

**IX Congreso Nacional de Microscopía  
9 al 13 de noviembre de 2008  
Guanajuato**

**Simposio Enfermedades Infecciosas**

**Muerte celular programada en *Naegleria fowleri***

**†‡José D'Artagnan Villalba Magdaleno, †Angélica Silva-Olivares y  
†Mineko Shibayama**

†Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN  
Av. IPN No. 2508 Col. San Pedro Zacatenco, México, D. F. CP 07360  
Tel. 5747-3800 ext, 3348. [mineko@cinvestav.mx](mailto:mineko@cinvestav.mx)

‡Universidad del Valle de México, Campus Chapultepec  
Av. Constituyentes No. 151. Col. San Miguel Chapultepec. México, D. F. CP 11850

**Resumen**

El género *Naegleria* esta considerado dentro del grupo de las llamadas amibas de vida libre. Su distribución es mundial, encontrándose frecuentemente en cuerpos de agua dulce como: lagos, lagunas, estanques, piscinas y canales de riego. *N. fowleri*, es la única amiba de vida libre patógena de su género, puede encontrarse en forma de trofozoíto, quiste y como organismo flagelado. Es responsable del desarrollo de la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) en el humano [1]. La infección se produce al exponer la mucosa nasal con aguas contaminadas con los trofozoítos de *N. fowleri*, los cuales invaden rápidamente los nervios olfatorios, cruzan la lámina cribosa del etmoides alcanzando por esta vía el sistema nervioso central. El análisis ultraestructural confirma la presencia de eosinófilos y neutrófilos rodeando a la amiba encontrándose con un número importante de parásitos [2], provocando la muerte del animal 5 días después de haberse iniciado las manifestaciones clínicas. Si el diagnóstico se realiza oportunamente, puede emplearse anfotericina B.

Basados en los estudios in vitro empleando una gran variedad de drogas, el antibiótico poliénico anfotericina B, es la droga de selección para el tratamiento contra la MAP. El mecanismo de acción reportado señala su unión a los esteroides de la membrana de las células eucariotas, con mayor afinidad al ergosterol de los hongos [3], provocando la muerte del mismo. Aunque los cambios ultraestructurales que presenta *N. fowleri*, durante su exposición al fármaco ya fueron reportados [4], el presente trabajo estudia los rasgos de muerte celular programada (MCP) que son observados en los cultivos de trofozoítos de *N. fowleri* y el organismo no patógeno *N. gruberi* cuando se adiciona anfotericina B. Los resultados observados con el tratamiento farmacológico muestran características morfológicas de MCP, como son la reducción en el volumen citoplasmático con redondeamiento celular, la distorsión nuclear, el incremento de endomembranas, la disminución de las vacuolas y la formación de “blebs” en la membrana plasmática.

## **Objetivo**

Demostrar los cambios ultraestructurales de la muerte celular programada en las amibas de vida libre *N. fowleri* y *N. gruberi* posterior a la exposición con la anfotericina B, utilizando microscopía electrónica de transmisión.

## **Metodología**

### **Cultivo celular**

Las cepas de *N. fowleri* y *N. gruberi*, fueron cultivadas axénicamente a 37°C en medio de Bacto-casitona al 2% suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco Invitrogen). Los trofozoítos fueron cosechados durante la fase logarítmica de crecimiento a las 48 h.

### **Droga**

El liofilizado de anfotericina B (Amphocil Lemery), consistió de 45% del antibiótico y 35% de colesterol sulfato de sodio, fue disuelto en agua inyectable estéril para obtener una concentración de 2.5 mg/ml para su uso en todos los estudios in vitro.

### **Tratamiento con anfotericina B para inducir muerte celular**

El antibiótico anfotericina B fue utilizado para inducir MCP en los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*. A cada cultivo celular se le adicionó el fármaco a una concentración final de 1 y 10  $\mu$  g/ml. Las células fueron cosechadas a las 24 y 48 h post-estímulo.

