULTIVO.

<u>Lotes</u>	<u>Proteinas (mg/ml)</u>	<u>mg proteinas/10⁶ células</u>
Células Vero control	1.046 \pm 0.03	0.21 \pm 0.01
Células Vero incubadas con amebas S ₃	1.02 \pm 0.04	0.25 \pm 0.01*
Células Vero incubadas con amebas S ₇	0.88 \pm 0.02	0.27 \pm 0.008**
Amebas S ₃ controles	0.60 \pm 0.03	0.09 \pm 0.006
Amebas S ₃ incubadas con células Vero	0.58 \pm 0.01	0.18 \pm 0.004**
Amebas S ₇ controles	0.35 \pm 0.01	0.11 \pm 0.005
Amebas S ₇ incubadas con células Vero	0.89 \pm 0.03	0.16 \pm 0.007**

Grado de significación estadística * p \leq 0.02

** p \leq 0.001

Amebas S₃ = Naegleria fowleri (76/14/S₃)

Amebas S₇ = Acanthamoeba griffini (S₇)

B).- Niveles de colesterol.

Los resultados obtenidos referentes al contenido de colesterol estan reflejados en la tabla nº 2.

Comparando la cantidad de colesterol por millón de células de lotes controles, tanto de células Vero como de amebas, se observa que el mayor contenido en colesterol lo poseen las células Vero. Las amebas presentan niveles inferiores siendo los valores correspondientes a la S_7 mucho menores.

Las células Vero incubadas tanto en presencia de S_3 como de S_7 no sufren alteraciones significativas en su contenido en colesterol. Sin embargo, trás este mismo tratamiento ambas especies amebianas muestran un claro incremento en los niveles de colesterol siendo cuantitativamente superior el valor alcanzado en las amebas S_7 .

TABLA Nº 2. NIVELES DE COLESTEROL EN LOS DIFERENTES LOTES DE CULTIVO AMEBAS-CÉLULAS VERO A LAS 6 HORAS DE CULTIVO.

<u>Lotes</u>	<u>µg colesterol/ mg proteína</u>	<u>µg colesterol/10⁶ células</u>
Células Vero control	54.90 [±] 0.55	11.5 [±] 0.29
Células Vero incubadas con amebas S ₃	50.10 [±] 0.54	12.5 [±] 0.34
Células Vero incubadas con amebas S ₇	44.19 [±] 0.40	11.9 [±] 0.19
Amebas S ₃ control	48.20 [±] 0.42	4.3 [±] 0.03
Amebas S ₃ incubadas con células Vero	30.96 [±] 0.40	5.5 [±] 0.03*
Amebas S ₇ control	12.30 [±] 0.13	1.3 [±] 0.01
Amebas S ₇ incubadas con células Vero	38.24 [±] 0.30	6.1 [±] 0.03**

Grado de significación estadística *p ≤ 0.05

**p ≤ 0.001

Amebas S₃ = Naegleria fowleri (76/14/S₃)

Amebas S₇ = Acanthamoeba griffini (S₇)

C).- Contenido en fósforo lipídico.

Los resultados obtenidos en relación con el contenido en fósforo lipídico se muestran en la tabla nº 3.

Como se puede observar los lotes controles de células Vero y amebas poseen un contenido en fosfolípidos totales muy diferente, siendo las células Vero las que poseen un mayor valor. Por otra parte, los niveles en ambas especies amebianas son semejantes.

Comparando los lotes de células Vero controles con los incubados con amebas no se observan diferencias significativas. Sin embargo, ambas especies de amebas sí que muestran un claro incremento en el contenido en fosfolípidos después de la incubación, siendo este especialmente importante en la especie S₃.

TABLA Nº 3. NIVELES DE FOSFORO LIPIDICO EN LOS DIFERENTES LOTES DE CULTIVO AMEBAS-CELULAS VERO A LAS 6 HORAS DE CULTIVO.

<u>Lotes</u>	<u>ug fósforo lipídico/mg proteína</u>	<u>ug fósforo lipídico/10⁶ células</u>
Células Vero controles	9.57 [±] 0.1	2.0 [±] 0.7
Células Vero incubadas con amebas S ₃	7.28 [±] 0.1	1.8 [±] 0.6
Células Vero incubadas con amebas S ₇	7.17 [±] 0.1	1.9 [±] 0.7
Amebas S ₃ control	1.97 [±] 0.08	0.17 [±] 0.03
Amebas S ₃ incubadas con células Vero	2.24 [±] 0.06	0.4 [±] 0.04 ^{***}
Amebas S ₇ control	2.76 [±] 0.06	0.3 [±] 0.03
Amebas S ₇ incubadas con células Vero	2.74 [±] 0.06	0.4 [±] 0.021 [*]

Grado de significación estadística *p ≤ 0.03
 **p ≤ 0.04

Amebas S₃ = Naegleria folwieri (76/14/S₃)
 Amebas S₇ = Acanthamoeba griffini (S₇)

D).- Estudio de la composición en ácidos grasos de lípidos totales.

Las tablas nº 4 y 5 muestran la composición en ácidos grasos de lípidos totales en los diferentes lotes de células utilizadas, así como las principales relaciones de interés bioquímico que pueden establecerse entre ellos.

Como se puede observar existen diferencias en cuanto a la composición en algunos ácidos grasos de células Vero con respecto a las dos especies de amebas ensayadas. Las células Vero se caracterizan por la presencia de ácido linoléico, ausente en amebas. Por otra parte el ácido palmitoléico aparece tan solo en un elevado porcentaje en la especie amebiana S₃. En consecuencia, las diferentes relaciones establecidas entre ellos muestran valores característicos para cada tipo de células utilizadas.

La incubación conjunta de células Vero- amebas no modificó prácticamente la composición en ácidos grasos de las primeras, mientras que sí se produjeron alteraciones cuantitativamente diferentes y de distinto signo en las especies amebianas.

TABLA Nº 4. CONTENIDO PORCENTUAL DE ACIDOS GRASOS EN LOS DIFERENTES LOTES DE CULTIVO AMEBAS-CELULAS VERO
A LAS 6 HORAS DE CULTIVO.

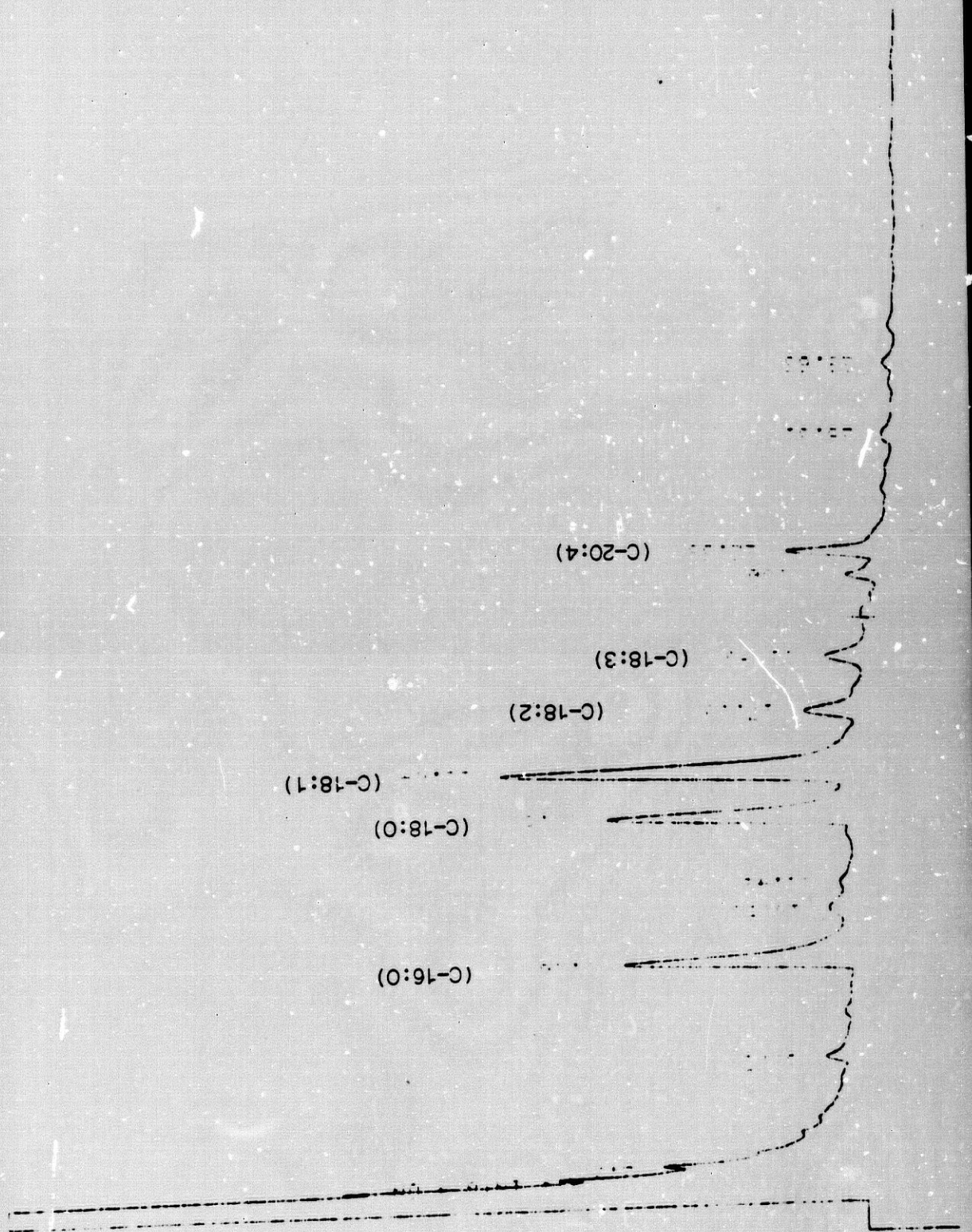
Lotes	ácidos grasos						
	16:0	16:1	18:0	18:1	20:4		
C.Vero control	18±1.03		22.08±0.4	38.2±0.004	7.97±0.09	7.05±1.4	6.64±0.2
C.Vero incubadas con S ₃	19.02±1.02		23.5±1.1	38.5±0.7	7.38±0.9	6.27±2.3	5.82±1.6
C.Vero incubadas con S ₇	20.3±1.3		22.18±1.4	38.2±1.6	6.43±0.2	5.86±0.5	5.88±0.4
Amebas S ₃ control	11.67±1.2	16.45±1.3	11.02±1.4	48.5±1.4	10.47±0.7		1.6±0.1
Amebas S ₃ incubadas con C.Vero	15.1±0.004	15.2±0.23	15.14±1.04	42.7±1.5	7.94±2.06		3.7±0.3 ^{***}
Amebas S ₇ control	22.9±0.7		17.8±0.9	45.6±0.8	9.7±0.5		3.6±1.87
Amebas S ₇ incubadas con C.Vero	12.59±2.3		17.5±0.8	43.9±1.4	16.1±0.6 ^{**}		9.6±1.7

