

Recibido: 16.11.2017 | Aceptado: 08.12.2017

Palabras clave: *Naegleria fowleri*, modelo en el ratón, infección en el SNC, mecanismos de daño y respuesta inmunológica.



Modelos animales para el estudio de la meningoencefalitis amibiana primaria

MATILDE MINEKO SHIBAYAMA SALAS

mineko@cinvestav.mx

MOISÉS MARTÍNEZ CASTILLO

mpmartinez@cinvestav.mx

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR, CINVESTAV-IPN

La meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) es una infección causada por el protozoo *Naegleria fowleri*, que afecta el sistema nervioso central (SNC) y se presenta en individuos sanos; es una enfermedad aguda y mortal cuya incidencia a la fecha no está del todo estimada, sin embargo, tiene una gran relevancia en el ámbito médico debido a su rápida evolución y elevada tasa de mortalidad (95 por ciento) en el ser humano.

La comunidad médica no cuenta con un fármaco específico para tratar la MAP. Además, en años recientes se ha reportado un incremento en el número de casos en el mundo esto puede deberse a alteraciones en el medio ambiente causadas por el hombre, como la contaminación ambiental, el cambio climático, la falta de una adecuada cloración del agua, entre otros. Estos factores pueden incidir sobre la fauna microbiana normal y favorecer la colonización de *N. fowleri* en nuevos nichos ecológicos y así facilitar su dispersión (Martínez Castillo *et al.*, 2016).

N. fowleri presenta tres fases: quiste, flagelado (forma de pera) y forma ameboide llamada 'trofozoíto'. El quiste o fase de resistencia le permite sobrevivir en condiciones ambientales adversas (pH, salinidad, temperatura, etcétera). En la etapa flagelar, el microorganismo muestra una morfología piriforme (forma similar a una pera) con la presencia de dos o hasta 10 flagelos, su movimiento es muy activo y se desplaza a

lugares ricos en nutrientes. En la fase de trofozoíto, *N. fowleri* es capaz de alimentarse y reproducirse (Visvesvara, 2013). Se ha demostrado que las fases de flagelado y trofozoíto son infectivas, sin embargo, no se descarta que los quistes puedan diferenciarse rápidamente de los trofozoítos y tener acceso a las fosas nasales del humano para migrar desde la mucosa olfatoria al SNC y producir la MAP (Figura 1).

Este microorganismo se ha aislado en sedimentos de tierra y cuerpos de agua dulce como lagos, ríos, albercas mal cloradas, acuarios, aguas residuales, aguas termales y, en general, en cuerpos de agua dulce naturales y artificiales de todo el mundo. Este patógeno es capaz de sobrevivir en temperaturas de hasta 45 °C, por ello en los meses más cálidos del año se incrementa el número de estas amibas. Es importante mencionar que el número de casos de MAP se eleva signi-

ficativamente en el verano (Cervantes Sandoval *et al.*, 2007).

La infección causada por este protozooario está directamente relacionada con la práctica de actividades acuáticas como la natación, aunque se han documentado casos particulares en India, por ejemplo, donde se practican las abluciones, rituales en los que el agua simboliza la purificación de determinadas partes del cuerpo como la cara y, por ende, la nariz; o de pacientes con rinitis que requieren lavados nasales, quienes corren el riesgo de contraer la enfermedad ya que el agua puede estar contaminada con este microorganismo.

