

00381

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

36

1
leg



**ESTUDIO MONOGRAFICO DE DOS ESPECIES DEL
GRUPO LIMAX, NAEGLERIA GRUBERI Y
ACANTHAMOEBA ASTRONYXIS
(PROTOZOA, SARCODINA)**

EJEMPLAR UNICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
PRESENTA EL M. EN C.

Fermin Rivera Agüero

México, D. F.

TESIS CON



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A ROSARIO, MUJER FIRMISIMA.

A MARIA BELEN, LUZ DE VIDA.

A ENRIQUE, MI ESPERANZA.

A ALFREDO, AMIGO GRANDE.

A JORGITO, IN MEMORIAM + .

METAMORFOSIS

Durante muchos años de mi vida jugué con un hermoso-
osito de peluche color naranja; hasta que en un sueño me encon-
tré con él, sentado como siempre. Me aproximé a sentir su ba-
rriquita blanca y muelle, y sin que yo lo esperase, comenzó a-
hablar diciéndome: "¡hace tanto tiempo que he esperado este mo-
mento!; he recorrido sin descanso tus infinitas sendas interio-
res, he salvado los más grandes abismos de tu espíritu, he lu-
chado con brío ante tus enemigos y te he defendido en inconta-
bles ocasiones aun de tí mismo.

Vengo desde lo más profundo de tu mente, y te encuen-
tro, por fin, aún con vida. Deseo aprovechar este encuentro -
impreparado para expresarte mi mayor anhelo: no quiero por más
tiempo ser de fieltro, deseo tener un corazón que lata al rit-
mo de la vida y que sea mi esencia más pura la de ser pensante.
Contigo, anhelo virar del negro hasta el purpúreo, alcanzar la
cima y lo profundo, y en su momento, llegar a los linderos mig-
mos de la muerte. Quiero, para decirlo en una sola frase, que-
me dejes ser en tí, lo que siempre has anhelado y no insistas-
más en seguir siendo como hasta hoy, creíste que yo fui".

Después de pronunciar estas palabras el osito calló-
y de sus ojos vidriosos se desprendieron dos perlas que al caer
sobre mis manos me hicieron despertar. Alcé los párpados cansa

dos y por mis mejillas rodaron dos lágrimas; estrujé el osi-
to entre mis manos y entonces empecé a comprender el universo.

F. Rivera A.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eucario López-Ochoterena, Director de la tesis por su valiosa ayuda y su apoyo intelectual durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Alfonso Cárabez Trejo y a la biól. Delfina Ramírez con cuya colaboración se realizó la parte ultraestructural de este trabajo.

A la M. C. María Eugenia Paz, por su desinteresada colaboración.

A los bióls. Alejandro Martínez y Adrián Arredondo por su amistosa ayuda.

A la Facultad de Ciencias.

C O N T E N I D O .

RESUMEN.

INTRODUCCION Y OBJETIVO DE TRABAJO.

- CAPITULO I.- DIFICULTADES EN LA TAXONOMIA DE LAS AMIBAS LIMAX.
- 1.- Sinopsis histórica comentada.
 - 2.- Criterios taxonómicos utilizados por los diversos autores.
 - 3.- Clasificación de Jahn, 1949.
 - 4.- Clasificación de Singh, 1953.
 - 5.- Clasificación de Bovee y Jahn, 1966.
 - 6.- Clasificación de Page, 1967.
 - 7.- Clasificación de Singh y Das, 1970.
 - 8.- Clasificación de Jahn, Bovee y Jahn, 1979.
- CAPITULO II.- MATERIAL Y METODOS.
- 1.- Recolección.
 - 2.- Filtración.
 - 3.- Especies y cepas estudiadas.
 - 4.- Cultivo in vitro.
 - 5.- Cristalería.
 - 6.- Citoquímica.
 - 7.- Microscopía electrónica de transmisión.
 - 8.- Análisis biostadístico.
- CAPITULO III.- RESULTADOS. PRIMERA PARTE.
ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DE LAS FASES -
TROFOZOIDE Y QUISTICA DE OCHO CEPAS REGIONALES
DE Naeqleria gruberi Y DE CUATRO CEPAS REGIONA
LES DE Acanthamoeba astronyxis.
- 1.- Ciclo de vida.
 - 2.- Ecología.
 - 3.- Locomoción.
 - 4.- Nutrición.
 - 5.- Multiplicación.
 - 6.- Estudio ultraestructural de la cepa Z-1 de Nae--
qleria gruberi.
- CAPITULO IV.- RESULTADOS. SEGUNDA PARTE: TRANSFORMACION AMEBO-
FLAGELAR ESPONTANEA E INDUCIDA EN OCHO CEPAS RE-
GIONALES DE Naeqleria gruberi.

- 1.- Inducción de la transformación.
- 2.- Repercusión epidemiológica de este fenómeno.

CAPITULO V.- RESULTADOS. TERCERA PARTE: SOBRE LA PATOGENICIDAD DE ALGUNAS ESPECIES DEL GRUPO LIMAX.

- 1.- Sinopsis histórica.
- 2.- Patogenicidad de las cepas regionales.

CAPITULO VI.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

- 1.- Consideraciones taxonómicas últimas.
- 2.- Hacia una taxonomía integral.
- 3.- Primeras conclusiones.
- 4.- Condiciones de cultivo. "Amibas de cultivo".
- 5.- Hábitats diversos. "Amibas del suelo". "Amibas de hábitats clorados".
- 6.- Cepas cloro-activo-resistentes.
- 7.- Acanthamoeba astronyxis: también en las piscinas.
- 8.- Ubicuidad mediante la variación fenotípica.
- 9.- Algunas palabras más sobre patogenicidad.
- 10.- Comentario final.

CUADRO No. 1 SITUACION DEL ORDEN AMOEBIDA DENTRO DEL PHYLUM -- PROTOZOA, SEGUN HONIGBERG ET AL. (1964) Y PAGE -- (1967).

CUADRO No. 2. SITUACION DE ALGUNAS FAMILIAS DEL GRUPO LIMAX. -- DENTRO DEL PHYLUM SARCODINA, SEGUN JAHN, BOVEE Y JAHN, 1979.

TABLA I.- CLASIFICACION DE JAHN, 1949.

TABLA II.- CLASIFICACION DE SINGH, 1953.

TABLA III.- CLASIFICACION DE BOVEE Y JAHN, 1966.

TABLA IV.- CLASIFICACION DE PAGE, 1967.

TABLA V.- CLASIFICACION DE SINGH Y DAS, 1970.

TABLA VI.- CLASIFICACION DE JAHN, BOVEE Y JAHN, 1979.

TABLA VII.- CARACTERIZACION DE LAS MUESTRAS DE PISCINAS DE SE-

IS CENTROS DEPORTIVOS DE LA CIUDAD DE MEXICO.

TABLA VIII.- LISTADO DE LAS CEPAS. SITIOS DE RECOLECCION. TIPOS DE CULTIVO Y TEMPERATURAS DE INCUBACION.

TABLA IX.- ANALISIS COMPARATIVO DE LA FASE TROFOZOIDE ENTRE CEPAS REGIONALES Y EXTRANJERAS DE Naeqleria gruberi.

TABLA X.- ANALISIS COMPARATIVO DE LA FASE TROFOZOIDE ENTRE CEPAS REGIONALES Y UNA EXTRANJERA DE Acanthamoeba astronyxis.

TABLA XI.- ANALISIS COMPARATIVO DE LA FASE FLAGELAR ENTRE CEPAS REGIONALES Y EXTRANJERAS DE Naeqleria gruberi.

REFERENCIAS.

ILUSTRACIONES.

La historia de las amibas que se estudian se remonta para Naegleria gruberi a 1841, cuando Dujardin (Page, 1966), -- describe una amiba pequeña de vida libre y la designa como Amoeba limax . Más tarde Schardinger en 1899 (Page, 1966), describió la Amoeba gruberi.

El dimorfismo de los organismos de esta última especie, manifiesto por su capacidad de transformación ameboflagelar, determinó durante mucho tiempo la incertidumbre de su clasificación. Fueron precisamente los trabajos de Page (1966), los que ubicaron definitivamente a N. gruberi dentro del orden Amoebida y perteneciendo a la familia Vahlkampfiidae (Cuadro 1).

En cuanto a Acanthamoeba astronyxis, su historia comenzó en 1900 (Page, 1966), cuando Dangeard publica la primera descripción de una amiba con mitosis común, a la que denomina - Amoeba hyalina.

Han sido otra vez los trabajos de Page (1966, 1967, - 1974) y también los de Singh y Das (1970), los que han permitido ubicar a A. astronyxis dentro del orden Amoebida, familia -- Hartmannellidae (Cuadro 1).

En México, por las características peculiares que aquí privan el estudio de los protozoarios de vida libre ha sido siempre una tarea difícil. La mayoría de los investigadores - nacionales se halla orientada preferentemente al estudio de los

protozoarios patógenos, lo cual no sólo resulta comprensible sino inevitable en un país en el que, como el nuestro, las parasitosis por protozoarios no son únicamente un problema de salud pública + sino también de carácter social y económico.

En nuestro medio los estudios sobre amibas de vida libre y en particular sobre las del grupo limax, han sido esporádicos, escasos y de enfoque muy general. Cabe aquí mencionar los trabajos de López-Ochoterena et al. (1970), Coronado (1973), Tomasi (1975), Rico-Ferrat (1975) y los del propio autor (Rivera et al. (1979).

El presente trabajo se convierte así, en un paso modesto pero firme para llevar el estudio de este grupo de amibas desde una fase de simple análisis en la que se encuentra (taxonomía-alfa), hasta otra superior de síntesis y correlación ordenada de datos.

Con ello se pretende fundamentar una infraestructura - que permita en lo futuro realizar un estudio más elaborado y más-profundo de las amibas limax locales.

El presente trabajo es, de hecho, el primer estudio monográfico realizado en nuestro medio sobre este grupo de amibas. A partir de él se darán los pasos subsecuentes para lograr la detección e identificación de amibas limax patógenas para nuestra especie.

De hecho, algo semejante ocurrió hace aproximadamente-

veinte años a nivel mundial. Las amibas pequeñas de vida libre no merecieron gran atención por los investigadores sino a raíz de la detección de su patogenicidad para el hombre (Carter, -- 1968).

En nuestra patria aún no han sido detectados ni casos de meningoencefalitis amibiana primaria ni cepas que exhiban el poder patógeno para producir esta enfermedad.

De ahí nuestro interés, a nivel nacional, por ahondar en el estudio de estas pequeñas amibas de vida libre que en condiciones especiales, pueden invadir al hombre causándole la muerte.

En todo estudio sobre las amibas en el que se intenta hacer una taxonomía adecuada el investigador tropieza fundamentalmente con las siguientes dificultades: aquéllas inherentes a los propios organismos estudiados, aquéllas que dependen de la brevedad o por lo contrario de la prolijidad de las descripciones hechas por diversos autores, y finalmente, aquéllas que dependen del mayor o menor desarrollo de las técnicas.

En cuanto a los criterios taxonómicos utilizados por diversos autores en distintas épocas, éstos han variado ampliamente según la época, pero haciéndose cada vez más precisos y confiables.

Por su importancia se analizan y comentan en este trabajo en orden cronológico los esquemas taxonómicos de Jahn (-- 1949), Singh (1953), Bovee y Jahn (1966), Page (1967), Singh y-

Das (1970), y Jahn, Bovee y Jahn (1979).

La taxonomía ambibiana actual se encuentra a nivel mundial y en México, en diferentes estadios de su evolución -- que van desde la taxonomía alfa hasta un inicio de la fase gamma. Se vive así, una etapa de transición hacia una taxonomía integral cuyas bases fueron cimentadas por los autores de las clasificaciones que hemos consignado.

En el caso particular de este trabajo se consideran los siguientes criterios taxonómicos para la diagnosis de ambas especies: forma locomotriz, forma pseudopódica, patrón de división nuclear, forma quística, capacidad de transformación ameboflagelar, ultraestructura y análisis bioestadístico poblacional. Abundando en este último punto, el presente trabajo, -- siendo de carácter tipológico poblacional, aporta datos nuevos, recogidos de las cepas locales, que pasan a incrementar el acervo mundial de datos, del que se dispone para poder rebasar el estadio beta de la taxonomía ambibiana, en especial del grupo Limax.

Se recolectaron muestras procedentes del suelo, de un río y de las aguas de grifos y piscinas (Tablas VII y VIII). De ellas se aislaron los microorganismos estudiados mediante filtración. Los especímenes aislados se cultivaron monoclonal y monoxénicamente en agar inoculado con E. coli, y observados en vivo con óptica de contraste de fases. Una vez tratados pa

ra la microscopía electrónica se observaron y fotografiaron.

Se obtuvieron en total doce cepas de las cuales ocho corresponden a N. gruberi y cuatro a A. astronyxis (Tabla VIII). Se midieron cien organismos de cada cepa a 100 X con un micrómetro ocular 6 X y se obtuvieron las medias, los intervalos de variación y la media de medias de las estructuras medidas.