Amebas S₃ = Naegleria fowleri (76/14/S₃)

Amebas S₇ = Acanthamoeba griffini

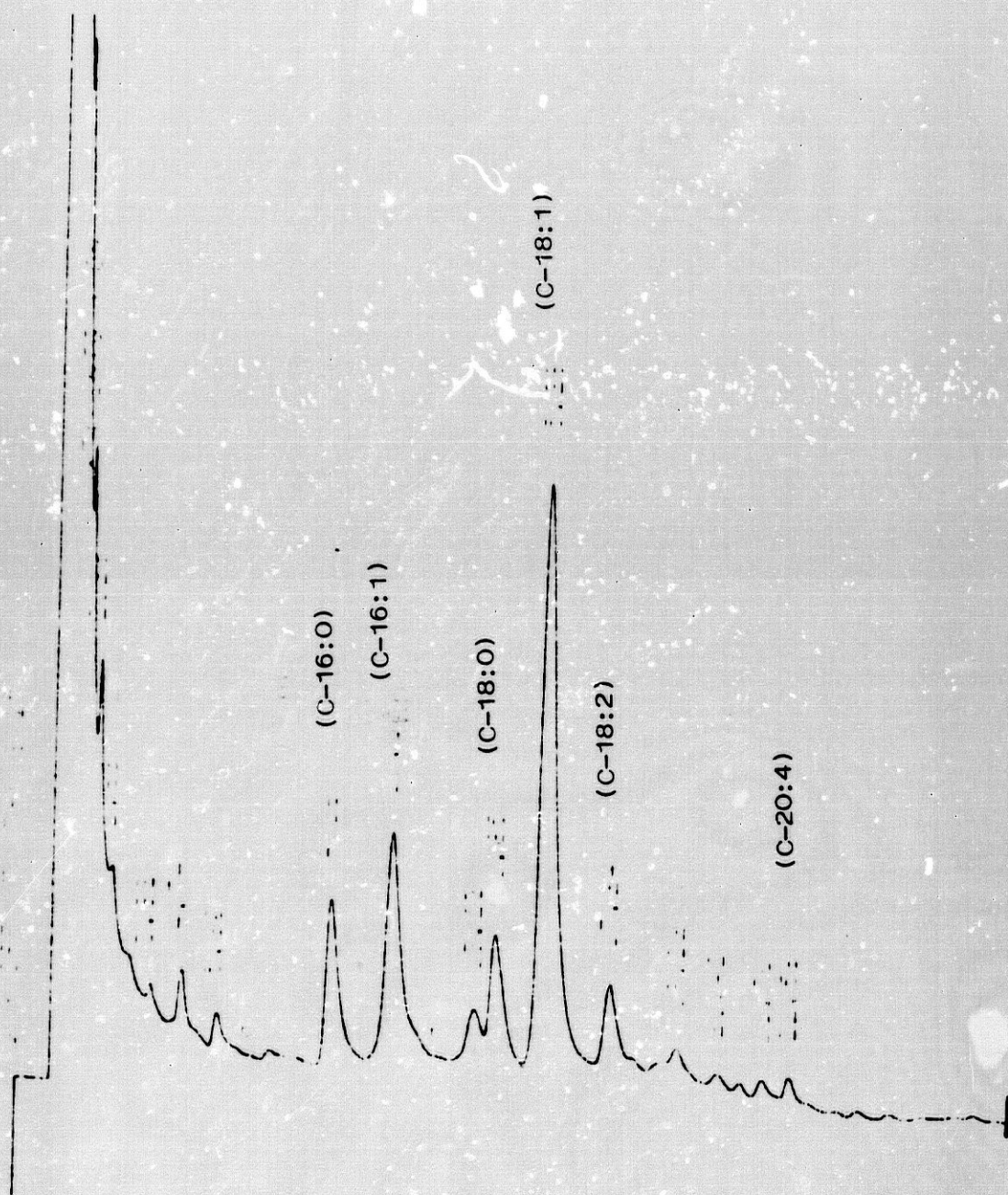
Grado de significación estadística * p ≤ 0.005

** p ≤ 0.001

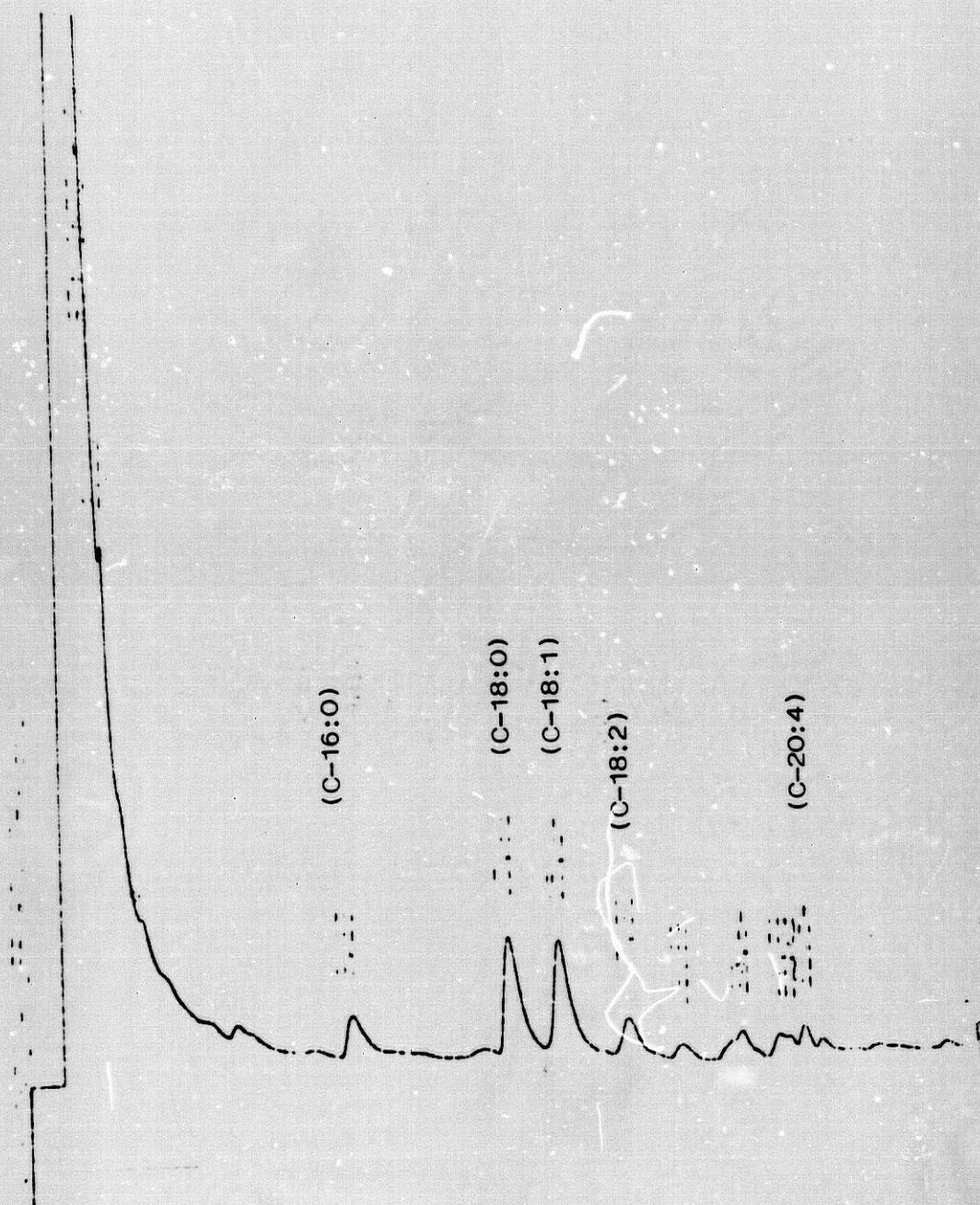


Cromatograma 1.

Contenido en ácidos grasos de lípidos totales de las células Vero control



Cromatograma 2.
Contenido en ácidos grasos de lípidos totales de las amebas S_3 control



Cromatograma 3.

Contenido en ácidos grasos de lípidos totales de las amebas S_7 controles

TABLA Nº 5. RELACIONES DE INTERES BIOQUIMICO ENTRE ACIDOS GRASOS DE LOS DIFERENTES LOTES DE CULTIVO AMEBAS-
 CELULAS VERO A LAS 6 HORAS DE CULTIVO.

<u>Lotes</u>	<u>Insaturados/saturados</u>	<u>18:1/18:0</u>	<u>20:4/18:2</u>
Células Vero control	1.49	1.7	0.83
Células Vero incubadas con amebas S ₃	1.36	1.0	0.78
Células Vero incubadas con amebas S ₇	1.35	1.7	0.91
Amebas S ₃ control	3.39	4.4	0.15
Amebas S ₃ incubadas con células Vero	2.29	2.8	0.46
Amebas S ₇ control	1.44	2.5	0.37
Amebas S ₇ incubadas con células Vero	2.31	2.5	0.59

Amebas S₃ = Naegleria fowleri (76/14/S₃)

Amebas S₇ = Acanthamoeba griffini

5.- DISCUSSION

5.1.- SOBRE LA ACCION CITOPATOGENICA DE DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS
SOBRE CELULAS VERO. INFLUENCIA DEL TIEMPO Y DE LA PROPORCION AME-
BAS-CELULAS.

Los estudios sobre la acción citopatógena de distintas especies amebianas sobre líneas celulares, pueden ayudar a dilucidar el complejo mecanismo de la acción patógena de estas amebas en animales superiores.

Según se ha desprendido de nuestros resultados (Cuadro nº1) el grado de citopatogenicidad está condicionado a una serie de factores que influyen en él muy directamente.

Se observa así que la relación entre el número de amebas y número de células, según los resultados obtenidos, es un factor influyente en el grado de citopatogenicidad producido por una especie dada. Cuando la relación número de amebas/número de células Vero era del orden 10/1, prácticamente todas las especies de amebas ensayadas destruyeron la capa celular en un período de, tan solo, 24 horas. Si dicha relación estaba en la proporción 1/1, el tiempo en destruir la capa celular aumentó en prácticamente todas las especies estudiadas hasta las 48 horas, excepto en dos especies, Acanthamoeba Gr-1 y Naegleria fowleri 76/14/S₃, cuya acción citopatógena era evidente ya a las 18 horas.

Cuando la relación nº de amebas/nº de células era ya de 1/10 la mayoría de las especies no destruían la capa celular ni a las 72 horas. Se mantiene el caso especial de las dos especies antes mencionadas,

las cuales inducen el mayor grado citopatogénico ya a las 48 horas.

En definitiva, se observa una marcada relación entre el grado de citopatogenicidad dependiendo del número de parásitos puestos en contacto con el cultivo celular. Este hecho concuerda con el estudio llevado a cabo por Grillot y Ambroise-Thomas. (1981), con varias cepas de Acanthamoeba sobre dos líneas celulares distintas, quienes hacen constatar, que para que desaparezca la capa celular, el tiempo necesario va en función del inóculo. Así, a un inóculo amebiano pequeño, le corresponde un tiempo mayor que a un inóculo mayor, en el cual la desaparición de la capa celular se realiza en menor tiempo.