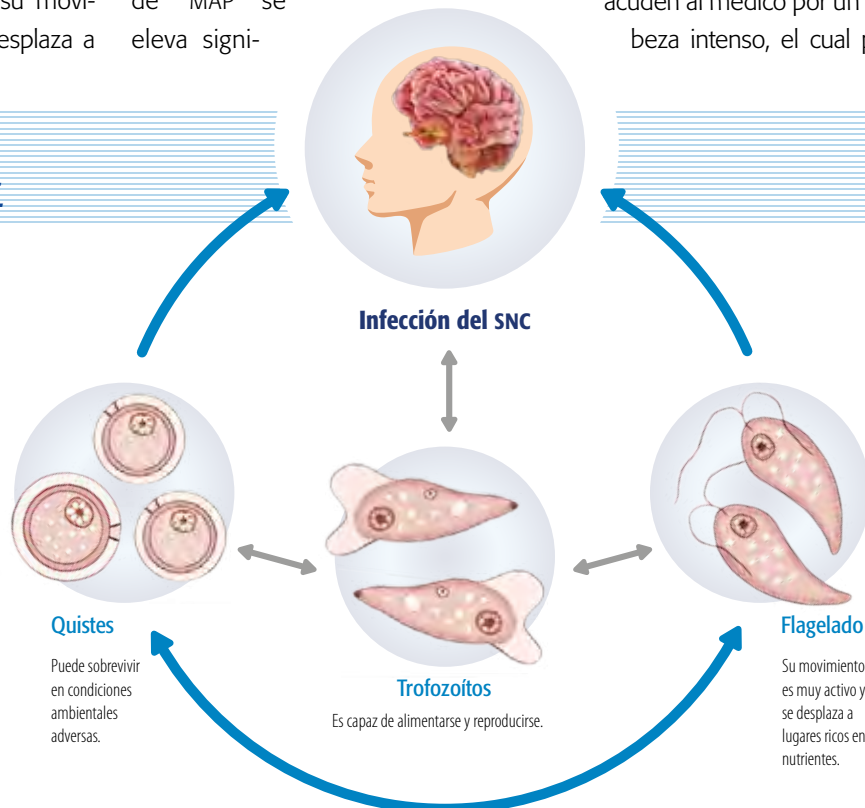
Diagnóstico y tratamiento

El periodo de incubación de la MAP es de tres a siete días y los síntomas de la enfermedad comienzan aproximadamente entre el segundo y tercer día después de la exposición a los trofozoítos de *N. fowleri*. Usualmente, los pacientes acuden al médico por un dolor de cabeza intenso, el cual puede estar

Figura 1.

Ciclo de vida de *N. fowleri*.

La amiba puede encontrarse en tres diferentes estadios (quiste, flagelado y trofozoíto), los cuales pueden infectar al humano por la vía nasal, migrar hasta los bulbos olfatorios en el SNC y causar la MAP.



acompañado de fiebre de entre 38 y 40 °C, distorsiones en la percepción del olor, fotosensibilidad (sensibilidad a la luz), vómito en proyectil (se le llama así al tipo de vómito causado por alteraciones al sistema nervioso central, tanto a nivel básico como coloquial), rigidez de cuello, convulsiones y estado de coma, que puede llevar a la muerte entre el tercer y décimo día después de la aparición de los síntomas. Es importante mencionar que el diagnóstico clínico basado en la sintomatología no puede diferenciarse con otro tipo de meningitis como las causadas por virus, bacterias y hongos (Martínez Castillo *et al.*, 2016).

La comunidad médica debe conocer la MAP producida por *N. fowleri* para no retrasar el tratamiento, esta acción puede ser determinante para salvar la vida del paciente. El único fármaco que se conoce hasta el momento que ha podido salvar a un número reducido de personas, es la anfotericina B, pero este antibiótico



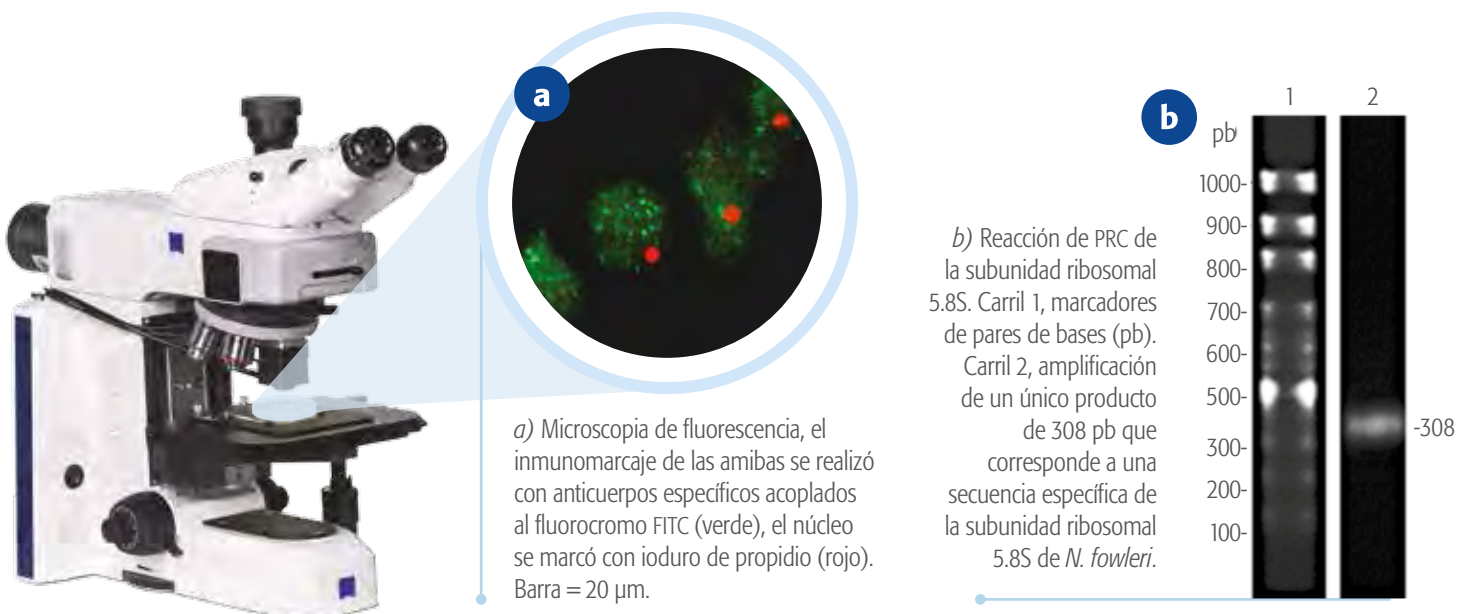
La infección por *N. fowleri* se relaciona con la práctica de actividades acuáticas