Se realizó el análisis morfológico descriptivo de las fases trofozoide, quística y flagelar de N. gruberi, y de las fases trofozoide y quística de A. astronyxis; todo ello con microscopía de luz (Tablas IX Y X). La fase trofozoide de una de las cepas de N. gruberi (cepa Z-1), se analizó ultraestructuralmente con microscopía electrónica de transmisión.

Se describen, comparan y comentan las semejanzas y diferencias entre las cepas locales y las extranjeras descritas por Page (1966).

Se hace especial énfasis en la trascendencia de los hallazgos novedosos detectados en las cepas regionales, para la sistematización del grupo limax. Tal es el caso de las partículas semejantes a virus y de la corona perinuclear de lípidos que no se detectaron en los especímenes estudiados.

En el caso de las amibas limax, la microscopía electrónica prueba, una vez más, en atención a los resultados obtenidos en este trabajo, ser un instrumento útil y aún no plenamente explotado, que proporciona nuevos criterios y ratifica o rectifica los antiguos, todo lo cual conduce hacia una taxonomía más adecuada.

da.

Se realizó asimismo el estudio sobre la capacidad que los organismos de ocho cepas regionales de N. gruberi exhibieron, tanto en forma espontánea como inducida, para transformarse de individuos ameboides en organismos flagelados, proceso denominado transformación, y del fenómeno inverso, es decir, del paso de la forma flagelar al estado amebode, fenómeno denominado reversión. Los datos obtenidos de las cepas locales en este sentido se analizan y comparan con aquéllos de las cepas extranjeras -- (Page, 1966), en la Tabla XI.

Se efectuó la prueba de la temperatura constante a -- 37°C durante dos semanas (Griffin, 1972; Willaert, 1976), para determinar la patogenicidad de las doce cepas locales, obteniéndose resultados negativos para todas ellas.

El análisis y la síntesis de los diversos criterios taxonómicos realizado con una tendencia integradora nos ha llevado a las siguientes conclusiones:

La recolección de los organismos habrá de hacerse con equipo estéril.

El trabajo experimental habrá de hacerse con organismos procedentes de una misma clona.

Los cultivos habrán de estandarizarse lo más posible para las diferentes cepas.

Deberán observarse muchos organismos (por lo menos 30),

para poder efectuar el análisis estadístico.

Deberán estudiarse todos los estadios morfológicos -- del ciclo vital, preferentemente no sólo con el microscopio de luz sino también con el electrónico.

Deberán estudiarse con especial cuidado las figuras - mitóticas.

En síntesis, para identificar y clasificar las amibas- limax, el conocimiento del mayor número posible de características nunca está de sobra.

Además de los aspectos taxonómicos, morfológicos y de patogenicidad, se enuncian algunos de tipo ecológico. Desde este último punto de vista las dos especies estudiadas se encuentran adaptadas no sólo a sus hábitats naturales, sino además a los artificiales como las aguas de grifos y piscinas cuya cloración es bien conocida. En este sentido las dos especies consignadas en este trabajo bien pueden aceptar el apelativo de "amibas de hábitats clorados" pues está de sobre probada su resistencia en la fase quística (Jadin, 1974; Willart, 1976) y en la quística y trofozoide por nosotros en este trabajo. En efecto, nosotros detectamos una cepa resistente (cepa Pi-4 de N. gruberi), a concentraciones de cloro activo de 0.70 mg/L, cifra que Derreumaux et al. (1974), consideran como amebicida para la fase trofozoide.

Estos son, en suma, los aspectos más relevantes de esta tesis a la que consideramos, en su conjunto, la fase prelimi-

nar y básica de un proyecto más amplio encaminado a la detección de cepas patógenas y a la determinación del diagnóstico actual - y retrospectivo de meningoencefalitis amibiana primaria en México.

INTRODUCCION

9

" La suerte favorece solamente a los espíritus preparados".

Pasteur.

Con el fin de precisar la ubicación taxonómica de las dos especies de amibas Naelqleria gruberi Schardingner, 1899 y Acanthamoeba astronyxis Ray y Hayes, 1954, objetos de este estudio, es conveniente referirse a los criterios taxonómicos utilizados por Honigberg et al. (1964), Bovee y Jahn (1966), Jahn, Bovee y Jahn (1979), Page (1966, 1967, 1974), y Singh y Das (1970).

De acuerdo con estos autores (exceptuando a Bovee y Jahn, 1966 y a Jahn, Bovee y Jahn, 1979), los protozoarios constituyen el phylum Protozoa Goldfuss, 1818, emend. Von Siebold, 1845; que a su vez se subdivide en cuatro subphyla: Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963; Sporozoa - Leuckart, 1879; Cnidospora Doflein, 1901; y Ciliophora Doflein, 1901.

Dentro del subphylum Sarcomastigophora se propone, entre otras, la superclase Sarcodina Hertwig y Lesser, 1874, dividida a su vez en tres clases, una de las cuales es la Rhizopodea Von Siebold, 1845.

Esta clase se subdivide en subclases: Lobosia Carpenter, 1861; Filosia Leidy, 1879; y Granuloreticulosia Saedeleer, 1934, tomando como criterio taxonómico básico la morfología de los pseudópodos.

Las subclases se subdividen en órdenes en los que se toma en cuenta la presencia o ausencia de testa o concha, con lo que se constituye, entre otros, el orden Amoebida Kent, 1880, caracterizado por los somas desnudos y por la mononuclearidad prevalente de sus organismos.

Por su parte Jahn, Bovee y Jahn (1979), proponen un nuevo esquema taxonómico, en el que los protozoarios aparecen -- constituyendo un subreino, dentro del reino Protista Haeckel, -- 1862, con cuatro phyla, uno de los cuales es el Sarcodina. Tanto estos autores como Bovee y Jahn (1966), utilizan las características fisiológicas distintivas de los pseudópodos para los -- taxones de clase y orden, relegando la testa y la concha, cuando están presentes, para caracterizar los niveles taxonómicos de familia, género y especie.

Page (1966, 1967 y 1974), Singh y Das (1970) aceptan y siguen la clasificación propuesta por Honigberg et al. (1964), hasta el nivel taxonómico de orden. En los cuadros 1 y 2 se esquematiza la posición de las familias de amibas que interesan para este trabajo.

El carácter prevalentemente mononuclear que exhiben -- los organismos de la clase Rhizopodea, se presenta en el caso de las dos especies de amibas pequeñas que se estudian. La característica más importante para establecer el diagnóstico a nivel de familia es, en acuerdo común de Page (1966, 1967), Singh (1952, -

1953) y Singh y Das (1970), la forma de división del núcleo.

En este sentido, las amibas pequeñas de vida libre, - denominadas comúnmente limax por su aspecto de babosa durante el desplazamiento, presentan variaciones bien definidas que tienen importancia diagnóstica.

Así, la forma de división más común dentro de la clase Rhizopodea, la fisión binaria, puede asociarse en el caso de -- las amibas limax a una mitosis típica y común, semejante a la de las células de metazoarios, como sucede, por ejemplo., con A. -- astronxyxis; o a una forma atípica de la mitosis denominada promitosis como ocurre en el caso de N. gruberi. Tanto Page (1966), como Singh y Das (1970), utilizan estas diferencias de la mitosis para establecer la separación taxonómica a nivel de familia.

Page (1966, 1967, 1974), propone la familia Vahlkampfiidae Jollos y Lalung-Bonnaire, 1912, para aquellas amibas pequeñas que efectúan la promitosis; y la familia Hartmannellidae Volkonsky, 1931, para las que se dividen por una mitosis común, - semejante a la que se observa en los animales pluricelulares.

Por su parte, Singh y Das (1970), proponen la familia Schizopyrenidae Singh, 1952 para los organismos que presenten promitosis, y la familia Hartmannellidae para los que exhiben mitosis ordinaria.

Dentro de estos sistemas taxonómicos N. gruberi quedaría ubicada dentro de la familia Vahlkampfiidae según Page (1966,

1967, 1974), y dentro de la familia Schizopyrenidae según Singh y Das (1970).

En cambio, A. astronvxis correspondería, de acuerdo con ambos autores, a la familia Hartmannellidae.

Durante su locomoción las amibas limax modifican constantemente su contorno celular. Este cambio constante de la forma se debe principalmente a la emisión y retracción de los pseudópodos cuya morfología y funcionamiento varían de un instante a otro.

Sin embargo, algunos patrones morfológicos y funcionales exhibidos por los pseudópodos son bastante estables para cada grupo, y por ello mismo pueden tomarse en cuenta como uno de los criterios confiables requeridos para realizar un estudio taxonómico adecuado, Page (1966, 1967, 1974), Bovee y Jahn --- (1966), Jahn, Bovee y Jahn (1979).

Además de la figura mitótica ya comentada, también la forma del núcleo y la presencia de quistes junto con su morfología y función, resultan criterios útiles y confiables en el estudio taxonómico de las amibas. Sin embargo, el conocimiento de estos criterios es aún incompleto o falta totalmente en muchas de las especies, y, en consecuencia, la sistematización a nivel de orden, familia, género y especie es, frecuentemente, incierta y confusa, sobre todo en las formas libres (Bovee y Jahn, 1966; Singh y Das, 1970; Page, 1970; y Jahn, Bovee y Jahn, 1979).

En el caso particular de las dos especies que nos ocupan, la posición taxonómica se halla bien definida, gracias sobre todo a los excelentes estudios taxonómicos realizados por Page (1966, 1967, 1974), y reforzados vigorosamente por Bovee y Jahn (1966), por Singh y Das (1970) y, por Jahn, Bovee y Jahn (1979).

Así, N. gruberi se encuentra ubicada (y aquí seguimos los criterios propuestos por Page desde 1966, dado que son hasta hoy los más universalmente aceptados para clasificar amibas pequeñas), dentro de la superclase Sarcodina, en la clase Rhizopodea, subclase Lobosia, orden Amoebida, familia Vahlkampfiidae, género Naeqleria Alexeieff, 1912, especie N. gruberi Schardinger, 1899.

Mientras que, A. astronyxis comparte los mismos taxones que N. gruberi hasta el nivel de orden, y queda ubicada dentro de la familia Hartmannellidae, género Acanthamoeba Volkonsky, 1931, especie A. astronyxis Ray y Hayes, 1954.

En cuanto objetos de estudio, la morfología, los ciclos de vida, la reproducción, la nutrición, la ecología y la patogenicidad de las amibas limax, han recibido atención en distintas etapas históricas y por diversos autores.

En 1841, Dujardin (Page, 1966; Bovee y Jahn, 1966), describe por primera vez una amiba pequeña de vida libre y le da el nombre de Amoeba limax.

En 1879 aparece el primer estudio monográfico sobre -

las amibas linax, realizado por Leidy (Bovee y Jahn, 1966). Ya en 1885 Grüber señalaba (Page, 1966), que dado el continuo cambio en la forma de las amibas, parecía difícil encontrar una base firme que sirviera como criterio para distinguir las distintas especies.

Durante mucho tiempo se dieron varios nombres a una misma especie, y las descripciones que se hacían eran incompletas y vagas, ya que se basaban en características unas veces cambiantes y otras veces, inclusive irreales.

Penard en 1890 (Bovee y Jahn, 1966; Page, 1966), escribe una segunda monografía sobre estos organismos, y a principios del siglo XX, se convierte en el primer autor que efectúa estudios experimentales con este grupo.

El pesimismo de Dangeard, que lo llevó a enunciar que "no existe nada más difícil, en verdad, que definir una amiba" - y el de Arndt, en los comienzos de este siglo (Page, 1966), sobre la dificultad para distinguir las amibas y clasificarlas en especies distintas, fue superado ampliamente por Schaeffer quien en 1926 (Jeon, 1973), a través de un excelente trabajo monográfico, quizá el más preciso y completo hasta entonces, señaló que las características fenotípicas de las amibas en su hábitat natural, hacían posible el reconocimiento de la mayor parte de ellas y su distinción en especies.

Después de las aportaciones extensas y adecuadas de -

Schaeffer, y quizás por eso mismo, se sucedió un período prolongado sin que los nuevos estudios añadieran gran cosa al acervo ya acumulado. Este período se prolongó hasta los finales de la década de los cuarentas.

Singh (1952, 1953) realiza trabajos importantes sobre la taxonomía y la filogenia de las amibas, particularmente de las del grupo Limax, basados en el criterio morfológico del patrón mitótico. Sin embargo, estos estudios tendrían poco eco entre los autores de la época y debieron ser replanteados y completados por el propio Singh y por Das (1970), en años posteriores.

Bovee (1953), inicia sus estudios sobre taxonomía y filogenia de las amibas libres, sin dejar de señalar que la identificación de estos organismos constituye uno de los problemas más difíciles en Zoología. Este mismo autor, junto con Jahn, propone un nuevo esquema taxonómico para las amibas, que basado en los criterios morfológicos de Schaeffer, los supera y mejora (Bovee y Jahn, 1966).