Marciano-Cabral y cols (1982), realizaron un estudio de la citopatogenicidad de varias cepas de Naegleria fowleri, y de una cepa de Naegleria gruberi frente a distintas líneas celulares.

El primer resultado que obtuvieron, fué la distinta susceptibilidad que presentan las diferentes líneas celulares, frente a la acción citopatogénica de una cepa de Naegleria fowleri y una de Naegleria gruberi. Señalan, que en el caso de N. fowleri las células de neuroblastoma de rata son más susceptibles que las células HeLa, y en el caso de N. gruberi, también son las células de neuroblastoma más susceptibles que las células HeLa ó las Vero.

Existe una pequeña controversia, en cuanto que estos autores hacen distinciones entre las líneas celulares empleadas, mientras que Grillot y Ambroise-Thomas (1981), creen que no influye cualitativamente

te el tipo de células utilizadas.

En nuestro caso, no podemos afirmar ni desmentir nada a este respecto, puesto que hemos utilizado únicamente una línea celular para todas nuestras experiencias, que poseen diferente orientación.

Otro resultado que señalan Marciano-Cabral y cols. (1982), es la estrecha relación que existe entre el tiempo que tarda en destruirse la capa celular y la proporción amebas/células. Así, a mayor número de células respecto al número de amebas el tiempo en destruirse la capa celular va aumentando progresivamente.

Zubiaur y Alonso (1983), estudiaron la citopatogenicidad de tres especies de Naegleria. Para ello utilizan tres líneas celulares distintas y diferentes medios de cultivo.

Es de destacar el diferente comportamiento de las distintas líneas celulares frente a una misma especie amebiana. No mencionan, sin embargo, las proporciones amebas/células. Es de interés mencionar la disminución de efecto citopatogénico a mayor concentración de amebas (N. gruberi 1518/1f), frente a fibroblastos de embrión de pollo.

Nosotros hemos podido constatar también que el tiempo de cultivo conjunto es un factor a tener en cuenta en relación con la citopatogenicidad. Globalmente, podemos decir que conforme va aumentando el tiempo de cultivo, el grado de citopatogenicidad va aumentando progresivamente, en prácticamente la totalidad de las especies ensayadas. So-

lamente la cepa SH₅₆₅, de la especie Acanthamoeba lugdunensis, no indujo ningún cambio destacable en algunas proporciones incluso a las 72 horas, (cuadro nº 1).

Este hecho, había sido anteriormente señalado por diversos autores los cuales concluyen que el factor tiempo es una condición a tener en cuenta en el estudio de la citopatogenicidad, (Grillot y Ambroise-Thomas, 1981; Marciano-Cabral y cols, 1982; Zubiaur y Alonso, 1983).

Es lógico pensar, al querer dar explicación a este fenómeno, que conforme va aumentando el tiempo, el nº de amebas inicial va aumentando progresivamente y que este aumento lo hagan a un ritmo mayor que en el caso de las células Vero, lo que indudablemente conduciría al incremento del efecto citopatogénico.

En los resultados obtenidos (cuadro nº1) observamos el diferente comportamiento de dos cepas de Acanthamoeba lugdunensis. La cepa SH₅₆₅ no produce un efecto citopatogénico muy marcado, mientras que la otra cepa de A. lugdunensis, a iguales períodos de tiempo y relación nº de amebas/nº de células Vero induce una citopatogenicidad mas acusada.

Creemos que ello pueda deberse a que, aunque pertenecientes a una misma especie, las cepas sean diferentes presentando un distinto comportamiento. También cabe pensar en los cambios en la capacidad citopatógena que experimentan las amebas cuando se las mantiene en culti-

vo axénico., (Visvesvara y Callaway, 1974; Wong y cols, 1975). Quizás la especie Acanthamoeba lugdunensis, aislada en 1982, conserva mas intacta su virulencia que la cepa SH₅₆₅ aislada en 1975, y mantenida en cultivo axénico desde entonces.

Por último, de los resultados obtenidos tambien podemos deducir que las cepas que inducen mas alto grado de citopatogenicidad son Naegleria fowleri 76/14/S₃ y Acanthamoeba Gr-1, mientras que las que inducen un efecto citopatogénico mas débil son Acanthamoeba lugdunensis cepa SH₅₆₅ y Acanthamoeba griffini cepa S₇.

5.2.- SOBRE EL TIPO DE FACTORES (DIFUSIBLES O NO DIFUSIBLES) IMPLICADOS EN LA CITOPATOGENICIDAD DE LAS AMEBAS SOBRE LAS CELULAS VERO.

Despues de numerosos estudios,sobre la naturaleza del factor ó factores implicados en la citopatogenicidad de las amebas,aún no se conoce por que tipo de mecanismo destruyen las células del hospedador. Son varias las hipótesis,como la de Chang, (1974), que sugiere la existencia de una sustancia,(enzima), citolítica. Otros autores,como Brown, (1979), ó John, (1985), que señalan que la citopatogenicidad depende tan solo de una actividad fagocítica por parte de las amebas. En la actualidad es tema de controversia, siendo punto de discusión entre diferentes autores.

Nosotros hemos llevado a cabo una serie de estudios,para ver que factores son los implicados en la citopatogenicidad, para lo cual hemos realizado una serie de experiencias.

La idea previa principal,era averiguar si la citopatogenicidad derivaba exclusivamente de la función fagocítica,y por lo tanto necesitaban las amebas del estrecho contacto con la célula,ó sí se debía a una sustancia citolítica ó citotóxica que excretaban las amebas al medio,y que era la causante de la destrucción celular (enzima citolítica, Chang 1974; proteína, Schuster y Dunnebacke,1979).

La primera experiencia llevada a cabo por nosotros,fué determinar si las amebas necesitaban del contacto estrecho con el cultivo

celular, bien para poder fagocitarlas, bien para estimular la excreción de alguna sustancia. El montaje de los cultivos celulares y amebianos, se hizo en cámaras de difusión, a las que se les intercaló un filtro de $0,45\mu\text{m}$, para evitar el contacto directo entre ambos. Esta primera experiencia dió resultados negativos en el sentido de que no se evidenciaron alteraciones celulares.

Ello nos hizo pensar en dos posibilidades:

- que fuese necesario el contacto ameba-célula para que se manifestase la actividad citopatógena
- ó que la cantidad de medio de cultivo en las cámaras fuese excesiva, (2 ml); que se enmascarase la actividad de la sustancia liberada al medio no obteniendo resultados positivos.

Intentando obtener datos mas satisfactorios, montamos una nueva experiencia sobre placas de microtitulación, en las cuales la cantidad de medio fué sensiblemente inferior, (0,2 ml), y cultivamos las amebas durante dos períodos de tiempo, (5 y 24 horas). A continuación, se recogieron los sobrenadantes de los distintos cultivos amebianos, y los pusimos en contacto con los cultivos celulares.

Los resultados obtenidos (cuadro nº2) a las 72 horas de contacto del medio con las células Vero fueron negativos, llegando a pensar que las amebas por sí solas, no inducen la excreción de ninguna sustancia, sino que necesitan de ese contacto, previo, célula-ameba, bien para fagocitarlas, bien como estímulo para excretar alguna sustancia.

A fin de encontrar una respuesta a este dilema, montamos una nueva experiencia, en la que previamente las células y las amebas estuvieron en contacto. Este contacto estuvo controlado durante 5 y 24 horas, tiempo este último en que la capa celular había desaparecido. A continuación los sobrenadantes, (sin formas amebianas), se añadieron a nuevos cultivos celulares.

A las 72 horas de observación, los resultados, (cuadro nº3), reflejaron la existencia de 4 especies (Acanthamoeba lugdunensis, A. griffini, A. culbertsoni y A. lugdunensis cepa SH₅₆₅), cuyos sobrenadantes provocaban alteraciones en los cultivos celulares mientras que en las otras 4 especies, (A. Gr-1, A. castellanii, A. lenticulata y Naegleria fowleri), no encontramos alteración alguna.

De todo ello pudimos deducir, que era necesario un contacto previo entre las amebas y las células para que existiera una acción patente. Podemos así pensar, que en el caso de las 4 especies cuyos sobrenadantes de cultivo no provocan ninguna alteración sobre los nuevos cultivos celulares, el mecanismo de destrucción pueda ser, únicamente, a través de una mera acción fagocítica, mientras que los sobrenadantes de las especies que provocan alteración, contengan alguna sustancia, sea cual sea su naturaleza, responsable de la citopatogenicidad.

Esta última hipótesis podemos corroborarla si consideramos el factor tiempo. Cuando existe un contacto directo célula- ameba, el tiempo de destrucción de las primeras es aproximadamente de 24 horas, mientras que cuando son tan sólo los sobrenadantes con la supuesta sus-

tancia, el efecto destructor no se pone de manifiesto hasta las 48 horas. Quizás el doble mecanismo de destrucción, sea el responsable de la reducción del tiempo, al aunarse la acción fagocítica y la sustancia liberada al medio.

Los resultados obtenidos por nosotros, están en parte de acuerdo con los obtenidos por otros autores. Todos dan a entender, que para que el efecto citopatogénico se realice debe de existir un contacto previo parásito-célula, sin el cual no se manifiesta dicho efecto, como anteriormente hemos comprobado, (cuadro nº 3).

Brown en 1979, da a entender que es necesario el contacto ameba-célula, ya que promulga que el mecanismo de destrucción es por fagocitosis. Literalmente él habla de como las amebas hacen en las células "agujeros" tras repetido "picoteo". Esto nos hace pensar que si todas las amebas utilizan como único mecanismo de citopatogenicidad la acción fagocítica; ¿ como es posible que se dé el efecto citopatogénico cuando solamente se añaden los sobrenadantes de los cultivos conjuntos, no estando presentes las formas amebianas?.

Mas recientemente, John. (1984), habla de la presencia en especies del género Naegleria de unas estructuras a modo de bocas, (amebostomas), que son capaces de deglutir bacterias, eritrocitos, levaduras, e incluso amebas muertas. Es probable, que las amebas utilicen estas estructuras para fagocitar y destruir a las células.

En cambio, hay otros autores que atribuyen el efecto citopatogénico a la presencia de una sustancia, ya sea de naturaleza lipídica, protéica ó enzimática. Esa posible sustancia, según hemos podido comprobar nosotros, sólo se pone de manifiesto cuando hay un previo contacto célula-ameba, ya que el sobrenadante amebiano, por sí solo no produce ningún efecto citopatogénico.

Cabe destacar el mismo comportamiento, entre las dos cepas de Acanthamoeba lugdunensis estudiadas. Así como en el estudio de la citopatogenicidad las dos cepas tenían comportamiento distinto, en cuanto al factor responsable de la citopatogenicidad, ambas muestran que en los sobrenadantes de los cultivos conjuntos existe un factor responsable, al menos en parte, de la destrucción de los cultivos celulares. Este fenómeno se manifiesta también a partir de las 48 horas de contacto, de los cultivos celulares con los sobrenadantes.