está indicado para el tratamiento de micosis profundas y no para estas amibas (Debnath *et al.*, 2012).

Para confirmar que se trata de una meningitis causada por *N. fowleri*, es recomendable realizar un análisis en fresco del líquido cefalorraquídeo (LCR); el análisis microscópico debe enfocarse en la búsqueda de la fase móvil (trofozoítos), la cual presenta una emisión de pseudópodos digitiformes y con una morfología pleomorfa o ameboidea. Debido a ello, es importante diferenciar entre *N. fowleri* y otras amibas como la *Entamoeba histolytica*, incluso con células del hospedero como los macrófagos (células de la respuesta inmune del huésped), por lo cual deben realizarse otras pruebas diagnósticas como la inducción de la forma flagelada, el uso de anticuerpos específicos y técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Figura 2.

Identificación de *N. fowleri* por técnicas inmunológicas y moleculares.



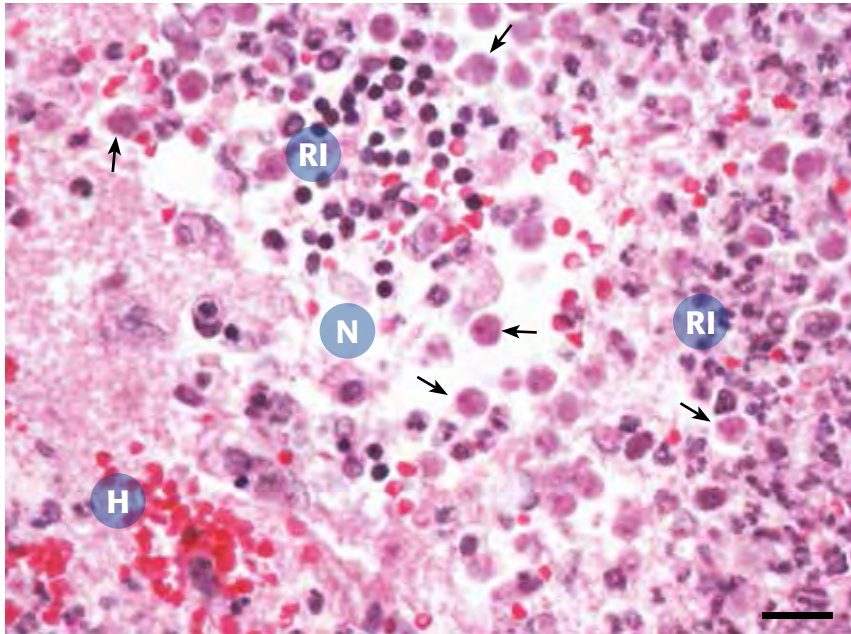


Figura 3.

Histopatología de los bulbos olfatorios de ratones instilados con trofozoítos de *N. fowleri*.

Corte de bulbos olfatorios teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) a siete días postinfección con las amibas (flechas).

Se observan áreas de necrosis (N), reacción inflamatoria (RI) y hemorragia (H). Barra = 50 μ m.