El mismo Bovee (1970), incrementa el acervo de conocimientos taxonómicos sobre las amibas Limax, esta vez, de las de la familia Mayorellidae Schaeffer, 1926.

Page (1966), comienza sus trabajos sobre la taxonomía de las amibas pequeñas, y redefine los géneros Hartmannella Alexieff, 1912, y Acanthamoeba Volkonsky, 1931. Este mismo autor

completa sus estudios sobre el tema en 1967 (Page, 1967) y describe entonces ocho especies nuevas. A partir de entonces sus trabajos se multiplican y se convierte en uno de los principales estudiosos de las amibas, sobre todo de las Limax (Page, 1974). Junto con Bovee, Page, es sin lugar a dudas el autor más tomado en cuenta por los actuales especialistas de la Amebología, sobre todo en el terreno de la taxonomía, como lo certifican Carosi et al. (1977), Capron (1972), Cerva (1973), Chang (1971), Das et al. (1974), Jadin (1973 y 1974) y Willaert (1971, 1973, 1976).

Si se consideran las tres fases históricas de la sistemática de los protozoarios propuestas por Corliss (1962), podemos concluir, que todos los estudios realizados sobre amibas hasta antes de Schaeffer (y algunos otros después de él), caen dentro del estadio de la taxonomía alfa, es decir, se limitan a la descripción convencional e incompleta de especies y grupos de especies.

Es justamente Schaeffer quien comienza la fase de síntesis, esto es, el estadio beta de la taxonomía, al establecer un primer esquema de clasificación en todos los niveles taxonómicos.

Sin embargo, aun en el caso de Schaeffer se siguen estudiando principalmente aspectos morfológicos como la forma de locomoción, la forma de los pseudópodos, el patrón de división nuclear, la forma del quiste y la posibilidad de dimorfismo fenológico.

típico.

A partir de la década de los cincuentas, la sistemática de las amibas se afianza cada vez más en su fase beta. Es precisamente Bovee (1953), quien comienza a tomar en cuenta los aspectos fisiológicos de las estructuras hasta ese entonces descritas.

La importancia de los requerimientos nutricionales - como indicadores de las relaciones taxonómicas entre las amibas y de las relaciones filogenéticas de éstas, fue señalada por Adam sólo hasta 1959 y enfatizada posteriormente por ella misma (Adam, 1959, 1964 a y b ; 1969 y 1974).

Band (1961, 1962), quien ha efectuado estudios nutricionales muy extensos sobre las amibas Limax y en particular cepas de Acanthamoeba rhyssodes Singh y Das, 1970; también ha señalado la importancia taxonómica de los mismos.

De los aspectos de la bioquímica celular el que ha sido más ampliamente estudiado, es el serológico (Sen, Mukerjee y Ray, 1961; Siddiqui y Balamuth, 1965; Adam, 1964 y 1969; Cerva, 1967 y 1973).

Más recientemente Cerva (1967), Willaert et al. (1973) y Willaert (1974, 1976), proponen el estudio inmunológico de las membranas como criterio confiable para la identificación a nivel de especie.

La aplicación de la microscopía electrónica al estu-

dio de las amibas comenzó, en forma importante, con Vickerman -- (1962). En este campo vale la pena destacar, por su trascendencia, los trabajos de Schuster (1963, 1969), Carter (1970), Wi -- llaert y Ray (1973), Martínez et al. (1974), Schuster y Dunneba ke (1974 a y b), Visvesvara y Callaway (1974), Lastovica (1975), Rondanelli et al. (1976), y los más recientes de Carosi et al. - (1977), que en conjunto han proporcionado numerosos datos que en la mayoría de los casos refuerzan los conocimientos procedentes, pero que en otros los contradicen y superan.

Es, por lo tanto, en términos generales, el período - comprendido durante los últimos treinta años el de un estadio beta del conocimiento de las amibas (Corliss, 1962). Sin embargo, no todos los grupos se encuentran igualmente estudiados, de modo que en algunos persiste aún el estadio alfa . En cambio hay algu nos grupos, sobre todo de organismos parásitos en los que la sis temática se halla ya en la etapa gama; este es el caso, por ejem plo, de Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903, especie en la -- que los estudios se encuentran ya a nivel intraespecífico y po -- blacional y son de carácter muy especializado.

Por lo que toca a las dos especies que son el objeto - de este estudio la historia de una de ellas, N. gruberi, se re -- monta a 1841 cuando Dujardin (Page, 1966), describe una amiba pe queña de vida libre y la designa como Amoeba limax. Más tarde - Schardinger en 1899 (Page, 1966), describió la Amoeba gruberi.

Vahlkampff en 1905 (Page, 1966), describió una mitosis atípica en un organismo que él identificó como Amoeba limax. Esta mitosis atípica fue bautizada como promitosis por Nägler en 1909 (Page, 1966).

Aun cuando indistinguibles en su forma trofozoide, con promitosis en ambas, A. gruberi difería de A. limax por su capacidad de transformación ameboflagelar, proceso ausente en esta última.

A. gruberi fue colocada dentro del grupo de los rizo- mastiginos por Awerinzew en 1910 (Willaert, 1976) y por Rafalko - en 1947, (Willaert, 1976). El dimorfismo de estos organismos, ma- nifestado por su capacidad de transformación ameboflagelar, deter- minó durante mucho tiempo la incertidumbre de su clasificación, - ya dentro del grupo de los sarcodarios, ya dentro del grupo de -- los flagelados, Singh(1953), Bovee y Jahn (1966), Page (1966).

Fueron precisamente los trabajos de este último los -- que ubicaron definitivamente a N. gruberi dentro del orden Amoebi da y perteneciendo a la familia Vahlkampfiidae (Cuadro No. 1)

En la clasificación propuesta por Jahn, Bovee y Jahn- (1979), N. gruberi queda ubicada en el orden Eruptida y dentro de la familia Vahlkampfiidae (Cuadro No. 2).

En cuanto a A. astronyxis. su historia se remonta a - Dangeard en 1900 (Page, 1966), quien publicó la primera descrip- ción de una nueva especie en la que se tomaba en cuenta el tipo-

de mitosis, y a la que se denominó como Amoeba hyalina. Esta nueva especie se convirtió luego en la especie tipo del género Hartmannella, creado por Alexeieff en 1912 (Page, 1966; Willaert, 1976). Las especies de este género han agrupado, desde su erección, a amibas pequeñas de vida libre con una mitosis común en la que la envoltura nuclear y el nucléolo desaparecen totalmente.

Han sido los trabajos de Page (1966, 1967, 1974) principalmente y los de Singh y Das (1970), los que permitieron primero redefinir y luego reubicar a A. astronyxis dentro del orden Amoebida, familia Hartmannellidae y género Acanthamoeba (Cuadro No. 2)

En México, los estudios sobre amibas de vida libre y en particular sobre las del grupo limax, han sido esporádicos, escasos y de enfoque muy general. Conviene mencionar en este sentido el trabajo elaborado por López-Ochoterena et al. (1970), en el que se mencionan: Acanthamoeba hyalina Volkonsky, 1931; Amoeba limax Dujardin, 1841; Vahlkampfia guttula Schardinger, 1899, como amibas libres del grupo limax, aisladas de aguas dulces del Distrito Federal y de suelos del Estado de Morelos, México. El de Coronado (1973), que señala haber detectado numerosos organismos amibianos del tipo limax, en las piscinas del Distrito Federal y del Estado de Morelos, México, entre los que se describen: N. gruberi y Hartmannella sp. Alexeieff, 1912 y-

y Vahlkampfia limax.

Otros trabajos en el ámbito nacional son los de Tomasi (1975), quien encontró Vahlkampfia limax y N. gruberi en tinacos de la Ciudad de México; y los de Rico-Ferrat (1975), -- quien menciona en su descripción a Amoeba vesperilio Penard, -- 1905; Acanthamoeba hyalina, Mayorella bigemma Schaeffer, 1926; Mayorella cultura Bovee, 1966; Vahlkampfia limax; y Naeqleria -- sp. Alexeieff, 1912, encontradas en muestras de aguas negras -- de la Ciudad de México.

Así como los estudios realizados por el autor (Rivera et al. 1979) en aguas de grifos de registro del Distrito Federal, en las que se detectó la presencia de Acanthamoeba astronyxis; Acanthamoeba castelani Douglas, 1930; Flabellula mira -- Schaeffer, 1926; Hartmannella exundans Page, 1967; N. gruberi y Vahlkampfia vahlkampfi Chatton, 1910 y finalmente los que corresponden a este trabajo con las ocho cepas regionales de N. gruberi y las cuatro también locales de A. astronyxis. (Tabla VIII).

Como lo señalaría Corliss (1962), el estudio sistemático de las amibas limax se encuentra en México, en la etapa -- alfa de su evolución, en parte por la gran atención prestada -- por parte de los investigadores nacionales sólo a especies patógenas como Entamoeba histolytica, y en parte porque son pocos -- los biólogos o médicos que se dedican a la Protozoología en ---

nuestro País.

OBJETIVO DEL TRABAJO:

El presente trabajo constituye el primer estudio monográfico realizado en nuestro país sobre el grupo de las amibas limax, en particular, sobre las especies N. gruberi y A. -- astronomyxis; y es asimismo el primer paso para lograr la detección e identificación de amibas limax patógenas para nuestra especie, que pudieran existir en nuestro medio.

Las aportaciones que la microscopía electrónica nos permite presentar en el capítulo III, sobre una de las cepas regionales de N. gruberi, constituyen algunos de los aspectos -- originales de este trabajo, que aunados a los de tipo ecológico y patogénico que también se plantean, constituyen un primer acervo de datos dentro del estudio de las características particulares de las cepas locales.

Una de las características de las amibas de vida libre, pertenecientes al grupo limax, que más ha atraído la atención mundial tanto de biólogos como de médicos, es su potencialidad para convertirse en organismos activamente invasores de -- la especie humana y por ende, patógenos para ella. De este modo y en forma progresiva las antiguas especies amibianas consideradas como de vida libre han ido pasando a engrosar las listas de los organismos facultativamente patógenos para el hombre, ocasionándole meningitis, encefalitis o una combinación de

ambas entidades patológicas, u otros trastornos que afectan el funcionamiento de los órganos sensoriales o del aparato digestivo (Fulton, 1970; Willaert, 1976).

La motivación más importante para la realización del presente estudio se desprende de la potencialidad patógena que exhiben algunas especies del grupo limax. En este sentido deseamos consignar que la patogenicidad en el hombre ha sido comprobada ya, tanto para A. astronyxis (Callicot, 1968), como para N. gruberi (Jadin et al. 1972).

Queremos mencionar asimismo, que N. gruberi es desde el punto de vista morfológico, y utilizando la microscopía de luz, indistinguible de su congénere N. fowleri. Carter, 1970, cuya patogenicidad para el hombre fue de las primeras en detectarse (Carter 1968, 1969, 1972).

Consideramos de interés señalar también el hecho de que dos especies tan afines morfológicamente como las últimas que se mencionan, compartan hábitats muy semejantes y tengan asimismo requerimientos nutricionales muy parecidos (Willaert, 1976).

De esto podría desprenderse que ambas especies coexistieran en un mismo hábitat y que si se detecta una de ellas, es factible que se encuentre la otra. Esto último ha sido corroborado ya, entre otros, por Jadin et al. (1971, 1972), por Jadin (1973, 1974) y por Willaert (1974 y 1976).

La microscopía electrónica y la inmunoserología específica son los mejores criterios para distinguir N. gruberi de N. fowleri. (Willaert, 1976; Carosi et al. 1977).

El presente estudio reviste asimismo una importancia de índole epidemiológica y de salud pública para nuestro país, pues constituye la fase preliminar de un estudio a largo plazo, encaminado no sólo a la detección e identificación de cepas de amibas limax facultativamente patógenas para el hombre que pudieran encontrarse en nuestro medio, sino también a la detección y correlación etiopatogénica de casos de meningoencefalitis amibiana primaria que pudieran existir en México, y en los que el diagnóstico no se haya determinado correctamente o en los que, simplemente, aún no se haya definido.

C A P I T U L O I

DIFICULTADES EN LA
TAXONOMIA DE LAS AMIBAS

LIMAX

" No existe nada más difícil, en verdad, que definir
una amiba ".

Dangeard.

Aunque han transcurrido casi ochenta años desde que Dangeard enunciara su célebre frase sobre la dificultad para distinguir a las amibas (Page, 1966), y aun cuando el conocimiento de la biología de estos organismos se ha incrementado enormemente desde entonces, tal sentencia sigue teniendo actualidad para muchos de los especímenes amibianos.

La taxonomía de los protozoarios en general, y la de las amibas en particular es, sin lugar a duda, uno de los problemas más espinosos con que tropieza cualquier principiante estudioso de la Zoología.

Pese a las aportaciones valiosas a lo largo de la evolución histórica de la sistemática amebológica hechas por Schaeffer en 1926 (Page, 1966), Bovee (1953), Bovee y Jahn (1966) Page (1966, 1967, 1974), Singh y Das (1970), Willaert (1974, 1976) y por Jahn, Bovee y Jahn (1979), por mencionar sólo algunos de los más importantes se siguen presentando dificultades serias para establecer una correcta clasificación de los organismos amibianos.