Es por todo esto, que no podemos desestimar ninguna de las teorías planteadas por otros autores, aceptando ambas, siempre y cuando se acepte que los mecanismos de patogenicidad dependerán de las características intrínsecas de cada especie amebiana, por lo que cada especie en particular puede mostrar unos mecanismos propios, al mostrar su citopatogenicidad.

Los resultados reflejados en el cuadro nº 3, fueron llevados a cabo a una temperatura constante de 37°C. Pensamos en la posibilidad, de que los sobrenadantes con efecto citopatogénico manifiesto pudieran perder esta capacidad, al ser sometidos a distinta temperatura.

Para ello, se montó una nueva experiencia en las que los sobrenadantes se sometieron a una serie de temperaturas durante unos tiempos prefijados, de acuerdo con lo establecido por otros autores en experiencias sobre temas similares, (Fulford y cols, 1985).

En el estudio de los sobrenadantes de la especie Acanthamoeba culbertsoni (cuadro nº 5), a partir de las 18 horas se observó que, tras el procesamiento a 37, 44, 56, 4 y -20°C, las células aparecían redondeadas y despegadas del sustrato. Solamente a la temperatura de 100°C las células aparecían con morfología normal. Esto nos hace pensar en el hecho de que el factor ó factores son hasta cierto punto termoresistentes (56°C durante 30 minutos), pero termolábiles a 100°C.

En el caso de A. lugdunensis el factor ó factores responsables, son estables a 37, 44, 56 y 100°C, por lo que el factor tiene que ser termoresistente. Se observa asimismo que a 4 y -20°C las células no presentan alteraciones, perdiendo los sobrenadantes la capacidad citopatógena.

En el caso de las especies A. griffini y A. lugdunensis cepa SH₅₆₅, no se detecta ningún efecto sobre las células apreciable, salvo a 37°C, temperatura en la cual la morfología de éstas aparece alterada.

Según los resultados obtenidos con la especie A. culbertsoni, vemos que conforme va aumentando la temperatura la acción del factor responsable va disminuyendo, hecho que también pone de manifiesto Fulford y cols, (1985), trabajando con amebas vivas y lisados de estas.

Asimismo ellos concluyen que a temperaturas de 4 y -20°C se mantiene el grado de citotoxicidad, permaneciendo las células alteradas.

Con la especie A. culbertsoni, realizamos una nueva experiencia, a fin de comprobar si el efecto que el factor responsable de los daños sobre células Vero se mantenía sobre otro tipo de línea celular. Para ello dispusimos de un cultivo de células HeLa, las cuales sembramos en placas de microtitulación en medio MEM con 20% SBF. A continuación, durante 5 y 24 horas mantuvimos estas en contacto con un cultivo de A. culbertsoni, y los sobrenadantes de los cultivos conjuntos se recogieron y centrifugaron. Los sobrenadantes sin formas amebianas presentes, se depositaron sobre cultivos celulares nuevos, tras haber sido sometidos a la acción de las diferentes temperaturas. Se estudiaron las posibles alteraciones durante 24 y 48 horas después de la inoculación. Los resultados no dieron ningún resultado positivo, no observándose por lo tanto ninguna alteración apreciable ni a las 72 horas. Ello pensamos sea debido al distinto comportamiento de las diferentes líneas celulares frente a este tipo de amebas. Este fenómeno fue puesto de manifiesto también por Marciano-Cabral y cols (1984), quienes observaron el distinto comportamiento de diferentes líneas celulares a la acción de varias especies de Naegleria.

La última experiencia realizada para poder afianzar los resultados obtenidos en la anterior experiencia, se llevó a cabo sobre placas de microtitulación en las que depositamos cultivos celulares, (Vero), en medio MEM mas. 20% SBF. Una vez adheridas las células, se cambió el medio de cultivo, como en las experiencias anteriores, y estos cultivos también se mantuvieron durante 5 y 24 horas en contacto con el medio. Estos tiempos se pensaron para dar posibilidad a que las células excretasen al medio alguna sustancia, que fuese la responsable posteriormente de que las amebas liberasen alguna sustancia a su vez responsable de la destrucción de la monocapa celular. Pasado este tiempo, los sobrenadantes se depositaron en nuevos pocillos a los que se adicionaron las distintas especies amebianas, manteniéndose el cultivo conjunto durante 5 y 24 horas, tras lo cual los sobrenadantes centrifugados se depositaron sobre nuevos pocillos con cultivos celulares.

A las 72 horas, se observó que los cultivos celulares no manifestaban ninguna alteración, manteniéndose estos igual que los cultivos control. Por todo ello pudimos deducir, que las células por sí solas tampoco excretan ninguna sustancia al medio que sirva de estímulo, para que las amebas a su vez liberen ese factor, responsable de su citopatogenicidad. Por lo tanto, esta nueva experiencia nos ayuda a confirmar que debe de existir ese previo contacto célula-ameba para que se manifieste el efecto patógeno.

El tiempo aleatorio escogido de 5 y 24 horas para los cultivos, se hizo pensando en varias circunstancias; por un lado pensamos en el caso de las amebas ó las células solas que encontraríamos diferencias

sustanciales ya que en un tiempo pequeño, la liberación al medio de cultivo de alguna sustancia, sería menor que a un tiempo mayor. De los resultados obtenidos se desprende, que el tiempo no afecta a la liberación del factor responsable, puesto que los resultados fueron negativos, no apreciándose ninguna diferencia apreciable digna de reseñar.

5.3.- SOBRE FACTORES ASOCIADOS A LAS MEMBRANAS.

Los resultados obtenidos, (Cuadro nº 7), al estudiar el efecto producido sobre las células Vero, de las membranas amebianas aisladas, fueron variables. En la mayoría de las especies, a pesar de la elevada concentración utilizada, no se observaron alteraciones en los cultivos celulares, ni aún tras 72 horas.

Solo en el caso de A.castellanii y de A.griffini, se observaron alteraciones notables en las células, tal y como se observa en las microfotografías nº 6 y 7 , donde a las 24 horas el tapiz celular ha desaparecido. No sorprende en el caso de A.castellanii, dado que la inexistencia de factores difusibles, previamente demostrada, lleva a pensar en una citopatogenicidad asociada a membranas. En el caso, sin embargo, de A.griffini, donde a partir desde las 24 horas se aprecian alteraciones, podría pensarse en la existencia conjunta de factores difusibles de acción mas lenta, y, por otra parte, de factores asociados a membrana de acción mas rápida, probablemente debida a la gran concentración empleada.

5.4.- SOBRE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES OBSERVADAS EN LAS CELULAS VERO EN CULTIVO CONJUNTO CON DISTINTAS ESPECIES AMEBIANAS.

Basándonos en los resultados obtenidos, anteriormente descritos, y, dado que no hemos encontrado antecedentes bibliográficos sobre la estructura y ultraestructura de las células Vero, hemos creído oportuno señalar una serie de características observadas en ellas, a fin de obtener un punto de referencia para la posterior discusión de las células "tratadas":

A.- Microscopio óptico. Estudios estructurales Vero control.

Al microscopio óptico, podemos destacar en las células Vero control la presencia de una morfología variable, aunque se presentan casi siempre en forma alargada mas ensanchada en la región del núcleo y mas estrecha en las zonas terminales.

No se observa contacto entre unas células y otras. Presentan un solo nucleolo, que en las ocasiones que no se observa, se evidencia cromatina adosada a la membrana nuclear y en ocasiones de forma difusa por el nucleoplasma.

B.- Microscopio electrónico. Estudios ultraestructurales Vero control.

Las células Vero control, muestran una membrana plasmática con

ultraestructura típica de unidad de membrana, ausencia de glicocalix. Posee a intervalos pequeños prolongaciones digitiformes. No se aprecian vacuolas lipídicas. Posee retículo endoplasmático liso y retículo endoplasmático rugoso, en cadenas.

El citoplasma posee abundantes estructuras filamentosas y microtubulares a veces de considerable longitud. Se aprecia aparato de Golgi. No hemos observado centriolos. Las mitocondrias son abundantes. El núcleo está en posición central. El aspecto nuclear es el típico de un núcleo compacto, se aprecian condensaciones cromatínicas dispersas, asociadas a la membrana nuclear interna. Los núcleos de las células en las que se evidencia el nucleolo, este es generalmente único.

A.- Microscopía óptica. Células Vero-Naegleria fowleri 76/14/S₃.

De los tres plazos fijados para este estudio, solo a las 24 horas se apreciaron alteraciones visibles a microscopía óptica en las células Vero, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las observaciones "in vivo", (cuadro nº1), donde, a una relación amebas/células 1/1, por ejemplo, la desaparición del tapiz celular se hacía patente a las 18 horas del cultivo conjunto.

Las alteraciones observadas, son relativas a cambios en el perfil celular, y aparición de inflexiones nucleares.

B.- Microscopía electrónica. Células Vero-Naegleria fowleri
76/14/S₃.

Al microscopio electrónico, sin embargo, las alteraciones son patentes desde las 6 horas, y se van incrementando con el paso del tiempo hasta las 24 horas. No se evidencia, no obstante, lisis celular, lo que concuerda con lo señalado por otros autores, (Marciano-Cabral y cols, 1982), utilizando otras líneas celulares. No se han obtenido evidencias claras de fagocitosis de grandes porciones celulares, y parece que la disrupción de la membrana celular, y la ingestión de los materiales citoplasmáticos se lleva a cabo tras un contacto estrecho a nivel de membrana plasmática que va seguido de la formación de vacuolas a este nivel. Esto es lo que deducimos a partir, de las observaciones realizadas, y se pone de manifiesto en la figura 32, donde, en algunas zonas, no pueden diferenciarse la membrana amebiana de la celular y concreta-

tamente en estos lugares se aprecia la formación de vacuolas de superficie, que muy bien pueden ser fagocíticas y verter tras ello el material fagocitado a vacuolas de mayor tamaño. Estas observaciones, están de acuerdo con lo señalado por Marciano-Cabral y cols, (1982), para Naegleria fowleri y células de neuroblastoma. También en este caso, una misma ameba parece afectar a más de una célula a la vez.

Debido a la existencia de células alteradas que no están aparentemente en contacto con amebas, puede pensarse en la existencia de algo más que una mera acción fagocítica. Es decir, aún estando demostrado en este caso, (cuadro nº 3), que es preciso el contacto de las amebas con las células para el desarrollo del poder citopatogénico, puede pensarse en la existencia de factores inducidos por la presencia amebiana, que afectan negativamente el metabolismo celular y ejercen una acción que se traduce por alteraciones ultraestructurales. Estas alteraciones básicamente en este caso, pueden condensarse en:

- .- formación de vesículas lipídicas.
- .- vacuolización citoplasmática.
- .- mayor patencia y tamaño de los microtúbulos citoplasmáticos.
- .- alteraciones en la morfología nuclear.