La prueba de enflagelación consiste en incubar una muestra de sedimento del LCR en solución salina isotónica durante dos horas a temperatura ambiente; después de este tiempo deben buscarse los microorganismos flagelados muy activos. Pueden realizarse marcajes con anticuerpos acoplados a moléculas fluorescentes y observarse por microscopía de fluorescencia (Visvesvara, 2013). Para la reacción de PCR se utilizan secuencias de nucleótidos específicas ya conocidas de las amibas, lo que lo hace altamente específico y sensible (Figura 2).

Modelos experimentales

A pesar de que en años recientes el uso de animales de experimentación está altamente regulado debido a las implicaciones éticas en el uso de estos modelos, es indispensable reproducir la enfermedad en ellos para conocer los mecanismos de daño que despliega *N. fowleri* durante la evolución de la MAP, además de probar nuevos fármacos dirigidos a estas amibas —que eventualmente puedan ser usados en el humano— y cono-

cer las respuestas inmunológicas que participan en la enfermedad. Para comprender la interrelación entre el huésped y este protozooario, la comunidad científica ha empleado ratones.

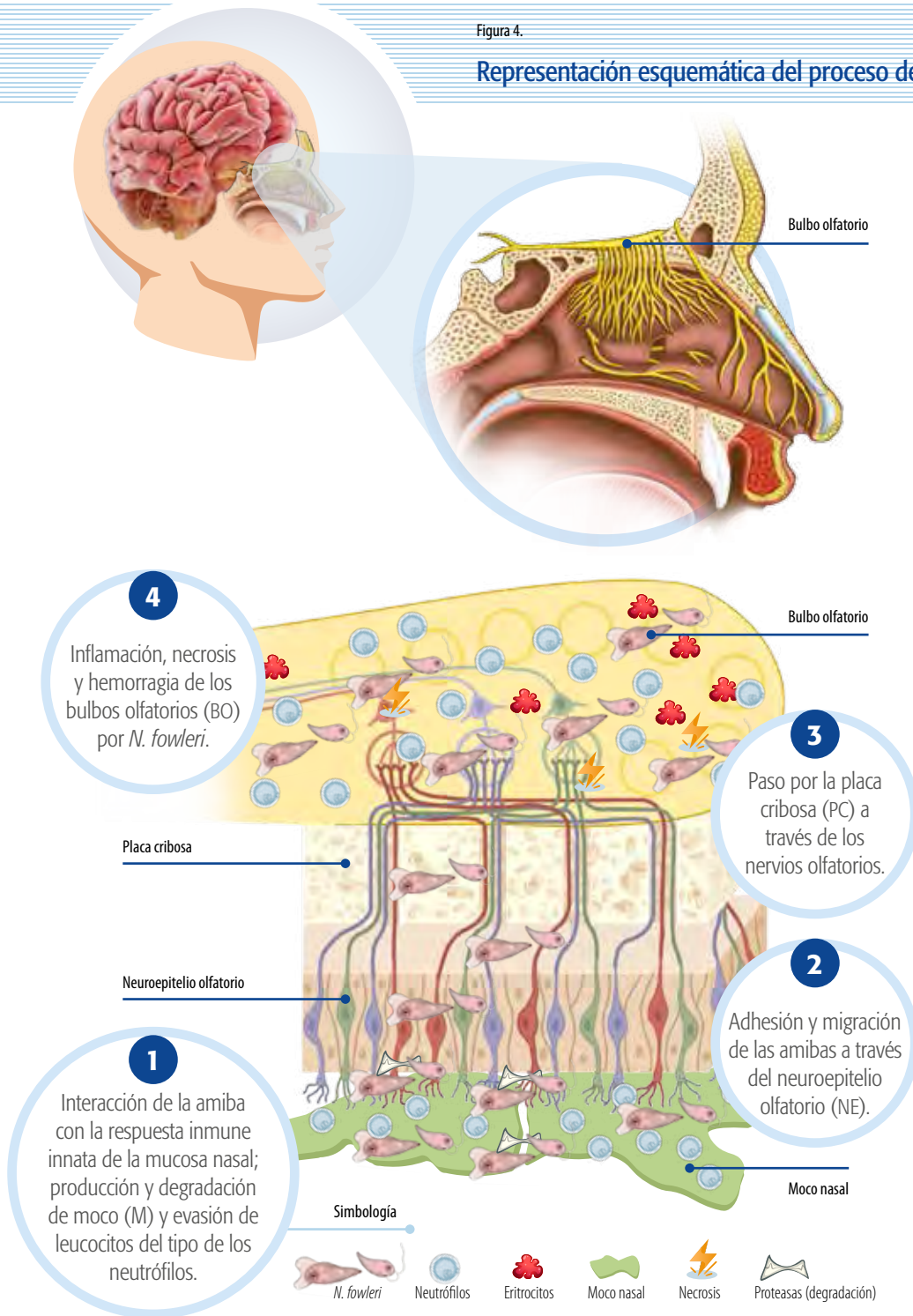
El uso del modelo murino (ratones) ha demostrado ser muy valioso para el estudio de la MAP, ya que simula la enfermedad tal como sucede en el humano. Este modelo fue descrito por primera vez en 1970, en un estudio que demostró por microscopía electrónica de transmisión que los cerebros de animales infectados con trofozoítos de *N. fowleri* presentaban una intensa reacción inflamatoria, constituida principalmente por leucocitos del tipo de los neutrófilos (células de las respuestas inmunológicas) y macrófagos (células de las respuestas inmunológicas), además de observarse áreas de hemorragia, edema y necrosis en los bulbos olfatorios. Estos resultados se correlacionaron con las descripciones de las piezas de cerebro *post mortem* de los primeros casos reportados de MAP que fueron