Para caracterizar mejor esta problemática es conveniente plantear las dificultades con las que tropieza cualquier amebólogo que desea hacer una taxonomía adecuada. Estas son fundamentalmente de tres tipos; por una parte están las dificultades inherentes a los propios organismos estudiados; por otro lado se encuentran las dificultades para utilizar las descrip-

ciones, de todo tipo, hechas por distintos autores; y en tercer lugar, las que dependen del mayor o menor desarrollo de las técnicas aplicables a este estudio en las diferentes épocas.

En cuanto a las dificultades planteadas por las amibas mismas, podemos decir que la variación extraordinaria exhibida por estos organismos es la causa más obvia de la dificultad en su identificación.

Una de las formas de variación es la que se presenta dentro de una misma especie. De acuerdo con Dobzhansky (1977), podemos llamar a esta variación, tipológica.

Si analizamos, aun superficialmente, cualquiera de los esquemas taxonómicos propuestos hasta la fecha para las amibas (a excepción de los de Page), nos encontramos con que todos ellos presentan una base más bien tipológica individual que poblacional lo cual, por otra parte, resulta no sólo comprensible sino inevitable, puesto que se están manejando organismos cuya reproducción es asexual y de los cuales, en la mayoría de los casos, no se cuenta con un cultivo de tipo clonal que permitiese disponer de un reservorio genético común, susceptible de ser demostrado. Pero aun suponiendo que se tuvieran clonas bien definidas, sólo podría llegarse en el mejor de los casos, a determinar la variación fenotípica que pudiera ofrecer el genotipo único de la clona, exceptuando por supuesto, las mutaciones espontáneas que pudieran ocurrir.

De lo anterior podemos deducir una primera hipótesis, la que sostiene que la determinación del intervalo de variación dentro de una misma especie es una de las metas más difíciles de alcanzar cuando se trata de organismos asexuales.

Una revisión somera y retrospectiva sobre el campo de la Amebología nos corroborará la veracidad de nuestra hipótesis. De aquí se desprende, asimismo, la importancia de estudiar el mayor número de cepas de una misma especie, recolectadas también - del mayor número posible de regiones geográficas habitadas por - ellas. Es en este caso, donde la bioestadística puede respaldar a la taxonomía.

Concretando un poco más podemos decir que, a mayor número de cepas estudiadas dentro de una misma especie, habrá mayor número de datos disponibles y el análisis además de cualitativo podrá ser cuantitativo y por ello, más confiable. Estamos aludiendo con esto a la taxonomía numérica y por tanto al estado gama de la sistemática amibiana que hasta hoy, es más una alternativa llena de potencialidad que una realidad demostrable.

Todos los esquemas taxonómicos propuestos para las amibas hasta ahora, se fundamentan, en el mejor de los casos, sobre variaciones cualitativas de carácter tipológico, con la consecuente inconfiabilidad relativa que ello puede legítimamente generar entre los estudiosos de las amibas, entre otras, la del propio autor.

No tratamos con esto de cuestionar la utilidad de los esquemas taxonómicos propuestos en el devenir de la sistemática amibiana, simplemente queremos señalar que son susceptibles de mejorarse a través de un análisis intenso de carácter estadístico que hasta ahora ha sido poco explotado. Lo mismo podría decirse para los estudios bioquímicos y ultraestructurales de las amibas.

De hecho, nuestro estudio, siendo de carácter tipológico poblacional, aporta un número nuevo de datos recogidos de varias cepas locales que pasan así a incrementar, si bien modestamente, el acervo mundial de datos, del que se dispone ya hace tiempo, para poder rebasar el estadio beta de la taxonomía amibiana, más particularmente de las del grupo limax.

La problemática que venimos discutiendo se acrecienta aún más cuando se analiza el hecho de que la variación en las amibas no es privativa del nivel de especie o de una población, sino que también se presenta a nivel individual.

Tanto el tamaño como las características morfológicas y funcionales cambian dentro del ciclo vital.

En el caso de las especies estudiadas, N. gruberi y A. astronomyis, la descripción precisa de los diversos estadios del ciclo vital resultó siempre un proceso difícil de realizar, pese a que se disponía de cultivos monoclonales, y representó en todo momento, un escollo importante para una adecuada clasificación -

de fundamento tipológico y poblacional.

Aun en los organismos cuyos estadios juveniles y adultos son semejantes, el individuo está siempre en cambio constante. Generalmente estos cambios morfológicos ocurren en forma gradual, de manera que el individuo no difiere notablemente de un minuto a otro. Es justamente en este punto, en el que las amibas presentan una dificultad tal, que aun bajo condiciones ambientales constantes, exhiben cambios en la forma que son continuos y perceptibles, de modo que un organismo puede aparecer, si lo dejamos de observar momentáneamente, diferente de un momento a otro, aun cuando se trate del mismo espécimen.

Un cambio sutil en las condiciones ambientales determina con frecuencia una modificación drástica en el fenotipo del individuo como sucede en el caso de N. gruberi, capaz de transformación ameboflagelar.

Aparte de la variación propia de los organismos, otra gran dificultad en la identificación de las amibas es la que señalaron Penard en 1902 (Page, 1966), Jepps (1956) y Bovee y Jahn (1966) sobre la naturaleza de la gran mayoría de las descripciones.

Muchas de las descripciones hechas antes de que apareciera la monografía de Schaeffer en 1926 (Page, 1966; Bovee y Jahn, 1966), pecan de gran extensión y prolijidad. Se pueden leer páginas y páginas sin encontrar en ningún momento un diag--

nóstico formal de la especie o especies en estudio.

De hecho, fue Schaeffer el primero que incluyó en sus trabajos la descripción en forma diagnóstica (Page, 1966), inaugurando así el estadio de la taxonomía beta de las amibas. En su monografía sobre amibas marinas y de agua dulce, Schaeffer --presentó" en 1926 (Page, 1966; Bovee y Jahn, 1966), el primer intento real de sistematización de las amibas. La mayor relevancia de su trabajo radica en la importancia que él, dio a la morfología de los pseudópodos y a la actividad de los mismos como --criterios taxonómicos. Recalcó claramente su posición de que -- las amibas deberían ser estudiadas como organismos totales; con sus propias palabras, Schaeffer decía: "estamos clasificando amibas, no núcleos!"

En contraste con la gran extensión de algunas descripciones encontramos en la literatura el extremo opuesto, es decir, la reducción de las mismas, lo cual las vuelve incompletas o vagas. Es el caso, por ejemplo, de las descripciones hechas por Dujardin en 1841 (Page, 1966).

Otra limitación del empleo de las descripciones es la subjetividad, determinada por la enfatización que el observador hace sobre uno o dos aspectos del organismo, o por el prejuicio o inclinación que el investigador puede tener hacia determinada teoría.

Finalmente y como otro tipo de dificultad, está la-

de que muchas de las descripciones realizadas, no son confiables debido a las deficiencias técnicas de la época.

En cuanto a los criterios taxonómicos utilizados por diversos autores en distintas épocas, podemos decir que éstos -- han variado ampliamente pero haciéndose cada vez más precisos y confiables. En este sentido debe mencionarse que fue Penard, -- al comenzar este siglo (Bovee y Jahn, 1966; Page, 1966), quien, -- al predecir la importancia del estudio del núcleo en la taxono-- mía de las amibas, señaló el inicio de la era en la que el estu-- dio citológico y de los ciclos vitales tendría gran relevancia.

Por la misma época en 1899, Schardinger (Bovee y Jahn, 1966; Page, 1966), describió por primera vez la transformación de las amibas en formas nadadoras flageladas, al describir la especie que él llamó Amoeba (ahora Naeqleria) gruberi. En 1900, an-- tes de la predicción de Penard, Dangeard (Page, 1966) publicó la primera descripción de una nueva especie en la que se tomaba en-- cuenta el tipo de mitosis; su Amoeba hyalina, se convirtió poste-- riormente en la especie tipo del género Hartmannella Alexeieff, 1912.

En 1910, Chatton (Singh, 1952), clasificó la mitosis-- en tres tipos:

1. Promitosis.-- como la describió Vahlkampff y la definió Nã-- gler (Page, 1966), en la que el centriolo se hallaba supues-- tamente en el nucléolo, se presentaban masas polares y per--

sistía la membrana nuclear.

2. Mesomitosis.-- que era también intranuclear, ya que persistía la membrana nuclear. En este tipo de mitosis el nucléolo se dispersaba y no formaba masas polares.
3. Metamitosis.-- en la que el centriolo podía ser intra o extra nuclear, la membrana nuclear se disolvía y se dispersaba el nucléolo.

El hecho de considerar la Promitosis y otros tipos de división celular como criterios taxonómicos, fue propuesto en -- 1912 por Chatton y Lalung-Bonnaire (Singh, 1952), y por Alexeieff (Singh, 1952). Los primeros, propusieron por primera vez el género Vahlkampffia para las amibas con división promitótica.

Sin conocer esta propuesta, Alexeieff (Singh, 1952), propuso un mes después la erección de dos géneros: Naeqleria para las Amibas cuya división presentaba masas polares, es decir promitosis, y Hartmannia para aquéllas que carecían de dichas masas. Chatton (Page, 1966), señaló por la misma época en una publicación que Naeqleria y Vahlkampffia eran sinónimos, a lo que Alexeieff concedió, teniendo además que reemplazar el nombre de Hartmannia por el de Hartmannella, ya que el primero correspondía a un gasterópodo.

Por tanto, el uso de las figuras mitóticas como criterio para determinar géneros, data de 1912 cuando se erigieron como tales, los géneros: Vahlkampffia y Hartmannella (Singh, 1952).

Gläser en 1912 (Singh, 1953), manifestó su escepticismo acerca de la descripción de centriolos propuesta por Nägler, y en general, acerca de la presencia de centriolos dentro de los nucléolos de los protozoarios.

Diez años después, Ivanic en 1925 (Singh, 1953), también expresó su duda acerca de la realidad de tales centriolos.

En las últimas décadas, el centriolo se convirtió en el centro de interminables controversias morfológicas y taxonómicas. En relación a la división mitótica semejante a la que se presenta en células de metazoarios, el punto que se argüía con más frecuencia era que las técnicas habían sido tan deficientes que no habían permitido la manifestación de los centriolos y sus ásteres. (Page, 1966).

Una ojeada a la bibliografía de este siglo, nos demuestra que se reportaron centriolos intra y extranucleares por -- Arndt en 1921 y 1924 (Singh, 1952), por Volkonsky, en 1931 (Singh 1953), por Ray y Hayes (1954), y por Pussard (1963, 1964a, y 1964-b).

Rafalko en 1947 (Page, 1966), reportó centriolos extranucleares en Naeqleria gruberi, en contraposición a lo que previos trabajos habían señalado sobre la ubicación intranuclear -- del centriolo.

Otros autores, (Singh, 1952; Pittam, 1963 y Schuster, 1963), nunca encontraron centriolos en la fase trofozoide de Nae-

gléria gruberi, ni siquiera con el microscopio electrónico. Pussard por su parte, resucitó al centriolo como criterio taxonómico para el género Acanthamoeba (Pussard, 1963, 1964a, 1964b), -- sin encontrar eco en otros autores.

Otro aspecto citológico interesante tomado en cuenta a principios de nuestro siglo, por Neresheimer y Swellengrebel, (Page, 1966), fue la supuesta presencia de fenómenos de sexualidad que involucraban la formación de núcleos hijos mediante el paso de cromidias desde el núcleo hasta el citoplasma, convirtiéndose estos núcleos hijos posteriormente en los núcleos de las nuevas células.

Aparte de los estudios citológicos y como resultado del interés en los ciclos vitales de estos animales, los investigadores Walker en 1908 y Puschkarew en 1913, (Page, 1966), también describieron los quistas de estos organismos.

Como corolario podemos decir que los citólogos de principios de este siglo, establecieron la semejanza esencial de la división nuclear entre las amibas y las células de los metazoarios, encontrando algunas diferencias dentro de las primeras que tenían importancia o significación taxonómica o filogenética, y que daban una idea de la variabilidad de los organismos dentro de este grupo.

Los sucesores de la primitiva escuela citológica que acabamos de analizar aplicaron todos los criterios taxonómicos --

ya enunciados y agregaron algunos más.

Así Arndt en 1921 (Page, 1966), reconoció que todas las amibas a excepción de las más pequeñas, podían distinguirse con algo de práctica, tanto en su fase trofozoide como quística. Este autor relegó el tipo de división nuclear como criterio taxonómico a un segundo plano. Con este enfoque, Arndt distinguió varios grupos dentro del género Hartmannella.

Aparte de Arndt, el primer intento para incorporar los quistes dentro de un esquema taxonómico supraespecífico, fue realizado por Volkonsky en 1931 (Page, 1966). Este autor subdividió al género Hartmannella propuesto por Alexeieff, en el de Hartmannella sensu stricto (con husos mitóticos elipsoidales y truncados) y Acanthamoeba (husos mitóticos con extremos cónicos durante la metafase). Volkonsky, también consideró significativo para su clasificación, la forma del quiste.