De este modo, los resultados obtenidos llevan a concluir que Naegleria fowleri 76/14/S₃ ejerce una acción citopatogénica sobre células Vero, que se traduce en alteraciones metabólicas de estas que, muy probablemente, van a favorecer la acción fagocítica amebiana que va a

tener como resultado final la desaparición del tapiz celular.

Esta acción es muy diferente a la ejercida por otras especies del mismo género, (N. lovaniensis y N. australiensis), sobre células de neuroblastoma, (Marciano-Cabral y cols, 1986), pues en ese caso la lisis celular es lo mas significativo comenzando por daños en la membrana y citoplasma. De todos modos, tambien sugieren Marciano-Cabral y cols, (1986), la posible liberación de sustancias citolíticas justo en los lugares de unión a las células. A partir de ello puede concluirse, que los mecanismos que conducen al daño celular son mas parecidos entre N. fowleri y N. gruberi que en relación con las especies anteriormente citadas. Los resultados obtenidos por nosotros coinciden pues con lo señalado por estos autores en este sentido, aunque, como hemos indicado, pensamos tambien en la existencia de factores que pueda N. fowleri liberar al medio, existiendo algo mas que una mera acción fagocítica, (ó"trofocítica" como lo denominan Marciano-Cabral y cols, 1986).

En conjunto, según las observaciones realizadas en Naegleria fowleri 76/14/S₃, podemos decir que no se ha constatado una fagocitosis por amebostomas de grandes porciones celulares, aunque sí, como hemos indicado la formación de vacuolas en la interfase ameba-célula, y de cadenas pinocíticas que parten de pseudópodos, y que, muy probablemente, reflejan la ingestión de materiales procedentes de las células. Así parece que se ejerce una fagocitosis, por contacto, de pequeñas porciones celulares que van siendo englobadas en vacuolas en algunos casos de tamaño muy grande (fig 32, que dan lugar a una extensa vacuolización citoplasmática, con material celular ingerido y figuras mielínicas.

Si comparamos los datos relativos a la ultraestructura de N. fowleri ejerciendo su actividad citopatógena, con los de amebas en cultivos axénicos, podemos ver que características son inducidas ó debidas a la presencia conjunta de amebas y células.

El estudio conjunto de la ultraestructura en cultivo axénico con las expuestas en esta Memoria, nos lleva a constatar que en ambos casos las amebas se muestran muy vacuoladas. No se observan diferencias en lo relativo a la mayor ó menor incidencia de inclusiones "lipídicas intracitoplasmáticas que existen en ambos casos, y, la única diferencia observada sea la locomoción polarizada, monopodial, que se observa en los trofozoitos que se desplazan entre las células, a diferencia de lo que sucede en los cultivados en medio axénico que tienen una morfología mas anárquica, sin grandes extensiones ectoplasmáticas.

A.- Microscopía óptica. Células Vero-Acanthamoeba spp.

A microscopía óptica, las alteraciones sufridas por las células Vero en contacto con las especies de Acanthamoeba estudiadas, se hacen patentes ya a las 6 horas de cultivo en el caso de Acanthamoeba Gr-1 y Acanthamoeba lugdunensis. Lo más característico es el acortamiento que, en estos casos, se aprecia en las células que pierden su perfil fusiforme, y, cuyos extremos se ensanchan. En el caso de Acanthamoeba castellanii y Acanthamoeba griffini, este acortamiento no se hace patente hasta las 12 horas. En todos los casos, la segunda alteración observable al microscopio óptico son los cambios en la morfología nuclear, que se traducen en irregularidades en el contorno de la membrana nuclear y aparición de condensaciones cromatínicas en el caso de Acanthamoeba castellanii. En los cultivos con Acanthamoeba griffini, a las 24 horas, las células han vuelto de nuevo a adquirir mayor tamaño, se aprecian alargadas, algunas multinucleadas y parece haberse producido trastornos en las divisiones celulares citoplasmáticas.

Comparando estos resultados con los obtenidos en las observaciones "in vivo", (cuadro nº1), vemos que lo señalado para Acanthamoeba Gr-1 coincide con lo que pudo apreciarse "in vivo", en el sentido de una acción citopatogénica patente a partir de las 6 horas que se va incrementando, hasta la desaparición del tapiz celular a las 18 horas. Los resultados, sin embargo, difieren en lo relativo a Acanthamoeba lugdunensis, donde los estudios microscópicos señalan una acción citopatogénica mayor, a lo que podría deducirse partiendo de las observaciones "in vivo".

En el caso de Acanthamoeba castellanii, podemos observar, (cuadro nº1), como la citopatogenicidad era patente "in vivo", a partir de las 12 horas, tal y como sucede en las observaciones microscópicas, y, se va acentuando con el curso del tiempo hasta las 48 horas en que desaparece el tapiz celular.

La citopatogenicidad de Acanthamoeba griffini se manifiesta tanto "in vivo", (cuadro nº1), como a microscopía óptica a partir de las 12 horas, pero en este caso no hay desaparición del tapiz celular ni aún tras 72 horas de cultivo conjunto.

B.- Microscopía electrónica. Células Vero-Acanthamoeba spp.

El estudio a microscopía electrónica presentó grandes dificultades de interpretación, debido a la inexistencia de bibliografía previa sobre el tema, por lo que hubo de recurrirse a establecer previamente los rasgos ultraestructurales típicos de las células Vero control, (apartado 5.4.A y 5.4.B de Discusión), y, proceder, tras ello, a su detallado estudio comparativo.

Un carácter general en todas las observaciones es la ausencia de acción lítica de las amebas sobre las células. Puede, así decirse, que no se ha constatado la existencia de una auténtica lisis celular. De este modo las membranas plasmáticas de las células Vero permanecen inalteradas en su continuidad a lo largo del proceso, ó, en algunos casos, se observan poco netas, pero sin que exista un vertido al medio del contenido citoplasmático, lo que concuerda con el hecho claro de una

acción citopatógena mas ó menos rápida, pero progresiva, paulatina en el curso del tiempo, y no debida a una mera lisis de membranas.

El acortamiento de las células afectadas es, también a microscopía electrónica, uno de los cambios mas acusados, y, debe reflejar, evidentemente, una pérdida de la adhesión celular al sustrato, que puede ser debida a cambios en constituyentes de membrana.

Las prolongaciones digitiformes observadas en la superficie de las células Vero, se van a modificar en el curso del cultivo conjunto con amebas, en distinto sentido. Así, en el caso de Acanthamoeba castellanii y Acanthamoeba griffini, estas prolongaciones no se observan sobre la superficie celular ya a partir de las 6 horas. Sin embargo, en el caso de Acanthamoeba Gr-1 y Acanthamoeba lugdunensis (SH₅₆₅), mas bien parece observarse un incremento en número de estas prolongaciones, que en ocasiones se disponen entre célula y célula, y en otras entre célula y ameba. Estos resultados, no pueden relacionarse con el mayor ó menor acortamiento ó ensanchamiento celular, y, contrariamente, a lo que podría presuponerse la forma de la célula no condiciona la existencia ó no, de proyecciones de membrana.

La vacuolización de las células Vero es otra de las alteraciones apreciables, en relación con las células control. En Acanthamoeba castellanii, por ejemplo, se aprecia la formación en el citoplasma celular de vacuolas muy patentes, que, incluyen, en algunos casos figuras de membrana. En Acanthamoeba Gr-1 la vacuolización celular observada no fué muy patente. En el caso de Acanthamoeba lugdunensis (SH₅₆₅), y Acanthamoeba

griffini, no se apreciaron vacuolas con figuras mielínicas, y, tampoco una vacuolización celular, sino la existencia de áreas citoplasmáticas vacías no identificables como vacuolas.

La aparición en el citoplasma de inclusiones lipídicas es otro dato relevante, y, que puede interpretarse como un signo de degeneración celular, puesto que aparecen también en células sometidas a tratamiento con fármacos ó en malas condiciones de cultivo. En el cultivo conjunto con Acanthamoeba castellanii, son ya muy patentes, a partir de las 6 horas. y, en Acanthamoeba Gr-1 y Acanthamoeba lugdunensis (SH₅₆₅) a partir de las 12 horas. No se forman, sin embargo, en células en contacto con Acanthamoeba griffini, lo que puede estar relacionado con su menor capacidad citopatógena.

Sólo en el caso de Acanthamoeba castellanii, pudieron apreciarse alteraciones mitocondriales, que, como las restantes, se iban incrementando paulatinamente con el curso del tiempo.

Una alteración curiosa, es la observada en el caso del cultivo con Acanthamoeba lugdunensis (SH₅₆₅); donde a las 12 horas de cultivo, se observan con claridad largos microtúbulos citoplasmáticos muy patentes, que recorren la célula, ya muy alterada, de un extremo a otro longitudinalmente. En el caso de Acanthamoeba griffini pudo realizarse la misma observación pero sólo a las 6 horas de cultivo y con mucha menor patencia que en el caso anterior.

La alteración nuclear más común, a los cuatro casos estudiados, es la formación de inflexiones sinuosas en la membrana nuclear.

El contorno de esta aparece ondulado con entrantes y salientes muy pronunciados.

En los cultivos con Acanthamoeba Gr-1, esta última modificación es la única apreciable. En los cultivos con Acanthamoeba lugdunensis (SH_{56b}) y Acanthamoeba griffini se aprecia también una pérdida de la cromatina periférica, conjunto con la formación de inflexiones nucleares.

El caso de los cultivos de Acanthamoeba castellanii, merece una consideración especial. Las inflexiones en las membranas nucleares son patentes a las 6 horas del cultivo conjunto, pero, sorprendentemente, a partir de este tiempo, es decir, desde las 12 horas hasta las 24 horas, los contornos nucleares se hacen circulares; los núcleos se hinchan y, al mismo tiempo, aparecen grandes condensaciones fuertemente electrodensas en el nucleoplasma, de tamaño variable, pero de una gran patencia. Ello coincide con una envoltura nuclear nítida y bien delimitada. No hemos encontrado antecedentes de este tipo de alteración anatomopatológica, en la bibliografía al respecto.

Considerando globalmente las observaciones realizadas con estas cuatro especies, vemos que sólo en un caso, el de A. lugdunensis (SH₅₆₅), se ha constatado una fragmentación celular que no se corresponde, por otra parte, con lisis de la membrana plasmática, pero que debe estar evidentemente en relación con una actividad fagocítica.

Al margen de ello, en el caso de Acanthamoeba Gr-1, es donde se ha puesto en evidencia de modo claro la fagocitosis ejercida por las amebas sobre las células, (fig.19), que dá, además, la impresión de una voracidad incrementada unida a una actividad muy grande a nivel superficial con emisión de pseudópodos, (fig.20), que engloban porciones celulares. Al mismo tiempo, (fig.20), las amebas parecen formar estructuras temporales para la ingestión de las células, haciendo progresar las porciones de las células a lo largo de una especie de túnel ó garganta hasta ser finalmente englobadas en el citoplasma amebiano. Este mecanismo de ingestión difiere del observado en las otras especies, recuerda a lo que sucede en otros protozoos no relacionados filogenéticamente, y es similar en cierto modo al mecanismo de fagocitosis que ejerce Naegleria mediante amebostomas, del que se diferencian por la menor distancia entre ambos lados del túnel, pero cuya finalidad es, evidentemente, la misma, el ejercer una fagocitosis activa.