### **Microscopía electrónica de transmisión**

Para el estudio ultraestructural, los trofozoítos se cultivaron por 24 y 48 h en ausencia o presencia del fármaco. Las células se cosecharon y se lavaron dos veces con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y se fijaron durante una hora con glutaraldehído 2.5% con el mismo amortiguador. Una vez fijadas las amibas, se lavaron en dos ocasiones con cacodilato de sodio 0.1 M; la pos-fijación se realizó con tetróxido de osmio 2.0%, las células se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (70 al 100%) y finalmente con óxido de propileno. Posteriormente, las amibas fueron incluidas en resina epóxica. Los cortes semifinos (0.5-1  $\mu$  m grosor) se tiñeron con azul de toluidina para su observación bajo el microscopio óptico. Los cortes finos (60-90 nm grosor) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10.

## **Resultados**

Las concentraciones de anfotericina B utilizadas en este estudio fueron determinadas posteriores al análisis microscópico de las amibas durante una cinética de crecimiento celular en presencia de concentraciones crecientes de la droga. Los cambios generados en las trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* por el fármaco se observaron en todas las concentraciones experimentales, seleccionando las menores concentraciones pero

suficientes para inducir los cambios ultraestructurales (1 y 10  $\mu$  g/ml). Las primeras observaciones morfológicas de MCP en las poblaciones celulares control y tratadas con anfotericina B, que resultaron visibles por microscopía óptica fueron la pérdida de la adherencia y el redondeamiento y disminución en el volumen celular. Los ensayos de viabilidad con azul tripano demostraron una viabilidad mayor al 90% cuando fueron tratadas con el fármaco así como la integridad de la membrana plasmática en ambas especies. Por otra parte, la fragmentación del DNA y la observación del patrón en escalera, frecuentemente de 200 pb y sus múltiplos en los geles de agarosa son técnicas comunes de MCP. El corrimiento electroforético del DNA de *N. fowleri* y *N. gruberi* en presencia y ausencia de anfotericina B, mostró un DNA íntegro y de elevado peso molecular en las amibas sin tratamiento, mientras que en aquellas estimuladas con la droga se encontró un patrón irregular y diferente en ambos microorganismos. Para corroborar la presencia de la fragmentación de DNA nuclear in situ como consecuencia de la actividad de una endonucleasa, se procedió a realizar el ensayo de TUNEL. Los parásitos provenientes de medios de cultivos control (sin fármaco) y estimulados con anfotericina B, fueron positivos a las 24h y 48h, respectivamente. Finalmente las características ultraestructurales de los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* de cultivos control presentaron una morfología clásica, un eucarionte típico con una envoltura nuclear y nucleolo prominente, numerosas vacuolas y mitocondrias alargadas con escaso retículo endoplásmico, es notorio la emisión de los pseudópodos en los trofozoítos en ambas especies. Las amibas en presencia del antibiótico produjeron cambios celulares muy notorios que incluyeron distorsión alargada del núcleo, incremento en el número de mitocondrias amorfas, formación de endomembranas con disminución en el número de vacuolas, además se observaron vacuolas con contenido celular en su interior, sugiriendo autofagia. También se encontró la vesiculación en la membrana plasmática, que recuerda a los “blebbing” en las células en proceso de apoptosis.