documentados en la ciudad de Adelaida, Australia, en el año de 1965 (Carter, 1970; Fowler y Carter, 1965).

Nuestro grupo de trabajo ha logrado reproducir este modelo animal siguiendo todas las normas de uso y cuidado en la experimentación en el laboratorio. El análisis de los tejidos durante la infección permitió determinar que después de la primera hora postinfección por la vía nasal (instilación), los trofozoítos interactúan con el moco presente en la nariz. A las seis horas de postinstilación se observó la llegada de un importante número de células inflamatorias, principalmente neutrófilos, cerca del neuroepitelio olfatorio (región olfatoria encargada de la captación de los olores). Sin embargo, algunas amibas son capaces de evadir esta respuesta inflamatoria de tipo innata, así que es posible encontrarlas adheridas al neuroepitelio olfatorio, incluso atravesando las células sin producir un daño aparente. Además, en las etapas avanzadas de la infección (dos a tres días) se observaron a los trofozoítos

Figura 4.

Representación esquemática del proceso de invasión al SNC.



A partir de las observaciones del proceso infeccioso en el modelo murino, diferentes grupos de investigación han hecho estudios sobre los mecanismos de evasión de la respuesta inmune, la adhesión, invasión y daño a las células y tejidos del hospedero por parte de *N. fowleri*. En cuanto a la evasión de la respuesta inmune ha logrado determinarse que los trofozoítos son capaces de realizar el proceso *de capping* o formación de casquete, que consiste en la reestructuración de su membrana citoplasmática para eliminar anticuerpos (IgG, IgA e IgM) y neutrófilos (Martínez-Castillo *et al.*, 2016). Recientemente nuestro grupo de investigación se enfocó en evaluar la capacidad de *N. fowleri* para degradar el moco. Los resultados *in vitro* e *in vivo* demostraron que los trofozoítos de *N. fowleri* secretan moléculas llamadas proteasas y dentro de éstas se encuentran las glicosidasas, enzimas que participan en la degradación del moco nasal.

En cuanto a los fenómenos de adhesión al neuroepitelio olfatorio, ha logrado determinarse que *N. fowleri* tiene la capacidad de unirse a las células epiteliales y a componentes de la matriz extracelular (colágena, fibronectina y laminina) por medio de distintas proteínas presentes en la membrana de este patógeno, nuestro grupo además demostró la presencia de carbohidratos en la superficie amibiana que pueden participar de manera importante en los eventos de adhesión a la mucosa olfatoria del ratón y del ser humano (Martínez-Castillo *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, después de la adhesión, las amebas

de *N. fowleri* cruzar por la región porosa de la base frontal del cráneo (hueso etmoides), para posteriormente llegar a los bulbos olfatorios en el SNC (cuatro a cinco días), y causar focos severos de inflamación de tipo agudo, así como un aumento considerable en el número de

amebas, lo cual sugiere que se dividen en este órgano. Finalmente, como se mencionó anteriormente, a los seis o siete días postinfección se observan extensas áreas de daño del tejido (necrosis) y varias zonas hemorrágicas (Cervantes-Sandoval *et al.* 2008) (Figura 3 y 4).

son capaces de migrar a través de las uniones intercelulares del neuroepitelio olfatorio, fenómeno que se debe a la capacidad de locomoción de este microorganismo por medio de pseudópodos (proyecciones del citoplasma que dan el movimiento a la amiba), así como también por la producción de proteasas, las cuales son enzimas que pueden alterar y degradar las proteínas que mantienen las uniones intercelulares (Shibayama *et al.*, 2013). Otro mecanismo de patogenicidad reportado en este microorganismo es la capacidad de fagocitar (atraer una célula para destruirla o digerirla) células epiteliales, neuronas y eritrocitos, lo cual puede favorecer el daño al SNC. Es muy probable que al conocer los mecanismos de patogenicidad de estas amibas, puedan implementarse estrategias que permitan tener mejores blancos terapéuticos antiamebianos y de diagnóstico que impacten directamente en beneficio del sector salud.