Dado que es el caso de Acanthamoeba Gr-1 uno de los mas interesantes, y, al mismo tiempo en el que disponemos de un detallado estudio de la ultraestructura en ausencia de células, decidimos comparar las características ultraestructurales de las amebas ejerciendo la acción citopatogénica, con las de las amebas normales.

El estudio conjunto de las microfotografías de cada caso lleva a constatar la inexistencia de claras diferencias entre unas y otras amebas, excepto en lo relativo a las inclusiones lipídicas. Estas no aparecen en las amebas en medio axénico y son, sin embargo, abundantes en los que están ejerciendo una acción citopatogénica. El hecho de que en los cultivos axénicos, se observen vesículas lipídicas en aquellos trofozoitos que están llevando a cabo una fagocitosis intraespecífica, nos lleva a pensar que su presencia en las amebas está relacionada con la fagocitosis, lo que apuntaría hacia un posible contenido de carácter enzimático, debiendo en este caso cambiarse la denominación de "vesículas lipídicas" con otra más acorde con su función y contenido.

5.5.- SOBRE LOS CAMBIOS BIOQUIMICOS OBSERVADOS EN LOS CULTIVOS CONJUNTOS.

Los estudios realizados nos han permitido conocer las diferencias en el contenido lipídico y protéico de células Vero y dos especies amebianas, Naeqleria fowleri (76/14/S₃) y Acanthamoeba griffini (S₇), así como las variaciones producidas en estas últimas, tras el cultivo conjunto con células Vero.

Los niveles de proteínas totales osn, aproximadamente, el doble en células Vero que en amebas. Asimismo, los valores de colesterol y fosfolípidos totales, componentes mayoritarios de membranas, son varias veces superiores en las células Vero que en las especies amebianas. De ello, resultan relaciones de estos compuestos lipídicos por miligramo de proteína en células Vero claramente superiores, sobre todo en fosfolípidos.

A su vez ambas especies de amebas, difieren entre sí en cuanto a su composición lipídica, ya que el contenido en colesterol es mas elevado en la cepa S₃ que en la S₇, al contrario de lo que ocurre con sus niveles en fosfolípidos. En cuanto a la composición en ácidos grasos de lípidos totales, se observan diferencias apreciables entre los distintos tipos de células ensayadas. Aparte de las diferencias que cabría esperar en los porcentajes relativos de los distintos ácidos grasos, que se reflejan en valores característicos de las relaciones bioquímicas calculadas, existen además diferencias cualitativas sumamente importantes que sugieren capacidades biosintéticas desaturantes específicas para cada tipo de célula. El ácido linolénico, procedente de la desaturación del ácido linoléico, proceso catalizado por la Δ^6 -desaturasa, exclusivamente se presenta en células Vero y no en amebas. Este ácido graso es transformado, tras una etapa de elonga-

ción y nueva desaturación, mediada ahora por la enzima Δ^5 -desaturasa, en ácido araquidónico. La ausencia de ácido linolénico en amebas podría ser explicada en función de una menor actividad del sistema Δ^6, Δ^5 -desaturante de ahí su menor contenido en ácido araquidónico. Por otra parte, el elevado porcentaje de ácido oléico y por tanto de la relación 18:1/18:0 que caracteriza a amebas S_3 y S_7 es un índice de la elevada actividad Δ^9 -desaturasa en relación a la encontrada en las células Vero. Cuantitativamente el valor es muy superior en S_3 , manifestando además estas células actividad Δ^9 -desaturante sobre el ácido palmítico lo que origina ácido palmitoléico ausente en amebas S_7 . Por último, todos estos valores individuales de la composición en ácidos grasos suponen en conjunto un valor diferente, (claramente superior) en la relación insaturados/saturados, solamente en las células S_3 .

Incubación conjunta de células Vero y amebas.

Después de 5 horas de incubación conjunta con las dos cepas amebianas, las células Vero no presentan alteraciones en su contenido protéico y lipídico. Es decir, las células que se recogen del medio de cultivo son semejantes a las células Vero controles, en cuanto a parámetros químicos estudiados. Sin embargo, a juzgar por los cambios observados por ambas especies amebianas después de la incubación, es lógico pensar que un número determinado de células Vero han sido totalmente destruídas y sus componentes estructurales liberados al medio o bien incorporados directamente o transformados, tanto por Naegleria fowleri como por Acanthamoeba griffini. En consecuencia, ambas especies muestran cambios profundos después de la incubación. Se observa, en primer lugar, como el contenido protéico por células se duplica en la especie S_3 y también es un 50% superior en S_7 después de haber sido incubadas en presencia de las células Vero.

En cuanto a la composición lipídica, los niveles de colesterol se incrementan en ambas, después de 6 horas de incubación, siendo espectacular el valor de 5 veces superior al de las controles, encontrado en amebas S_7 . También los valores de fosfolípidos totales experimentan un incremento en ambas especies, pero al contrario de lo que ocurría con el colesterol, ahora es la especie S_3 la que sufre una mayor elevación de su contenido en fosfolípidos.

Si tenemos en cuenta la composición específica en cuanto a colesterol y fosfolípidos de las amebas, se puede deducir que las alteraciones producidas tras su incubación con las células vero vienen determinadas por su propia composición química. Es decir, si su contenido en colesterol es elevado tienden a incrementar sus niveles de fosfolípidos (S_3) y viceversa (S_7), alcanzando al final de la incubación valores similares de ambos componentes.

Es probable, que el enriquecimiento en componentes lipídicos que sufren las amebas proceda de las células Vero y no de síntesis de "novo". En este sentido Hysmith y cols (1982), han comprobado que cepas altamente patógenas de Naegleria contienen elevados niveles de fosfolipasas tanto celulares como extracelulares, y establecen una estrecha correlación entre su crecimiento celular y la liberación de enzimas lipolíticas al medio de cultivo. Dichas enzimas podrían ser responsables en nuestro estudio, de la liberación de componentes lipídicos de las células Vero.

Trabajos posteriores serán diseñados en nuestro laboratorio con el fin de profundizar en este y otros aspectos.

Otros autores, (Lal y cols, 1979), han comprobado "in vitro"

que la adición de colesterol exógeno al medio de cultivo de Hartmannella culbertsoni, incrementa su patogenicidad posiblemente debido a que se induce una mayor actividad de enzimas lisosomales. Por ello, las alteraciones producidas en amebas, en nuestro estudio, sugieren que hayan modificado también su carácter patógeno, por lo que trabajos futuros estarán encaminados a confirmarlo.

Por otra parte, la modificación de los componentes lipídicos mayoritarios va acompañada de alteración en su composición de ácidos grasos constituyentes. Se observa que ambas especies coinciden en una elevación del porcentaje del ácido graso poliinsaturado araquidónico, mientras que cambios de distinto signo se observan en el contenido en ácido palmítico y linoléico, que se reflejan en cambios específicos de las relaciones bioquímicas características. Así pues, se deduce que modificaciones específicas en las actividades transferásicas o desaturantes, tienen lugar tanto en Naegleria fowleri como en Acanthamoeba griffini en presencia de células Vero.

6.- CONCLUSIONES

- 1.- La citopatogenicidad, sobre células Vero, de las cepas amebianas utilizadas, depende directamente de la relación nº amebas/nº células establecida en los cultivos conjuntos.
- 2.- A una relación nº amebas/nº células 10/1, todas las especies estudiadas (excepto A.griffini y A.lugdunensis SH₅₆₅), destruyen la capa celular en un período de 24 horas.
- 3.- Las cepas de A.Gr-1 y N.fowleri (76/14/S₃) utilizadas en este estudio, son las que demostraron ejercer una acción citopatógena mas rápida sobre las células Vero, aún con una relación amebas/células de 1/10.
- 4.- La citopatogenicidad, considerando aisladamente cada cepa, se va incrementando a medida que aumenta el tiempo de cultivo conjunto.
- 5.- Ninguna de las cepas empleadas en este estudio, cultivadas aisladamente, sin células Vero, libera al medio de cultivo factores que induzcan citopatogenicidad en cultivos de células Vero, al menos en nuestras condiciones experimentales.
- 6.- En los cultivos de las cepas A.lugdunensis, A.griffini y A.culbertsoni con células Vero, se liberan factores citopatógenicos para nuevos cultivos celulares, no sucediendo así con las cepas de A.castellanii, A.lenticulata, A.Gr-1 y N.fowleri.
- 7.- Ninguna de las cepas de amebas empleadas en este estudio ejerce una acción lítica sobre las células Vero.

- 8.- La cepa de N. fowleri empleada en este estudio induce alteraciones en las células Vero previo a ejercer una acción fagocítica directa sobre ellas, tras y como se deduce de las observaciones ultraestructurales realizadas.
- 9.- Las alteraciones estructurales y ultraestructurales inducidas por las especies de ACanthamoeba sobre las células Vero, difieren considerablemente de unas cepas a otras, independientemente de su mayor o menor acción citopatógena, y, demuestran en la mayoría de los casos alteraciones profundas en el metabolismo celular, previas a la acción fagocítica amebiana.
- 10.- El contenido protéico, en colesterol y fósforo lipídico en las células Vero control estudiadas, es mayor que en las especies amebianas controles utilizadas.
- 11.- Las células Vero controles contienen ácido linoléico que no contienen ninguno de los lotes amebianos.
- 12.- La cepa de N. fowleri control contiene ácido palmitoléico que no contienen ninguno de los otros lotes estudiados.
- 13.- Las células Vero incubadas con amebas mantienen su contenido protéico, en colesterol y fósforo lipídico, así como su composición en ácidos grasos similar al del lote control. Sin embargo, las amebas incubadas con células Vero elevan sus niveles protéicos, en colesterol y fósforo lipídico notablemente con respecto a los lotes controles. Asimismo, cambios específicos se observan en cuanto a su composición en ácidos grasos.

7.-BIBLIOGRAFIA

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

- APLEY, J.; CLARKE, S.K.R.; ROOME, A.P.C.; SANDRY, S.A.; SAYGI, G.; SILK, S.;
WARHURST, D.C. (1970)
Primary amoebic meningoencephalitis in Britain.
British. Med. J. 1: 595-599

- BARTLETT, G.R. (1959)
Phosphorous assay in column chromatography.
Biol. Chem. 234: 266

- BOS, H.J.; VOLKER-DIEVEN, H.J.H.; KOK-VAN ALPHEN, C. (1981)
A case of Acanthamoeba keratitis in the Netherlands.
Trans of the Roy. Soc. Trop. Med and Hyg. 75 (1): 88-91

- BRADFORD, M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities
of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-?