### **Conclusiones y Discusiones**

La especie de *N. fowleri* es la única amiba de vida libre patógena de su género, que al ingresar al neuroepitelio olfatorio migra hacia el cerebro, en donde se multiplica, comprometiendo al sistema nervioso central ocasionando una meningoencefalitis aguda. La infección se manifiesta de 4 a 5 días, produciendo mal funcionamiento motor, náusea, vómito, fiebre y convulsiones. El cuadro clínico es rápido y fulminante haciendo que la mayoría de los casos sean diagnosticados post mortem. La anfotericina B es la droga seleccionada para el tratamiento de esta infección, donde las amibas de este género se muestran susceptibles.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de la anfotericina B como inductor de la MCP en los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*. Cuando las amibas fueron tratados con 1 y 10  $\mu$  g/ml del antibiótico y observados por microscopía óptica, mostraron un redondeamiento y pérdida del volumen celular; mientras que la microscopía electrónica permitió analizar los cambios ultraestructurales por efecto de la droga. Los trofozoítos provenientes de cultivos normales se mostraron alargados, con un núcleo grande y un nucleolo prominente en posición central; el citoplasma presentó granulaciones irregulares con evidentes mitocondrias. Las dos concentraciones de la droga empleadas causaron alteraciones importantes en los organelos

citoplasmáticos. Estos cambios incluyeron la distorsión de la morfología nuclear, incremento de endomembranas (retículo endoplásmico y mitocondrias), disminución en el número de vacuolas y formación de vacuolas autofágicas, ausencia de formación de pseudópodos y generación de microvesículas (que recuerdan a los cuerpos apoptóticos). La membrana plasmática mantuvo siempre su integridad en el transcurso de los experimentos.

La apoptosis ha sido reconocida y aceptada como un distintivo e importante modo de MCP, que implica la eliminación de la célula. Por otra parte, hay evidencias de otras formas de muerte celular programada no apoptóticas que deben ser consideradas, como es el caso más reciente de la entosis [5] e incluyendo la eriptosis en los glóbulos rojos, que son células sin núcleo; lo cual revela que la MCP tiene un importante papel en la fisiología de diversos tipos celulares. Sperandio et al (2000) describieron una nueva forma de MCP que es morfológica y bioquímicamente diferente a la apoptosis. En tanto, la autofagia representa otro mecanismo de MCP, que es caracterizada por el secuestro de citoplasma y organelos en vesículas de doble membrana y entregadas a los lisosomas para su subsiguiente degradación. Las amibas del género *Naegleria* mostraron signos similares y simultáneos que ocurren en las células con características típicas de apoptosis y autofagia, se ha sugerido que la mitocondria puede ser el organelo central que integre ambos fenómenos, representando la conexión entre ambos tipos de muerte celular, como sucede con la regulación coordinada de Akt y p70S6 cinasas [7]. El signo de autofagia en *N. fowleri* y *N. gruberi* puede representar un mecanismo protector contra la apoptosis, un proceso de adaptación que intenta rescatar a la célula de la muerte y mantenerla viable bajo condiciones de estrés. Sin embargo, en ciertas células y en determinadas condiciones, los rasgos morfológicos de autofagia pueden ocurrir previos a la muerte celular por apoptosis, representando una fase temprana de este fenómeno [8]. Actualmente en el laboratorio investigamos otros marcadores propios de la MCP y de autofagia para elucidar los mecanismos moleculares y bioquímicos de la MCP en las amibas de vida libre.

### Referencias

- [1] Marciano-Cabral, F. *Microbiol Rev.* 52 (1988)114-133.
- [2] Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, JJ., García-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. *Parasitol. Int.* 57 (2008) 307-313.
- [3] Masuda, A., Aiyama, SI., Kuwano, M., Ikekawa, N. *J. Antibiotics.* 35 (1982) 230-234.
- [4] Schuster, FL., Rechthand, E. *Antimicrob Agents Chemoter.* 8 (1975) 591-605.
- [5] Overholtzer, M.; Mailloux, AA., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, SJ., King, RW., Cibas, ES., Brugge, JS. *Cell.* 131 (2007) 966-979.
- [6] Sperandio, S., de Belle, I., Bredesen, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 14376-14381.
- [7] Elmore, SP., Qian, T., Grissom, SF., Lemasters, JJ. *FASEB J.* 15 (2001) 2286-2287.
- [8] Gozuacik, D., Kimchi, A. *Oncogene.* 23 (2004) 2891-2906.