Uno de los grandes méritos de Volkonsky, fue el de haber sido uno de los primeros investigadores que empleó la técnica de Feulgen para el estudio de las amibas.

Singh (1952), aplicó esta técnica en sus trabajos y Rafalko (1951), la había empleado ya en Naegleria gruberi y Tetramitus rostratus Perty, 1852. Singh (1953), mostró principal interés en el estudio de los procesos mitóticos y sobre esta base dividió a las amibas dentro de su primer intento de esquema taxonómico, en las familias: Schizopyrenidae (con promito

sis) y Hartmannellidae (con mitosis del tipo de la de los metazoarios). Dentro de la primera familia él distinguió géneros con el criterio de la presencia o ausencia de cuerpos interzonales y con la capacidad de efectuar o no la transformación ameboflagelar.

El propio Singh y Das (1970), redefinieron más tarde - el primer esquema taxonómico de Singh (1953), elaborando uno nuevo que, sin embargo, seguía teniendo como principal criterio taxonómico el patrón de división mitótica.

Los trabajos tanto de Volkonsky como de Singh y Das, - fueron por lo tanto, principalmente citológicos, aunque admitían ya el reconocimiento de otros tipos de criterios, especialmente - la morfología del quiste.

Perteneció a Chatton (1953), el mérito de compaginar - el esquema citológico con el sistema de Schaeffer, sin lograr una integración cabal.

Durante los últimos 30 años, la mayoría de los investigadores han basado sus descripciones sobre muchos criterios.

Ray y Hayes (1954), presentaron sus resultados sobre - la investigación de la nueva especie Hartmannella astronyxis, considerados en esa época como los más completos dentro del grupo de las amibas pequeñas. En su diagnóstico consideraron la forma - quística, el ciclo vital, y la mitosis. Concluyeron que la morfología locomotriz no era un criterio taxonómico adecuado.

Adam (1959; 1964a), ha enfatizado la importancia de -

los requerimientos nutricionales y de los tipos serológicos dentro de la taxonomía, pero reconoce asimismo (1964b, 1969, 1974), la utilidad de la forma quística y de la morfología del trofozoí de como criterios taxonómicos.

Pussard (1963, 1964a, 1964b, 1972, 1973), realizó extensos estudios en dos especies de Acanthamoeba, tomando en cuenta la forma locomotriz, la morfología del quiste, y la citoquímica del organismo. Concluyendo que basaba sus fronteras interespecíficas sobre la localización del centrosoma y su actividad -- dentro de la división nuclear. Para este autor, la división nuclear y la actividad del centriolo, son los criterios taxonómicos más importantes, aunque también toma en cuenta, la morfología del quiste.

El movimiento conciliador entre los distintos criterios taxonómicos propuestos desde Arndt en 1921 (Page, 1966), ha contado recientemente con las aportaciones hechas por Page (1966, 1967 y 1974), quien tomó en cuenta los siguientes criterios para enunciar su clasificación: forma de locomoción, forma de los -- pseudópodos, patrón de división nuclear, patrones nutricionales - y serológicos, forma de los quistes, y transformación ameboflagelar.

En este mismo sentido son dignos de mención los criterios de Willaert (1974, 1976), que además de los considerados -- por Page, propone como criterio taxonómico a nivel genérico, el-

estudio inmunológico de las membranas de las amibas de vida libre.

A continuación enunciamos, en orden cronológico, una lista comentada de las principales clasificaciones propuestas desde 1949 hasta la fecha, para las amibas del grupo limax.

Por su interés histórico y por constituir uno de los primeros intentos taxonómicos formales después del elaborado por Schaeffer en 1926 (Page, 1966), señalamos en la tabla No. 1 el esquema taxonómico de T.L. Jahn (1949).

Jahn no considera a los géneros Hartmannella ni Acanthamoeba ni tampoco a la familia Hartmannellidae dentro de su clasificación. Pero por las ilustraciones que presenta en su trabajo puede pensarse que el organismo que él designa como Thricamoeba limax puede corresponder al género Hartmannella del esquema de Page (1967). Asimismo, Vahlkampfia limax resulta ser un sinónimo de Vahlkampfia vahlkampfi Chatton, 1910, nombre este último propuesto por Page (1966, 1967), en su redefinición de los géneros y especies de las amibas limax.

Otros esquemas taxonómicos son los propuestos por Singh (1953) y por Singh y Das (1970), quienes dentro de su clasificación colocan a las amibas del grupo limax, dentro de la clase Rhizopodea, y en el orden Amoebida. (Cuadro No. 1; tablas II y V).

Dentro del contexto enunciado por Singh (1952, 1953) para elaborar su clasificación, existen varios hechos que conviene-

explicar para tener un mejor entendimiento de la taxonomía propuesta por este autor.

En cuanto al uso del carácter de patogenicidad como criterio taxonómico, el descubrimiento de la amiba de vida libre Entamoeba moshkovskii, por Tschalaia en Moscú en 1941 (Singh, - 1953), que desde el punto de vista morfológico es muy semejante a Entamoeba histolytica, le sugirió a Singh que no se justificaba la formación de una familia para incluir dentro de ella, sólo a las formas parásitas. La demostración hecha por Culbertson, Smith, Cohen y Minner (1959), de que la amiba de vida libre Acanthamoeba castellanii Douglas, 1930, (este género se denomina Hartmannella dentro de la clasificación de Singh), es patógena para los ratones y los monos, determinó que Singh encontrara aún mayor dificultad para decidir qué amibas deben considerarse realmente parásitas y cuáles de vida libre.

Es bien conocido que Entamoeba histolytica, considerada siempre como parásito obligado, pueda ser cultivada por tiempo indefinido siempre y cuando reciba el aporte bacteriano necesario, lo mismo que ocurre para las formas de vida libre. El hecho de que esta especie se vuelva invasiva bajo ciertas condiciones no muy bien esclarecidas, no justifica, según Singh, - la creación de la familia Entamoebidae Calkins, 1913, (Singh, - 1963).

Singh (1958), aisló dos cepas no patógenas de Entamoeba

ba histolytica que se tornaban invasoras en el ciego de las ratas si a éstas se les alimentaba con colesterol antes o después de la inoculación de las amibas.

Todo esto determinó que Singh y Das (1970), no considerasen la patogenicidad como un criterio confiable para clasificar las amibas. Otros autores se han unido a esta opinión (Page, 1967; Bovee y Jahn, 1966; Willaert, 1976; Jahn, Bovee y Jahn, 1979).

En cuanto a la posesión de Nebenkörper por algunas amibas, Singh (1953) y Singh y Das (1970), concluyen que este carácter no tiene mucha importancia cuando se intenta efectuar la sistematización del orden Amoebida. Estos Nebenkörper son simbioses asociadas al núcleo de algunas amibas; poseen una estructura polar y tienen en el centro un material filamentoso positivo al Feulgen y dos casquetes polares con estructuras escasas (Grell, 1973).

Igual que Page (1967), Singh (1952, 1953) y Singh y Das (1970), señalan al proponer su clasificación, que los géneros y las especies, han sido creados en su mayoría tomando como criterios la estructura nuclear y la forma de división.

En este sentido uno de los grandes aciertos de Singh, fue reutilizar la reacción de Feulgen (empleada mucho antes por Volkonsky, Page, 1966), para el estudio del núcleo interfásico de las amibas Limax (Singh 1952, 1953, 1963). Con este método-

pueden distinguirse los gránulos de cromatina (positiva al Feulgen), que preceden a la organización de los cromosomas, y de la misma manera una vez finalizada la división nuclear pueden observarse los fragmentos cromosómicos, que finalmente aparecen como los gránulos de cromatina del típico núcleo interfásico. En concordancia con Page (1967), Singh (1953), señaló que el nucléolo (cariosoma), ni contiene cromatina positiva al Feulgen, ni origina cromatina en ningún estadio de la división nuclear.

Tomando en cuenta la forma de división nuclear, Singh (1953), y Singh y Das (1970), dividieron al orden Amoebida en -- familias, de las cuales la Schizopyrenidae y la Hartmannellidae agrupan a la mayor parte de las limax.

En la primera familia, el nucléolo persiste durante todo el proceso de división y se efectúa una mitosis atípica llamada promitosis. Los organismos miembros de esta familia pueden efectuar la transformación ameboflagelar.

En la segunda, la mitosis es igual a la de las células eucarióticas conocidas. El nucléolo desaparece durante las primeras fases de la división y se reconstituye en los núcleos de las células hijas. Los miembros de esta familia no efectúan jamás la transformación ameboflagelar (Tablas II y V).

De todo lo anterior podemos concluir que Singh toma como criterios taxonómicos solamente tres: la estructura nuclear, la forma de división nuclear y la transformación ameboflagelar; -

al mismo tiempo que rechaza la característica de patogenicidad como criterio taxonómico confiable.

Su clasificación de 1953 (tabla II), aunque lógica, resulta incompleta ya que no toma en cuenta la fase quística, los nutrimentos necesarios para cada grupo, la forma de locomoción, la forma de los pseudópodos, ni el patrón serológico de estos animales.

Posteriormente Singh y Das (1970), redefinen tomando en cuenta todos los criterios taxonómicos conocidos, la clasificación del Orden Amoebida enunciada en 1953, de la manera como se presenta en la tabla V.

En esta segunda propuesta taxonómica, Singh y Das incluyen a la familia Endamoebidae Calkins, 1913, que Page había considerado desde 1967, (Page, 1967).

Por su originalidad en cuanto que son los criterios fisiológicos los que se enfatizan más y por el hecho de proponer nuevos nombres aun para los taxones superiores, señalamos parte del esquema taxonómico de Bovee y Jahn (1966), (tabla III) así como la sección relacionada con las amibas limax del esquema más reciente de Jahn, Bovee y Jahn (1979), (tabla VI).

Aun cuando desde 1953, Bovee (1953), enlista una gran cantidad de criterios taxonómicos a considerar: tamaño, contorno durante la locomoción, uroide, forma de los pseudópodos, división nuclear etc., el énfasis lo pone ya desde esa época en los

criterios de tipo fisiológico, sobre todo de los pseudópodos, - estableciendo nuevas clases y órdenes que le llevaran a enun-- ciar junto con Jahn su clasificación de 1966 (Bovee y Jahn, -- 1966).

Tanto en esta clasificación como en la de Jahn, Bovee y Jahn realizada después (Jahn, Bovee y Jahn, 1979), se ob-- serva por un lado, una tendencia a separarse de los criterios-- tradicionalmente aceptados desde 1964 por la mayoría de los au-- tores y que se hallan planteados en la clasificación de Honig-- berg et al. (1964); y por otro, una tendencia novedosa dirigi-- da a la enfatización del uso de las distinciones fisiológicas-- de los organoides locomotores como principal criterio taxonómi-- co a nivel de los taxones superiores.

Lo cuestionable de estos dos planteamientos no es el-- enfoque predominantemente fisiológico de la clasificación, he-- cho que implica un amplio conocimiento de la citofisiología de las amibas, sino la irrupción, dentro de la Amebología, de una nomenclatura abundante, prolija y totalmente nueva que siguien-- do los criterios de Corliss (1962), podríamos calificar de ti-- po "splitter", es decir, que presenta una marcada tendencia a-- sobredividir las diferentes categorías taxonómicas con todo el riesgo que esto implica de generar más confusión de la que ya-- existe en la taxonomía de las amibas.

Sin embargo, el hecho de que estos dos esquemas de -

clasificación caigan en uso o en desuso, dependerá de muchos -- factores, entre otros del tiempo, que permitirá corroborar su -- confiabilidad o rechazarla. Nosotros sólo hemos querido consig-- nar su existencia, señalar sus aciertos y cuestionar algunas de sus posibles desventajas. Como ya lo hemos señalado al princi-- pio de este trabajo, la mayoría de los amebólogos que estudian-- el grupo limax, sigue utilizando la clasificación de Honigberg-- et al. (1964), hasta el nivel de orden y la de Page (1967), pa-- ra las familias, géneros y especies.

Sobre este mismo punto deseamos decir que estamos vi-- viendo tal vez el momento en que se vuelven a conjuntar situa-- ciones propicias que hagan factible, como lo hicieron en 1964, -- la elaboración de un nuevo sistema de clasificación más moderno, más actualizado con respecto al enorme acervo de información -- que sobre la biología de los protozoarios se ha venido acumulan-- do en los últimos quince años; y lo que sería más importante -- que esta clasificación fuese aceptada, si no por todos, sí por la mayoría de los protozoólogos ya que es bien conocida por todos-- nosotros la dificultad enorme para convencer a aquéllos que es-- tán acostumbrados a usar ciertos nombres específicos para las -- amibas, que dejen de hacerlo, dado que tales denominaciones re-- sultan ya incorrectas, ante la luz de la nueva evidencia.