- BROWN, T. (1979)
Inhibition by amoeba-specific antiserum and by citochalasin B of the cyto-
pathogenicity of Naegleria fowleri in mouse embryo-cell cultures.
J. Med. Microbiol. 12: 355-362

- BROWN, T. (1979)
Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the cytopathogenicity of Naegleria fowleri in mouse embryo-cell cultures.
J. Med. Microbiol. 12 : 363-371.

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

- BUTT, C. (1965)
Primary amebic meningoencephalitis.
New England J. Med. 274: 1473-1475

- CARTER, R.F. (1970)
Description of a Naegleria sp isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it.
J. Pathol. 100: 217-244

- CERVA, L. (1971)
Studies of Limax amoebae in a swimming pool.
Hidrologie 38: 141-161

- CERVA, L. (1977)
Some characteristics of the growth of Naegleria fowleri and Naegleria gruberi in axenic culture.
J. Protozool. 24 (4): suppl. 50A, nº 38

- CERVA, L. (1980)
Naegleria fowleri: trimethoprim sensitivity.
 Science 209 (4464): 1541

- CERVOVA, H.; CERVA, L.; MACEK, J.; JONHOVA, V. (1972)
 Quantitative follow up study of the frequency of Limax group amoebae
 in the Podok swimming pool (in Czech).
 ; Cs epidem? 21: 203210

- CULBERTSON, C.G. (1961)
 Pathogenic Acanthamoeba (Hartmannella).
 Am. J. Clin. Path. 35: 195-202

- CULBERTSON, C.G. (1981)
 Amebic meningoencephalitis.
 Antibiotics and chemotherapy 30: Antiparasitic chemotherapy (Edited by
 Schönfeld, H) Basel. Switzerland, S. Karger (1981): 28-53.

- CULBERTSON, C.G.; SMITH, J.W.; MINNER, J.R. (1958)
Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity.
 Science 127: 1506

- CURSONS, R.T.M.; BROWN, T.J. (1978)
 Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living
 amoebae.
 J. Clin. Path. 31: 1-11

- CHANG, S.L. (1971)
Small, free-living amoebas: cultivation, identification, classification, pathogenesis and resistance.
Curr. trop. in comparat. Pathobiol. 1: 201-254

- CHANG, S.L. (1972)
Pathogenic free-living amoebae and recreational waters.
Proc. water Polluiton Res. (ISrael) 13 :1-12

- CHANG, S.L. (1974)
Etiological, pathological, epidemiological and diagnostical consideration of primary amoebic meningoencephalitis.
CRC Crit. Rev. Microbiol. 4 :135-158

- CHANG, S.L. (1979)
Pathogenesis and pathogenic Naegleria amoeba.
Folia Parasitol. 26 (3): 195-200

- DAS, S.R.; GHOSHAL, S. (1975)
Ann. Trop. Med. Hyg. 70: 439

- DIVE, D.; LECLERC, H.; PICARD, J.P.; TELLIEZ, E.; VANGRAVE-LINGHER, R. (1978)
Les amibes des eaux de piscine: étude microbiologique et intérêt épidémiologique.
Ann. Microbiol. 129 B : 225-244

- DOS SANTOS- NETO, J. (1970)
Fatal primary amebic meningoencephalitis: A retrospective study in Richmon (Virginia).
Am. J. Clin. Path. 54 (5) : 737-742

- DUMA, R.J.; HELWIG, W.B.; MARTINEZ, A.J. (1978)
Meningoencephalitis and brain abscess due to a free-living amoeba.
Ann. Int. Med. 88 (4): 468-473

- DUNNEBACKE, T.M.; SCHUSTER, F.L. (1974)
An infectious agent associated with amebas of the genus Naegleria.
J. Protozool. 21 (2): 327-329

- DUNNEBACKE, T.M.; SCHUSTER, F.L. (1977)
The nature of a cytopathogenic material present in amebae of the genus
Naegleria.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 25 (3): 412-421

- DUNNEBACKE, T.M.; SCHUSTER, F.L. (1985)
Morphological response of cultured cells to Naegleria amoeba cytopathogenic
material.
J. Cell Sci. 75 : 1-16

- EATON, R.D.P.; MEEROVICH, E.; COSTERTON, J.W. (1970)
The functional morphology of pathogenicity in Entamoeba histolytica.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 64 : 299-304

- EDELSTEIN, S.; LICHTENSTEIN, N.; LASMAN, M. (1957)
Proteolytic activity in the ameba Mayorella palestinesis.
J. Protozool. 14 (Suppl). 181

- EINARSON, L. (1932)
Am. J. Path. 8 : 295

- ELSDON-DEW, R. (1968)
The epidemiology of amoebiasis.
Adv. Parasitol. 6: 1-62

- FAUST, E.C. (1961)
The multiple facets of Entamoeba infection.
Int. Rev. Trop. Med. 1: 43-76

- FISKE, G.H.; SUBBARROW, V.L. (1925)
J. Biol. Chem. 65: 375

- FLEXNER, J. (1892)
Amoeba in an abscess of the Jaw.
John Hopkins Hospital Bulletin 3: 104

- FOWLER, M.; CARTER, R.F. (1965)
Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp: A preliminary report.
Brit. Med. J. 2: 740-742

- FULFORD, D.E.; BRADLEY, S.G.; MARCIANO-CABRAL, F. (1985)
Cytopathogenicity of Naegleria fowleri for cultured rat neuroblastoma cells.
J. Protozool. 32 (1): 176-180

- FULFORD, D.E.; MARCIANO-CABRAL, F. (1986)
Cytolytic activity of Naegleria fowleri cell-free extract.
J. Protozool. 33 (4): 498-517

- GARCIA-TIGERA, J.; SOTOLONGO GUERRA, F.; CEPERO NORIEGA, F.; IBARRA SANCHEZ, E.; GARCIA ORTEGA, J. (1978)
Meningoencefalitis amebiana primaria. Estudio de un caso sospechoso y revisión de la literatura médica.
Rev. Cub. Med. Trop. 30: 161-166

- GRIFFIN, J.L. (1972)
Temperature tolerance of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebas.
Science 178: 869-870

- GRILLOT, R.; AMBROISE-THOMAS, P. (1981)
Etude comparative du pouvoir pathogène des amibes libres chez la souris et de leur effect cytopathogène in vitro.
C. R. Soc. Biol. 175: 187-193

- HECKERS, H.; DITTMAR, K.; MELCHER, F.; KALINOWSKY, H.O.J. (1977)
J. Chromatogr. 135: 93

- HYSMITH, R.M.; FRANSON, R.C.; JOHN, D.T. (1981)
Abstr. 56 th. Ann. Meet. Am. Soc. Parasitol. p. 27

- HYSMITH, R.M.; FRANSON, R.C. (1982)
Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic Naegleria fowleri.
Biochem. et Biophys. Acta 711: 26-32

- JAHNES, W.G.; FULLMER, H.M.; LI, C.B. (1957)
Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture.
Proc.Soc. Exp. Biol. MED. 96: 484-488

- JANITSCHKE, K. (1977)
Wasser als infektionsquelle bei amöbenmeningo-enzephalitis.
Bundesgesundheitsblatt 20: 201

- JOHN, D.T. (1982)
Primary amebic meningoencephalitis and the biology of Naegleria fowleri.
Ann. Rev. Microbiol. 36: 101-123

- JOHN, D.T.; COLE, T.B.; MARCIANO-CABRAL, F. (1984)
Sucker-like structures on the pathogenic amoeba Naegleria fowleri.
Appl. Environ. Microbiol. 47 (1). 12-14

- JOHN, D.T.; COLE, T.B.; BRUNER, R.A. (1985)
Amebostomes of Naegleria fowleri.
J. Protozool. 32 (1): 12-19

- JONKCHEERE, J DE. (1977)
Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non-
pathogenic Naegleria fowleri isolates.
Appl. Environ. Microbiol. 33 (4): 751-757

- JONKCHEERE, J. DE (1978)
The importance of non-pathogenic Naegleria fowleri strains.
ICOOPA IV. Sect, A 33-34

- JONCKHEERE, J DE (1980)
Growth characteristics, cytophatic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different Acanthamoeba spp.
Appl. Envirom. Microbiol. 39 (4) : 681-685

- JONCKHEERE, J DE. ; VAN DIJK, J.; VAN DE VOORDE, H. (1975)
The effect of thermal pollution of the distribution of Naegleria fowleri.
J. Hyg. Camb. 75 : 7

- JONCKHEERE, J. DE. ; VAN DE VOORDE, H. (1976)
Differences in destruction of cysts of pathogenic and non-pathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine.
Appl. and Envirom. Microbiol. 31 (2) : 294-297

- JONCKHEERE, J. DE. ; VAN DE VOORDE, H. (1977)
Comparative study of six strains of Naegleria with special reference to non-pathogenic variants to Naegleria fowleri.
J. Protozool. 24 (2): 304-309

- JONES, B.R.; MCGILL, J.I.; STEELE, A.D. (1975)
Recurrent suppurative kerato uveitis with loss of eye due to infection by Acanthamoeba castellanii.
Trans. Ophthal. Soc. U.K. 95: 210

- KASPRZAK, W.; MAZUR, T.; RUCKA, A. (1974)
Studies on some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland.
Ann. Soc. belge Med. Trop. 54 (4/5): 351-357

- KASUMURA, Y.; KAWAKITA, Y. (1963)
Nippon Rinsho 21 : 1209

- KEY, S.N.; GREEN, W.R.; WILLAERT, E.; STEVENS, A.R.; KEY, S.N. Jr (1980)
Keratitis due to Acanthamoeba castellanii. A clinico pathologic case report.
Arch. Ophthalmol. 98: 475-479

- KNIGHT, R.; BIRD, R.G.; McCAUL, T.F. (1975)
Fine structural changes at Entamoeba histolytica rabbit kidney cell (RK13) interfase.
Ann. Trop. Med. and Parasitol 69 (2): 197-202

- LAL, A.A.; GARG, N.K. (1979)
Effect of cholesterol on multiplication, lipid metabolism and lysosomal enzymes of Hartmannella culbertsoni.
J. Biosci. 1 (2) : 151-157

- LAPIERRE, J. (1976)
Meningoencephalite amibienne primitive.
Concours. Med. Fr. 98 (7) : 867-873

- LAWANDE, R.V.; McFARLANE, J.T.; WEIR, W.R.C.; AWUNNOR-RENNER, C. (1980)
A case of primary amebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 (1): 21-25

- LOWREY, D.M.; McLAUGHLIN, J. (1984)
A multicomponent hemolytic system in the pathogenic amoeba Naegleria fowleri.
Infec. Immun. 45 (3) : 721-736

- LOWREY, D.M.; McLAUGHLIN, J. (1985)
Activation of a heat-stable cytolytic protein associated with the surface membrane of Naegleria fowleri.
Infec. Immun. 50 (2): 1133-1137

- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. (1951)
J. Biol. Chem. 193: 265