Como se mencionó previamente, no existe un tratamiento específico contra *N. fowleri*, sin embargo, desde el primer reporte en que se utilizó la amfotericina B, este fármaco demostró tener un efecto amebicida *in vitro* e *in vivo*, ya que favoreció la recuperación de los ratones que fueron infectados con las amibas. A partir de estos hallazgos se han realizado estudios en combinación con otros fármacos como la azitromicina a dosis de 75 miligramos por kilogramo al día (mg/kg/día) por vía intraperitoneal durante cinco días; este tratamiento mostró una eficacia de 100 por ciento de sobrevivencia en comparación con el tratamiento con amfotericina B a una dosis de 7.5 mg/kg/día, el cual

protegió a 50 por ciento de los animales. Recientemente, nuestro grupo de trabajo evaluó el fármaco denominado *corifungin* que mostró una gran capacidad amebicida, ya que el tratamiento permitió la sobrevivencia de 100 por ciento de los ratones instilados con trofozoítos de *N. fowleri*, además, esta droga no presentó efectos colaterales.

Conclusiones y perspectivas

A pesar de que aún faltan muchos estudios para comprender en su totalidad los mecanismos moleculares durante el proceso de invasión al SNC y los factores que predisponen a la infección, el uso del modelo murino ha permitido alcanzar importantes avances en el conocimiento de esta enfermedad. Cabe mencionar, que a pesar de que existen diversos estudios *in vitro* que han sido utilizados para analizar los factores de virulencia de *N. fowleri*, el manejo del modelo animal siempre será un requerimiento vital previo a las pruebas farmacológicas en el ser humano.

Con base en los estudios antes mencionados, podemos concluir que la MAP es una enfermedad aguda y mortal que recientemente se ha vuelto más común en países desarrollados y en vías de desarrollo; el número de casos de MAP ha aumentado debido al calentamiento global, la sobreposición mundial y el aumento de las actividades industriales. Por lo cual, es de suma importancia que el sector salud, incluidos los médicos y el personal de laboratorio de diagnóstico, conozcan este padecimiento para realizar un diagnóstico oportuno que pueda salvar la vida de los pacientes.



MATILDE MINEKO SHIBAYAMA SALAS

Obtuvo el Doctorado en Ciencias por el Cinvestav-IPN. Es investigadora SNI nivel III y está adscrita a la Unidad de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav-IPN en donde estudia los mecanismos fisiopatológicos de algunos protozoarios parásitos importantes en la salud pública de México.



El conocimiento de la biología celular y los mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* podrían ser utilizados para el desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensibles y rápidas, asimismo, podrían implementarse en los laboratorios de difícil acceso, así como en el diseño de nuevos blancos terapéuticos contra las amibas, lo que permitirá aumentar la sobrevivencia de los pacientes. **UP**

Referencias bibliográficas:

- Carter R. F. (1970). Description of a Naegleria sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *The Journal of Pathology*, 100(4), pp.217-44 doi:10.1002/path.1711000402
- Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, García-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M (2008). Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitology International*, 57(3), pp-307-13 doi:10.1016/j.parint.2008.01.006
- Martínez-Castillo M, Cárdenas-Zuniga R, Coronado-Velázquez D, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M (2016). Naegleria fowleri after 50 Years: Is it a neglected pathogen? *Journal of Medical Microbiology*. Recuperado de: doi:10.1099/jmm.0.000303
- Shibayama M, et al. (2013). Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba Naegleria fowleri. *Microbiology*, 159(2), pp.392-401 Recuperado de: doi:10.1099/mic.0.063255-0/ mic.0.063255-0 [pii]
- Visvesvara GS (2013). Infections with free-living amoebae. *Handbook Clinical Neurology*, (114) pp.153-68 doi:10.1016/B978-0-444-53490-3.00010-8 to Acanthamoeba sp.: a preliminary report. *British Medical Journal*, 2(5464), pp. 740-742