Hemos querido dejar deliberadamente para el final, el esquema taxonómico de Page (1967), pues como ya se dijo, se tra

ta de la clasificación, hoy por hoy, más usada mundialmente para el grupo limax.

Page contempla dentro de su esquema los lineamientos - que sigue la clasificación de Honigberg et al. (1964), precisamente hasta el nivel del orden Amoebida (Cuadro No. 1), de ahí - hacia abajo propone varias familias (Tabla IV).

Page (1966, 1967, 1974) ha intentado en varias ocasiones y con éxito, la unificación de los enfoques citológico, pseudópodo y locomotor que defienden las distintas escuelas, sin - dejar de tomar en cuenta la estructura de los quistes y la transformación ameboflagelar, como criterios útiles. Los criterios - taxonómicos tomados en cuenta por él son los siguientes: la forma de locomoción, la forma de los pseudópodos, el patrón de división nuclear, los patrones nutricionales y serológicos, la forma de los quistes y la capacidad de transformación ameboflagelar.

Otro de los amebólogos modernos para el grupo limax es Willaert (1974, 1976), quien sigue la clasificación propuesta -- por Page, y enfatiza la importancia del criterio inmunoserológico, dándole mayor proyección.

De lo expuesto a lo largo de este capítulo podemos concluir que la taxonomía amibiana se encuentra en diferentes estadios de su evolución histórica que van desde la taxonomía alfa - hasta un inicio de la fase gama; de hecho, ésta resulta ser también la situación de la sistemática de toda la protozoología.

En lo que toca a las amibas, son sin duda los organismos patógenos, los que han acaparado la atención y el interés de los investigadores, y los que cuentan, en consecuencia, con una sistemática más completa (Bovee y Jahn, 1966; Grell, 1973; Jahn, Bovee y Jahn, 1979).

En el caso concreto de las amibas limax, la intensificación de su conocimiento se ha visto favorecida precisamente -- por el hecho de haberse detectado entre ellas algunas especies patógenas para el hombre (Callicot et al. 1968). El estudio intensivo de este grupo, es pues, muy reciente, pudiéndose marcar su inicio a partir de los últimos años de la década de los sesentas del presente siglo, y siendo sus principales promotores, entre otros, Adam (1969), Adam et al. (1974). Bovee y Jahn (1966), Carter (1968, 1969, 1970, 1972), Cerva (1973), Chang (1971, 1974), Jadin (1973, 1974), Jahn, Bovee y Jahn (1979), Page (1966, 1967, 1974), Singh y Das (1970) y Willaert (1971, 1973, 1976).

Pese a todo, los recursos humanos y de otra índole, dedicados al grupo limax, a escala mundial, resultan verdaderamente modestos, si se les compara, por ejemplo, con aquéllos destinados a los estudios de otros protozoarios patógenos, sobre todo en ciertos países en los que, como en el nuestro, la E. histolytica constituye no sólo un problema de salud pública sino también de carácter social y económico.

En cuanto a las dificultades que ofrecen las amibas pa

ra ser clasificadas, aquéllas están siendo cada vez mejor superadas por las técnicas microscópicas de luz y electrónicas, por técnicas de tinción más nítida, por la foto y microcinematografía modernas, que en su conjunto, constituyen una herramienta de trabajo confiable que ha hecho posible un gran desarrollo del conocimiento de los amébedos. En este sentido habría que agregar que los estudios clonales pueden hacerse ahora con más facilidad, aumentándose de este modo la confiabilidad de las observaciones morfológicas y funcionales.

Lo mismo podría decirse de los estudios bioquímicos e inmunoserológicos, y del auxilio que sobre esta misma línea puede prestar la bioestadística, la cual ha empezado a integrarse también, aun cuando lentamente, dentro de la sistemática de estos animales. Esto último permite efectuar estudios no sólo individuales sino también poblacionales, como es el caso de este trabajo.

En lo que respecta a las descripciones hechas por los autores puede decirse que las modernas superan con mucho a las antiguas no sólo por el hecho de contarse hoy con una tecnología más avanzada, sino también porque los amebólogos, sobre todo los de los últimos veinte años, se han preocupado por definir con precisión, ponderar con justedad y explotar el máximo, todos los criterios taxonómicos posibles. Se hace mucha taxonomía beta y se comienza a desarrollar la fase gama en muchos grupos de amibas. Vivimos pues, una etapa de transición hacia una

taxonomía integral cuyas bases fueron cimentadas por los autores de las clasificaciones que hemos consignado, y que por ello pueden considerarse como los legítimos hacedores de la sistemática amibiana de hoy y los precursores de la de mañana.

En el caso particular de este trabajo se tomaron en cuenta los siguientes criterios taxonómicos para la diagnosis de ambas especies: forma de locomoción, forma de los pseudópodos, el patrón de división nuclear, la forma de los quistes y la capacidad de transformación ameboflagelar, que son los considerados por Page (1967), a los que agregamos los estudios con microscopía electrónica de transmisión en la fase trofozoide de una de las especies y el análisis bioestadístico poblacional de cien especímenes de cada una de las doce cepas clonales, con obtención de medias, intervalos de variación y análisis de varianza.

C A P I T U L O I I

MATERIAL Y METODOS

" Todo investigador, yo pienso,
se acuerda -como de su primer
amor- de su primer contacto -
con una verdad nueva, por mo-
desta que ésta hay sido "

Rostand.

I.- RECOLECCION.

1.- Muestra del suelo: se muestreó del suelo de los jardines de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales " Zaragoza ", en el mes de enero de 1976. La muestra se depositó en vaso de precipitado y se le añadieron 100 C.C. de agua destilada.

2.- Muestra del río Churubusco, Coyoacán, Distrito-Federal: se realizaron cuatro muestreos en febrero, marzo, abril y mayo de 1976, utilizando una jeringa asepto.

El muestreo se hizo a partir de las partes quietas y fangosas de las márgenes del río.

La temperatura promedio del agua del río fue de 15°C y el pH osciló entre 6 y 7.

3.- Muestras de las piscinas: se muestrearon las piscinas de seis centros deportivos de la ciudad de México (Tabla VII). El muestreo se realizó durante los meses de junio a noviembre de 1976.

4.- Muestras de grifos: se hicieron tres tomas de los grifos de la Facultad de Medicina (Universidad Nacional Autónoma de México), durante enero de 1977 y del Hospital Infantil de Xochimilco (Secretaría de Salubridad y Asistencia) durante febrero de 1977 y dos tomas de los grifos del campus I,-

de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Zaragoza, en marzo de 1977. Cada toma fue de 5000 C.C..

II.- FILTRACION.

Las muestras procedentes de piscinas y grifos fueron sometidas a un proceso de filtración, utilizando una malla de arena blanca, tipo Ottawa, No. 40, formando un lecho de 4 cms, de longitud y con un diámetro de 1.5 cms., que se colocó en el cuello de un embudo de filtración con capacidad de 500 C.C.. La filtración se facilitó con una bomba de vacío, Welch, cuya presión varió de 5 a 15 mm. de mercurio. Después de lavado el interior del embudo con agua destilada (100 C.C.), el contenido retenido en la malla se utilizó para las observaciones y siembra.

III.- CEPAS ESTUDIADAS.

Las doce cepas que son el objeto de estudio de este trabajo fueron recolectadas de su hábitat natural (suelo y río), y artificial (grifos y piscinas) por el autor. En la tabla VIII aparece un listado de las cepas, su sitio de recolección, el tipo de cultivo utilizado y la temperatura de incubación.

IV.- CULTIVO IN VITRO.

El estudio biológico y estadístico de las amibas, requiere su obtención en grandes cantidades, por ello los organis-

mos se cultivaron en medio de agar a base de Bacto-agar (Difco) en proporción de 1.5 %. Finalmente las cepas fueron mantenidas en agar no nutritivo sobre el cual se esparció Escherichia coli no patógena.

Todas las transferencias a cultivo nuevo o para observación se hicieron empleando agua destilada.

Las amibas crecieron en cajas de Petri de 19 cms. de diámetro. Los cultivos se mantuvieron a incubación a 25 °C y 37 °C , para lograr, en caso de haberla, la selección de las cepas facultativamente patógenas.

La Escherichia coli fue mantenida en un medio de cultivo de agar eosina, azul de metileno, y la cepa fue donada por la sección de Infectología del Hospital General de la Secretaría de Salubridad y Asistencia. Las siembras se realizaron inmediatamente después de la filtración, en agar no nutritivo esterilizado a 240 °C., durante 15 min., en campana estéril de aspiración con campo asimismo estéril. El crecimiento amibiano fue observado, periódicamente, cada 5 días.

V.- CRISTALERIA.

La cristalería utilizada en los cultivos debe ser químicamente neutra, debe limpiarse y esterilizarse fácilmente y -- permitir la observación de las amibas in situ con la ayuda del -- microscopio invertido.

Se han utilizado embudos de filtración de vidrio de - 500 C.C. matraces Erlenmeyer de 2000 C.C., vasos de precipitado de 25,50, 100 y 250 C.C., así como pipetas Pasteur esterilizadas y pipetas de 1 y 5 C.C. El material de cristalería se esterilizó a 170°C. durante 1 hora.

VI.- AISLAMIENTO.

Después de observar la multiplicación amibiana en el microscopio invertido, se procedió a clonar tanto a partir de un quiste como de un trofozoito, aislados en ambos casos en un bloque de agar que se corta y se transfiere a un nuevo cultivo, también con agar y E. coli (Tabla VIII).

VII.- MORFOLOGIA Y BIOLOGIA.

VII.I Observaciones en microscopio fotónico: se utilizó fotomicroscopio Zeiss, de contraste de fases, microscopio Zeiss invertido y fotomicroscopio Reichert, modelo Zetopan con objetivos de 10x, - 40x, 60x y 100x.

La medición de los quistes, de las formas ameboides y flageladas fueron hechas a 100x con un micrómetro ocular 6x.

VIII.- INDUCCION DE LA TRANSFORMACION AMEBO-FLAGELAR.

Este fenómeno se indujo en las muestras sometidas a -

incubación utilizando agua destilada en proporción 1:1 y haciendo observación continua a veces durante 40 mins. otras veces 4 horas.

En los cultivos de agar se lavó la superficie con agua destilada y se procedió a observar. En las muestras procedentes del suelo y del río la transformación y la reversión ameboflagelares no tuvieron que inducirse pues se presentaron espontáneamente y fueron detectadas durante observaciones efectuadas con otros fines.

IX.- CITOQUIMICA.

a) Preparación en fresco:

Se emplearon los siguientes colorantes vitales: Sudán negro, verde de Jano y verde metilo.

Los colorantes se emplearon a diluciones elevadas -- (más de 1:25,000) pues las habitualmente sugeridas (1:10,000) -- destruían la arquitectura celular.

b) Preparaciones fijas:

Las preparaciones frescas fueron fijadas mediante la técnica de Nissebaum, (Nissebaum, 1953) que contiene solución saturada de cloruro de mercurio, ácido acético glacial, formalina comercial y alcohol butírico terciario en proporción 10:2:2:5.

El fijador se goteó sobre los portaobjetos que conte-

nían una gota de la muestra. Este método no sólo es rápido (30 seg, aproximadamente) sino que también da una apariencia muy natural al núcleo y al citoplasma.

Se siguió el método de tinción del ácido peryódico de Schiff para polisacáridos.

X.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Los organismos de la cepa Z-1 de N. gruberi se concentraron a presión reducida de 5 mm. de Hg. con Arena de Ottawa - malla 40, (previamente lavada y esterilizada y 5 ml. de agua -- destilada) a temperatura ambiente con observaciones periódicas-- hasta comprobar la aparición de las formas trofozoides. Este -- material filtrado se fijó con glutaraldehído al 3 % en amorti-- guador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, a temperatura ambiente duran-- te dos horas al cabo de las cuales se concentró el material por centrifugación a 5,000 r.p.m. por 3 minutos; se lavó para elimi-- nar el fijador.

Se postfijó en OsO₄ al 2 % en amortiguador de fosfa-- tos 0.1 M, pH 7.4, por dos horas, este material se lavó 4 veces cada media hora con medio de lavado que contiene sacarosa 0.25-- M en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Las muestras se -- deshidrataron en alcohol etílico (del 30 % al 100 % de concen-- tración con dos cambios de 15 minutos cada uno). Antes de rea-- lizar el cambio se concentró el material por centrifugación. Se

infiltró en Epon 812 diluido 1:1 con óxido de propileno durante 48 horas. La inclusión se efectuó en Epon 812 según Luft, --- (1961) en cápsulas BEEM a 60 °C por 48 horas. Se obtuvieron secciones finas en el ultramicrotomo Reichert-Um03 equipado con cuchilla de diamante (E.I. Du Pont de Nemours Wilmington Delaware USA); las secciones fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y observadas en el microscopio Electrónico (JEOL 100B) operado a 60 Kv. con apertura de 80 micras.

XI.- ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO.

Se obtuvieron las medias y los intervalos de las estructuras que fueron medidas en las cepas de las dos especies:- Se obtuvo también la media de medias para cada especie y los intervalos de variación correspondientes para esos mismos datos - en ambas especies, esto último mediante un análisis de varian--za.