- LUNDT, O.E.; STEFANI, F.M.; DECHANT, W. (1978)
Amoebic keratitis a clinico pathological report.
Br. J. Ophthal. 62 : 373-375

- MAITRA, S.C.; KRISHNA PRASAD, B.N.; AGARWALA, S.C.; DAS, S.R. (1976)
Ultrastructural studies of experimental primary amoebic meningoencephalitis (PAME), of mouse due to Naegleria aerobia and Hartmannella culber-soni.
Int. J. Parasitol. 6 (6): 489-493

- MARCIANO-CABRAL, F.M.; PATTERSON, M.; JOHN, D.T.; BRADLEY, S.G. (1982)
Cytopathogenicity of Naegleria folweni and Naegleria gruberi for established mammalian cell cultures.
J. Parasitol. 68 (6): 1110-1116

- MARCIANO-CABRAL, F.M.; JOHN, D.T. (1983)
Cytopathogenicity of Naegleria fowleri for rat neuroblastoma cell cultures. Scanning electron microscopy study.
Infec. Immun. 40 (3): 1214-1217

- MARCIANO-CABRAL, F.M.; FULFORD, D.E. (1986)
Cytopathology of pathogenic and non pathogenic Naegleria species for cultures rat neuroblastoma cells.
Appl. Environ. Microbiol. 51 (5) : 1133-1137

- MARTINEZ, A.J. (1983)
Free-living amoebae pathogenic aspects. A review.
Protozoological abstracts 7 (7): 292-306

- MARTINEZ, A. J.; DUMA, R.J.; NELSON, E.C.; MORETTA, F.L. (1973)
Experimental Naegleria meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by Naegleria and pathologic changes produced. A light and electron microscope study.
Lab. Invest. 29: 121

- MARTINEZ, A.J.; DUMA, R.J.; NELSON, E.C. (1974)
Primary amebic (Naegleria) meningoencephalitis in mice: pathogenetic mechanisms.
ICOPA III Vol 1: 183

- MARTINEZ, A.J.; AMADO LEDO, D.E. (1979)
Meningoencephalitis and encephalitis produced by free-living amoebae. Protozoology, epidemiology and neuropathology.
Morfologia normal y patologica. 3 (3): 679-704

- MASCARO LAZCANO, M.L. (1985)
Estudio de la contaminación hospitalaria por amebas del grupo Limax potencialmente patógenas.
Tesis Doctoral.

- MASCARO LAZCANO, M.C.; GUEVARA BENITEZ, D.C.; RUBIA, A DE LA. (1977)
Aspectos metodológicos en el estudio de amebas Limax.
Rev. Iber. Parasitol. 37 : 329-344

- MASCARO, C.; FLUVIA, C.; OSUNA, A.; GUEVARA, D. (1981)
Virulent Naegleria fowleri isolated from a river in Cadiz (Spain).
J. of Parasitol. 67 (4): 599

- MEEROVITH, E.; GHARIDIAN, E. (1978)
Can. J. Microbiol. 24: 63

- MOLET, B. (1976)
Acanthamoeba isolated from human feces.
Acanthamoeba Conference. Abstracts.

- MOLET, B.; ERMOLIEFF- BRAUN, G. (1976)
Description d'une amibe d'eau douce: Acanthamoeba lenticulata sp.
nov. (Amoebidae).
Protistologica 12 (4) : 571-576

- MORRISON, W.R.; SMITH, L.I. M. (1964)
J. Lipid Research 5 : 600

- NAGINGTON, J.; WATSON, P.G.; PLAIFAIR, T.J.; MCGILL, J.I.; JONES, B.R.;
STEELE, A.D. (1974)
Amoebic infection of the eye
Lancet 70896: 1537-1540

- NEAL, R.A. (1958)
The pathogenicity of Entamoeba histolytica.
Proc. 6th Int. Congr. Trop. Med. Malaria 350-59

- NELSON, E.C.; JONES, M.M. (1970)
Culture isolation of agent of primary amoebic meningoencephalitis.
J. Parasitol. 56: (Abstracts) 248

- O'DELL, W.D. (1979)
Isolation enumeration and identification of amoebae from a Nebraska
lake.
J. Protozool. 26 (2) : 273-279

- PERNIN, P. (1976)
Recherche et essai d'identification par microscopie en contraste de
phase des amibes libres des piscines lyonnaises. Etude de la pathogéni-
cité des souches de Naegleria sp et d' Acanthamoeba sp isolées.
Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, Lyon 257 p.
(citado por Pernin, P y Pussard, M. 1971)

- PERNIN, P.; RIANY, A. (1978)
Etude sur la presence d'amibes libres dans les yeux des piscines lyonnaises.
Ann. Parasitol. Hum. Comp. 53 (4): 333-344

- PUSSARD, M.; PONS, R. (1977)
Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida).
Protistologica 23 (4): 557-598

- RAI, R.D.; RAO, V.K.M. (1978)
Indian J. Exp. Biol. 8 : 109

- SANTIAGO, E.; GANSER, A.; MACARULLA, J.M.; GUERRA, F. (1968)
Rev. esp. Fisiol. 24: 37

- SAWYER, T.K. (1971)
Acanthamoeba griffini: a new species of marine amoeba.
J. Protozool. 18 (4): 650-654

- SAYGI, D. (1974)
Studies on isolation and the pathogenicity of an Acanthamoeba sp at 2000 metres above sea level.
Proceedings ICOPA III vol 1: 189-90

- SAXENA, A.; KAUL, D.; VINAYAK, V.K. (1986)
Amoebic eritrophagocytosis: sigrificance of membrane cholesterol to phospholipids ratio.
IRCS Medical Science 14 (3/4): 330-331

- SCHARDINGER, F. (1899)
Entwicklungskreis einer amoeba lobosa (Gymnamoeba): Amoeba gruberi.
Sitzb. Kaiserl. Akad. Wiss. Wien. Abt. 1 108: 713-734

- SCHUSTER, F.L.; DUNNEBACKE, T.H. (1974)
Virus-like particles and an unassociated infections agent in amoeba
of the genus Naegleria.
Ann. Soc. belge Med. Trop 54 (4/5): 359-370

- SCHUSTER, F.L.; DUNNEBACKE, T.H. (1976)
Cytopathology induced by cell-free lysates of Naegleria spp.
J. Protozool. 23 (2) : 7A (Abstracts)

- SCHUSTER, F.L.; DUNNEBACKE, T. H. (1977)
Ultrastructural observations of experimental Naegleria meningoencephalitis in mice: intranuclear inclusions in amoebae and host cells.
J. Protozool. 24 (4): 489-497

- SIEDEL, J.; SCHLUMBERGER, H.; KLOSE, S.; ZIEGENHORN, J.; WAHLEFELD, A.W.
(1981)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19: 838

- SINGH, B.N. (1959)
Effect of cholesterol on the virulence of Entamoeba histolytica in
rats.
J. Sci. Industr. Res. 18C :166-169

- SINGH, B.N. (1975)
Pathogenic and non pathogenic amoebae.
The Macmillan Press LTD. 1-235

- SOKAL, R.R.; KOHLF, F.J.H. (1979)
Blume ed. Madrid

- SOTELO AVILA, C.; TAYLOR, F.M.; EWING, C.W. (1974)
Clinical pathological conference. Primary amebic meningoencephalitis
in a healthy 7 year-old boy.
J. Pediatr. 85: 131-136

- STEVENS, A.R. ; O'DELL, W.D. (1974)
In vitro growth and virulence of Acanthamoeba.
J. Parasitol. 60 (5): 884-885

- STEVENS, A.R.; STEIN, S. (1977)
Analyses of pathogenic and non pathogenic Acanthamoeba and Naegleria
for lectin induced agglutination.
J. Parasitol. 67 (1): 151-153

- STEVENS, A.R.; TYNDALL, R.L.; COUTANT, C.C.; WILLAERT, E. (1977)
Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters.
Appl. Environ. Microbiol. 34 (6) : 701-705

- SYMMERS, W. St. C. (1969)
Primary amoebic meningoencephalitis in Britain.
British. Med. J. 4 : 449

- THONG, Y.H.; FERRANTE, A. (1978)
Phagocytic behaviour towards baker's yeast distinguishes pathogenic from nonpathogenic Naegleria.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72 (2) : 207-209

- VISVESVARA, G.S. ; CALLAWAY, C.S.; HEALY, G.R. (1973)
Light and electron microscopic studies on the mechanism of pathogenesis of Naegleria fowleri in mouse brain and tissue culture.
J. Protozool. 20 (4): (suppl). 498, n°13

- VISVESVARA, G.S.; CALLAWAY, C.S. (1974)
Light electron microscopic observations on the pathogenesis of Naegleria fowleri in mouse brain and tissue culture.
J. Protozool 21 (2): 239-250

- VISVESVARA, G.S.; BALAMUTH, W. (1975)
Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae, with special reference to Acanthamoeba.
J. Protozool. 22 (2): 245-257

- VISVESVARA, G.S.; HEALY, G.R. (1975)
 In vitro activity of water soluble amphotericin B methyl ester against two strains of pathogenic Naegleria fowleri.
 J. Protozool. 22 (3): (suppl). 26A, 62

- VISVESVARA, G.S.; HAELY, G.R. (1978)
 Experimental studies of a new isolate of Naegleria fowleri (strain HB- 4).
 J. Protozool. 25 (3, Pt,1) . suppl. 18A. n°41

- VISVESVARA, G.S.; MIRRA, S.S.; BRANDT, F.H.; MASS, D.H.; MATHEWS, H.M.; MARTINEZ, A.J. (1983)
 Isolation of two strains of Acanthamoeba castellanii from human tissue and their pathogenicity and isoenzymes profiles.
 J. of Clinical Microbiol. 18 (6): 1405-1412

- WANG, S.S.; FELDMAN, H.A. (1967)
 Isolates of Hartmannella species from human throats.
 New England J. Med. 277 (22): 1174-1179

- WELLINGS, F.M.; AMUSO, P.T.; CHANG, S.L.; LEWIS, A.L. (1977)
 Isolation and identification of pathogenic Naegleria from Florida lakes.
 Appl. Envirom. Microbiol. 34 (6): 661-667

- WILLAERT, E. (1976)
 Etude immunotaxonomique des genres Naegleria et Acanthamoeba (Protozoa, Amoebidae).
 Acta Zool. Pathol. (Antewep) 65: 1-239

- WONG, M.M.; KARR, S.L. Jr. ; BALAMUTH, W.B. (1975)
Experimental infection with pathogenic free-living amoebae in laboratory primate hosts: I (A). A study on susceptibility to Naegleria fowleri.
J. Parasitol. 61 (2) : 199-208

- WONG, M.M.; KARR, S.L. Jr. ; CHOW, Ch. K. (1977)
Changes in the virulence of Naegleria fowleri maintained in vitro.
J. Parasitol. 63 (5): 872-878

- ZUBIALR, E.; ALONSO, P. (1983)
Cytopathogenicity of three Naegleria strains.
Protistologica XIX (4): 495-502