C A P I T U L O I I I .

RESULTADOS .

PRIMERA PARTE :

ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO
DE LAS FASES TROFOZOIDE Y QUISTICA
DE N. gruberi (OCHO CEPAS REGIONALES);
Y DE A. astronyxis (CUATRO CEPAS REGIONALES)

" Las amibas, orden dentro del caos " .

Sandon.

Aun cuando el estudio de las fases del ciclo vital de N. gruberi y de A. astronyxis, ha sido realizado previamente con diferentes enfoques y por diversos autores, entre los que podemos mencionar como más importantes a Adam (1964b), Adam y Blewett (1974), Armstrong et al. (1967), Balamuth et al. (1967), Boeve (1953), Carosi et al. (1977), Carter (1970, 1972), Fulton, (1970), Lastovica (1975), Martínez et al. (1974), Page (1966, 1967, 1974), Pussard (1973) Ray y Hayes (1954), Schuster (1963, 1969), Singh (1952, 1953, 1963), y Willaert (1971, 1974, 1976); - hemos querido efectuar este mismo estudio en las cepas aisladas por nosotros dándole por un lado, el enfoque descriptivo de la morfología y de la fisiología, y por otro, el apoyo estadístico elemental que permite el trabajar con cepas monoclonales. -- Nuestra intención ha sido comparar nuestros resultados con los que ya ofrece la literatura mundial al respecto, ya sea para corroborarlos, como ocurrió con la mayoría de nuestros hallazgos con microscopía de luz, ya para aportar datos novedosos como sucedió con nuestros resultados del estudio de la fagocitosis durante la transformación ameboflagelar y con los que nos proporcionó la microscopía electrónica.

Nuestras observaciones se han realizado en cepas mantenidas en cultivo monoclonal con temperaturas diversas de incubación (Tabla VIII). Ello implica que hemos realizado un estudio de la variación tipológica poblacional para cada especie. Las mediciones que se mencionan a lo largo de este capítulo y en --

las tablas correspondientes, se refieren a la media y al intervalo de variación de las estructuras estudiadas en cada especie. - Las afirmaciones hechas son asimismo, producto de nuestras observaciones directas al microscopio y confirmadas por el estudio de tallado del material fotográfico obtenido de los organismos en sus distintas expresiones fenotípicas.

Descripción de la especie Naeqleria gruberi:

Clase Rhizopodea von Siebold, 1845.

Subclase Lobosia Carpenter, 1861.

Orden Amoebida Kent, 1880.

Familia Vahlkampfiidae Jollos y Lalung-Bonnaire, 1912.

Género Naeqleria Alexeieff, 1912 emend. Calkins, 1913.

Especie N. gruberi Schardinger, 1899. (cepas : Z; Co-1; Pi-1; Pi-2; Pi-3; Pi-4; Fm-1 y Z-1. (Para la descripción de las cepas, ver tabla VIII).

Diagnosis.-

La locomoción de estas amibas es monopódica, aunque a veces pueden presentar emisión múltiple de pseudópodos; su desplazamiento se realiza mediante pseudópodos anchos, hemisféricos e hialinos. Estas erupciones pseudopódicas pueden formarse en cualquier zona de la superficie celular, pero son más frecuentes en las zonas anterior, posterior y central. Lo cual determina que el recorrido efectuado por estos animales se realice siguiendo un curso más o menos sinuoso. Podemos decir por analogía, --

que las amibas de esta especie serpentean cuando se desplazan.

Su extremo anterior es por lo general más ancho que su -- extremo posterior. En la mayoría de los casos hemos podido ha-- llar un uroide bien definido. Durante su locomoción activa, su longitud equivale a tres veces su anchura. Son comunes las formas irregulares. Los animales observados son mononucleados, con un núcleo de cara abierta que permite observar gránulos de croma tina próximos a la hoja interna de la membrana nuclear. Así có-- mo un nucléolo prominente denominado también cariosoma. Se han observado individuos con 1, 2 y a veces 3 vacuolas contráctiles, siendo más frecuentes los primeros. Las vacuolas fagocíticas -- son pequeñas y contienen una o varias bacterias. El citoplasma-- es muy refringente por la gran cantidad de gránulos que presenta. El intervalo de variación para la longitud de una amiba exten-- dida, varía de 25.7 a 45.7 micras. El diámetro del núcleo tiene -- asimismo un intervalo de variación de 3.2 a 5.1 micras, mientras que el del nucléolo varía de 2.8 a 2.9 micras.

Hemos verificado asimismo que la reproducción se realiza por fisión binaria, mediante una mitosis atípica denominada pro-- mitosis, hallazgo que coincide con lo descrito por Singh (1952,-- 1953), Singh y Das (1970) y Page (1966, 1967).

Forma trofozoide:

La forma trofozoide común de Naeqleria gruberi es la ame-- boide, ya que la forma flagelar sólo se presenta en respuesta a --

cambios en el medio ambiente, y es una fase pasajera que generalmente revierte al estado ameboide. Aunque las amibas de esta especie junto con otras de la familia Vahlkampfiidae caen dentro de la denominación de amibas limax, Naeqleria gruberi sólo se presenta en forma de babosa en contadas ocasiones durante su desplazamiento. Naeqleria gruberi se caracteriza por emisión de pseudópodos no sólo anteriores sino también laterales. La forma extendida de Naeqleria gruberi tiene una proporción longitud/ancho de 3:1, pero en los individuos que se están desplazando muy activamente puede no encontrarse esta proporción. Por lo general, la amiba es casi tan larga como ancha.

Cuando la amiba no se desplaza emite constantemente pseudópodos que modifican su forma de modo continuo, lo cual determina que puedan observarse contornos muy variados, siendo uno de ellos, la forma de babosa.

La parte caudal de la amiba es redondeada y en términos generales se puede apreciar el uroide.

Aunque estas amibas se desplazan por una locomoción monopódica, excepto cuando cambian de dirección, su locomoción no es en línea recta como sucede en algunas especies del género Hartmannella. Más bien ocurre mediante la formación de pseudópodos anchos e hialinos que se forman en su parte anterior. Los pseudópodos anteriores se forman a uno y otro lado de una línea central, de manera que la amiba sigue un curso sinuoso; aunque cual

quier pseudópodo de formación lateral puede fundirse con el anterior y determinar un cambio de dirección (Lámina I figs. 1 - 4).

El endoplasma granuloso sigue el camino que le traza el ectoplasma hialino. El proceso de formación de pseudópodos es casi siempre euptivo y ocasionalmente tan explosivo que el ectoplasma hialino se desliza sobre y por debajo del endoplasma granuloso, entre el tubo en fase de gel y la membrana plasmática. La amiba puede cambiar de curso al seguir la dirección de uno solo de los pseudópodos anterolaterales, sin compensar esta desviación, con la formación de otro pseudópodo en sentido contrario. Un cambio de dirección de 90° sólo lo logra la amiba al formar un pseudópodo inmediatamente por detrás del anterior y perpendicular al eje anteroposterior mayor del animal. El pseudópodo de Naeqleria gruberi puede describirse como un pseudópodo ancho, -- hemisférico e hialino.

El tamaño del trofozoíto varía de 25.7 a 45.7 micras. Dado que las amibas están constantemente cambiando de forma y dado que casi siempre tratan de medirse estos animales cuando están extendidos, las medidas muestran más bien el posible intervalo de longitud, que el tamaño constante de un individuo. Esto dificulta la obtención de la media en cuanto a la longitud.

Por lo general cada individuo tiene un núcleo que a su vez posee un nucléolo o cariosoma central. El núcleo es de cara abierta y el material cromosómico mostrado por la técnica histo-

lógica parece estar localizado entre la membrana nuclear y el nucleólo, no pudiendo distinguirse en el organismo viviente. Tanto el núcleo como el nucleólo pueden deformarse cuando la célula se desplaza. Durante la locomoción el núcleo se halla generalmente colocado en la región más anterior del endoplasma granular. - El diámetro del núcleo varía de 3.2 a 5.1 micras. Los organismos de la especie N. gruberi pueden mostrar una o dos vacuolas pulsátiles. Una amiba puede tener una sola vacuola pulsátil durante algún tiempo y posteriormente presentar dos.

La vacuola se localiza en la mayoría de los casos en la parte más posterior del endoplasma, aunque a veces puede hallarse en la parte más anterior. Si una célula contiene dos o tres vacuolas pulsátiles éstas no se vacían simultáneamente. Cuando la amiba posee una sola vacuola, ésta se contrae durante la sístole en un número mayor de veces por minuto que en el caso de que existan dos. En esta última situación, la contracción de cada una de las vacuolas es más espaciada. El diámetro máximo de la vacuola pulsátil medido inmediatamente antes de la sístole, varía de 1.4 a 5.2 micras.

Las vacuolas digestivas son difíciles de observar una vez que se ha ingerido la partícula alimenticia, pero puede verse su formación en el momento mismo en que la amiba efectúa la fagocitosis. Estas vacuolas digestivas no suelen ser muy grandes y albergan unas cuantas bacterias sino es que una sola. Nosotros hemos observado, con el microscopio de luz, el proceso de fagoci

tosís y, a diferencia de lo que ocurre en otros tipos de amibas, en las que puede observarse claramente a los pseudópodos englobando a la partícula alimenticia, en el caso de Naegleria gruberi la amiba se acerca por uno de los bordes a la bacteria y se establece una interfase entre la membrana citoplásmica de la amiba y la pared bacteriana. Poco a poco los límites entre la bacteria y la amiba se van haciendo menos conspicuos hasta que la bacteria queda rodeada de un halo con características semejantes a las que posee el ectoplasma. Finalmente la bacteria queda incluida dentro del endoplasma granular y pierde su definición como partícula aislada para confundirse con la morfología típicamente granulosa del endoplasma amibiano. Este tipo de fagocitosis ha sido denominada por circunfluencia, por Rhumbler, desde 1910 (Jeon, 1973).

Sólo con el microscopio electrónico pueden evidenciarse con claridad los pseudópodos durante la fagocitosis (lámina X).

Además del núcleo, de las vacuolas contráctiles y de las vacuolas digestivas, las únicas inclusiones detectables con el microscopio ordinario y de contraste de fases, fueron una gran cantidad de gránulos que con frecuencia son muy refringentes y amarilloverdosos. Cuando estos gránulos aparecen como refringentes, no sólo pueden observarse en el endoplasma sino también circundando la membrana nuclear. Los gránulos distribuidos en el endoplasma se deslizan juntos con éste durante el movimiento pseudopódico, pero los que están alrededor de la membrana nuclear

permanecen fijos. Todos estos gránulos se tiñen fuertemente con verde Jano lo que nos permite pensar que se trata de mitocondrias.

Naeqleria gruberi no posee una forma pelágica definida y cuando se le suspende en un medio líquido continúa emitiendo pseudópodos en varias direcciones y finalmente sedimenta, adoptando la forma esférica (lámina II fig. 1).

Se hicieron pruebas citoquímicas con los trofozoides para determinar la naturaleza de los gránulos citoplásmicos. Ninguno de los gránulos se tiñó con la técnica de P.A.S. (ácido periódico de Schiff), aunque el contenido de algunas vacuolas digestivas resultó ser fuertemente positivo con esta técnica. La superficie celular resultó P.A.S. positiva en la mayoría de los casos indicando la presencia de polisacáricos en ella. Con el Sudán negro muchos gránulos citoplásmicos, incluidos algunos de los perinucleares, son positivos; también lo son los perinucleolares. Con el azul de metileno y el verde de Jano se encontraron gránulos citoplásmicos positivos a estos colorantes y con el verde de metilo se tiñó intensamente el nucléolo y el contenido de algunas vacuolas digestivas.

Quistes:

Después de 48 horas de realizada la siembra en agar con bacterias se apreciaron no sólo formas trofozoides sino también abundantes quistes. A medida que avanzaron los días de incubación, el número de quistes se incrementó y simultáneamente dismi-

nuyó el número de formas trofozoides.

Los quistes observados tienen una pared compuesta por -- dos hojas: una interna gruesa más o menos translúcida y otra externa más gruesa y muy densa. Dentro del quiste el citoplasma exhibe esférulas densas. En muchos de los quistes más maduros pueden observarse los tapones a nivel de los poros. Después de tres días de incubación la mayoría de los quistes son completamente maduros. (lámina III, figs. 1 - 4).

Las amibas de la especie gruberi pueden formar quistes aislados, pero es frecuente que muchos de ellos, tanto en la naturalaleza como en medio de cultivo, se agrupen formando conglomerados.

El quiste de Naegleria gruberi tiene características que lo distinguen de otros y constituye un medio de diagnóstico fá-cil cuando se encuentran quistes de otros géneros. La pared -- quística es lisa. El quiste es generalmente esférico u ovoide, a menos que se trate de conglomerados en los cuales, por razo--nes de presión, presentan el contorno deformado. La pared está constituida por una hoja interna gruesa y por una hoja externa, aproximadamente con el doble de espesor de la interna. La hoja interna suele ser translúcida aunque a veces aparece muy refrin-gente, mientras que la hoja externa es más densa y sólo visible a grandes aumentos. Sobre la hoja externa se pueden observar - engrosamientos distribuidos irregularmente por toda la circunfe

rencia del quiste. Estos corresponden a los tapones que cierran los poros por donde exquista la amiba. La célula enquistada es casi siempre uninucleada. La división celular no se observa durante la fase quística y en caso de aparecer quistes con dos o tres núcleos, se trata de individuos que ya los tenían así desde la fase trofozoide. El núcleo del quiste se halla casi siempre rodeado de una monocapa granulosa. Este tipo de gránulos también puede observarse como en la fase trofozoide, dentro del citoplasma.

La pared gruesa y refringente así como la capa perinuclear de gránulos, hacen del quiste de Naeqleria gruberi una estructura fácilmente identificable. El diámetro de los quistes varía de 9.0 a 15.6 micras. El diámetro de los núcleos del quiste varía de 2.3 a 3.6 micras, difiriendo poco del diámetro de los núcleos de la fase trofozoide. Por otra parte, el diámetro del nucléolo es siempre menor en el quiste que en el trofozoide, variando de 0.9 a 2.5 micras.

El exquistamiento se realiza fácilmente. Naeqleria gruberi puede exquistar si se la coloca en un medio líquido, por debajo de un cubreobjetos. La célula que sale de un quiste lo hace siempre en forma ameboide. La salida se verifica a través de uno de los poros después de que los tapones se han disuelto. La amiba sale por un poro, pero, a pesar de esto, se disuelven todos los tapones. Es muy probable que los tapones sean disueltos

por enzimas digestivas del trofozoide que está exquistando. Los poros vacíos pueden presentar contorno redondeado o elíptico y su diámetro siempre es menor de 1 micra.

Los estudios citoquímicos proporcionaron alguna información sobre la composición de la pared quística. Mediante el método de P.A.S., la hoja interna de la pared resultó fuertemente positiva (con gran cantidad de polisacáridos), en cambio la pared externa permaneció incolora. Los tapones se tificaron inclusive más intensamente que la pared con esta técnica, esto debido muy probablemente a su mayor contenido de polisacáridos. Por esto mismo pudieron contarse fácilmente en preparaciones teñidas con P.A.S., mostrando cada quiste de 2 a 9 tapones. Con el Sudán negro pudo demostrarse la presencia de lípidos en la hoja interna de la pared. (lámina III fig. 3).

Los gránulos citoplásmicos de los quistes resultaron negativos al ser tratados con verde de Jano. Con el Sudán negro no se detectaron los pequeños gránulos acumulados alrededor del núcleo.

Hasta donde sabemos, no existen publicaciones que hayan referido si el metabolismo del animal enquistado es aerobio o anaerobio. Nosotros hemos encontrado que en los cultivos sometidos a anaerobiosis parcial, la fase trofozoide es escasa, mientras que las formas quísticas son muy abundantes.

Identificación:

La identidad específica de los animales estudiados parece

cierta si la comparamos con la especie originalmente descrita -- por Schardinger en 1899, como Amoeba gruberi (Page 1966; Bovee y Jahn, 1966).

OBSERVACIONES EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DEL TROFOZOITO DE Naegleria gruberi (cepa Z - 1).

El trofozoito: El examen general de una serie copiosa de microfotografías nos permitió detectar una serie de características ultraestructurales comunes a todas las amibas examinadas, que señalamos en la lámina V. Es difícil distinguir entre el ectoplasma y el endoplasma, excepto en aquellas zonas desprovistas de organoides (Lámina IX, fig. 2).

Membrana celular.

La membrana celular de esta cepa de N. gruberi se presenta tal y como ha sido descrita por Robertson (1959), es decir, -- como unidad de membrana, constituida por dos capas densas a los electrones, que limitan una tercera capa intermedia, transparente a los electrones, (Lámina VI, fig. 1 : Lámina VII, fig. 1; Lámina IX, fig. 2).

La superficie de la membrana presenta con frecuencia diferentes estadios de los procesos de endocitosis, (Lámina X). Algunas porciones de la membrana se invaginan, y luego las proyecciones de esta invaginación se fusionan para originar, en el citoplasma una o varias vacuolas cuyas paredes no son sino derivados de la membrana celular (Lámina VI, fig. 1).

No hemos podido detectar sobre la superficie externa de la membrana celular el revestimiento o cubierta celular denominada glucocálix.

Matriz citoplásmica.

En el citoplasma se encuentran los siguientes organoides: núcleo, nucléolo, envoltura nuclear, mitocondrias, ribosomas, lisosomas, vacuolas pulsátiles, retículo endoplásmico y glóbulos lipídicos, (lámina V).

Vacuolas digestivas.

Estas vacuolas se hallan limitadas por una membrana simple. En su interior se encuentran residuos de las bacterias que constituyen el alimento de las amibas en el cultivo. (Lámina VI, fig. 2; Lámina VIII, fig. 2).

Algunas de estas vacuolas exhiben una estructura laminar compleja.

Aparato de Golgi:

La estructura bien definida de este organoide nunca se encontró en la cepa estudiada, sin embargo se identificaron estructuras membranosas que recuerdan, por su aspecto, las cisternas del aparato de Golgi.

Vacuolas pulsátiles.

Puede ser una sola o varias de estas vacuolas. Asociadas a la vacuola principal, nosotros detectamos numerosas vacuolas --

muy pequeñas entre las que se encontraban mitocondrias. Esta asociación de vacuolas pequeñas y mitocondrias junto a la vacuola -- contráctil, es un hallazgo común dentro del grupo de las amibas -- grandes como A. proteus Leidy, 1879, (Andresen, 1973), pero no se había descrito hasta ahora para las amibas limax, en particular, -- N. gruberi. Los amebólogos llaman a esta región especializada -- del citoplasma espongioma (Andresen, 1973). De modo que la cepa estudiada por nosotros difiere de sus congéneres descritos en el extranjero por la posesión de un espongioma.

El contenido de la vacuola pulsátil es transparente a los electrones y su límite es la unidad de membrana simple. (Lámina IX, fig. 1).

El núcleo.

El núcleo es de cara abierta y muy prominente, posee un nucléolo centralo cariosoma muy conspicuo constituido por gránulos gruesos densos a los electrones. Dentro del nucléolo se observa, -- a veces, un espacio menos denso, (Lámina VII, fig. 1; Lámina IX -- fig. 1; Lámina X).

La envoltura nuclear está constituida por dos hojas separadas entre las que se encuentra la cisterna perinuclear transparente a los electrones.

Los poros nucleares se pusieron fácilmente en evidencia. -- (Lámina VIII, fig. 1; Lámina IX, fig. 1).

Mitocondrias.

Los organoides citoplásmicos más prominentes en estas amibas son quizá, las mitocondrias (Lámina VI, fig. 1; Lámina VIII, fig. 1; Lámina IX, fig. 1).

Su forma es variable pero se detectan las típicas en forma de clava con áreas densas en la matriz (Lámina IX, fig. 2). - Se hallan mitocondrias cercanas a glóbulos lipídicos y otras en íntima proximidad con el retículo endoplásmico rugoso y a veces -- con la membrana nuclear (Lámina X).

Retículo endoplásmico rugoso.

Siempre presente y relacionado a veces con las mitocondrias (Lámina VII, fig. 1; Lámina VIII, fig. 2).

Retículo endoplásmico liso.

Siempre presente en la cepa estudiada.

Inclusiones de lípidos. (Lámina VI, fig. 1).

Siempre presentes, pueden formar una corona perinuclear, - que a su vez, se halla, en algunos casos relacionada con el retículo endoplásmico rugoso.

Peroxisomas.

No se detectaron en los especímenes observados.

Partículas semejantes a virus.

No se observaron en las cepas estudiadas.

Ribosomas.

El citoplasma se halla repleto de ribosomas tanto libres- como también asociados al retículo o a la hoja externa de la membrana nuclear. (Lámina VI, fig. 2; Lámina VII, figs. 1 y 2; Lámina VIII, figs. 1 y 2).

Descripción de la especie Acanthamoeba astronyxis.

Clase Rhizopodea von Siebold, 1845.

Subclase Lobosia Carpenter, 1861.

Orden Amoebida Kent, 1880.

Familia Hartmannellidae Volkonsky, 1931.

Género Acanthamoeba Volkonsky, 1930.

Especie A. astronyxis Ray y Hayes, 1954. (Cepas: Cy-1; Al-1; Al-2 y M-1. (Para la descripción de las cepas ver tabla VIII).

Diagnosis.

Durante su locomoción estas amibas son más largas que anchas y con frecuencia su longitud es tres veces mayor que su anchura. Por regla general la parte más ancha de la forma alargada corresponde al extremo anterior del animal. Su extremo anterior con frecuencia se presenta en forma irregularmente truncada, mientras que su extremo posterior es generalmente redondeado. -- Presentan dos tipos de pseudópodos: un lobópodo hialino, con un espesor ligeramente más delgado que la zona endoplásmica; y un grupo de proyecciones digitiformes hialinas más cortas (acantopodios) que se forman sobre el borde anterior del pseudópodo prin-

cial, en forma individual o agrupados en pares o tríos y que se reabsorben dentro del pseudópodo principal o pasan hacia atrás a lo largo de la superficie de la amiba. Estos acantopodios pueden ser finos y coniformes o muchas veces, sobre todo adelante, presentarse gruesos y redondeados.

La amiba se desplaza hacia adelante por el flujo del ectoplasma del lobópodo sin que aparezca erupción brusca alguna. El animal cambia de dirección mediante la extensión de su pseudópodo anterior dirigido hacia un nuevo punto. En el extremo anterior la región ectoplásmica forma una banda ancha y su espesor es más o menos la mitad de su anchura. El extremo posterior es redondo y mucho más estrecho que el anterior y a veces se hallan adheridos a él algunas bacterias. En ocasiones pueden observarse algunos acantopodios en el extremo posterior.

Estos animales poseen un núcleo vesiculoso colocado generalmente en el extremo anterior de la región endoplásmica. Tienen también una vacuola pulsátil prominente que suele formarse por coalescencia de dos o más pequeñas vacuolas y que vierte su contenido por el extremo posterior. La alimentación se realiza mediante la formación de vesículas fagocíticas que presentan la forma de una copa y que se forman a los lados y atrás del animal. Las vacuolas digestivas son muy conspicuas. Pueden encontrarse con frecuencia pequeños gránulos refráctiles de color amarillento en el endoplasma.

La longitud de la amiba completamente extendida puede va-

riar de 26 a 38.4 micras. El diámetro del núcleo va de 5 a 8.2 micras y el del nucléolo varía entre 2.9 y 5.4 micras.

La forma pelágica es irregularmente esférica y presenta - finos acantopodios en su superficie. No detectamos formas flagelares.

La pared del quiste está compuesta por un ectoquiste y un endoquiste. El primero de forma más o menos circular y con pliegues mal definidos. El endoquiste es generalmente estrellado con rayos redondeados y cónicos en uno o más planos. Los quistes son biconvexos. El ecto y el endoquiste, se ponen en contacto con los extremos de los rayos del endoquiste. Los rayos del endoquiste son por lo general numerosos. Los quistes son generalmente mononucleados y dentro de ellos no se realiza la división. El citoplasma del quiste presenta gránulos esparcidos en su periferia. El exquistamiento se realiza a través de una abertura -- que se forma en el punto de contacto del endoquiste con el ectoquiste. El diámetro de los quistes observados oscila entre 15 y 23 micras. El diámetro del núcleo del quiste mide de 4.4 a 5.8 micras y el nucléolo varía de 2.8 a 3.6 micras.

Verificamos que la reproducción se realiza por fisión binaria mediante una mitosis común, igual a la de las células eucarióticas de los metazoarios.

Forma trofozoide:

La forma trofozoide única es el trofozoito con acantopo--

dios, vacuola pulsátil prominente y vacuolas fagocíticas conspicuas (Lámina IV, figs. 1-3).

La forma locomotriz es alargada y la relación longitud/an-
chura sobrepasa la proporción 3:1. Esta forma locomotriz puede-
presentarse truncada en su extremo anterior o bien redondeada, -
exhibiendo un lobópodo hialino en la parte anterior del animal.
Con frecuencia la parte más ancha de las formas alargadas se ha-
lla inmediatamente por detrás de la zona ectoplásmica. En oca--
siones, el pseudópodo anterior de desplazamiento se asemeja mu--
cho al que se observa en las amibas de la familia Mayorellidae.
Los acantopodios de Acanthamoeba astronxyxis pueden surgir en for-
ma individual o en grupos de 2 ó 3. Una vez formados se despla-
zan hacia el extremo posterior, de modo que el contorno lateral
de la amiba suele presentarse adornado con varios acantopodios.
Debe recalcar que el número de acantopodios formados es bajo, -
si se compara esta especie con Acanthamoeba castellanii o con A-
canthamoeba poliphaga, especies en las cuales el número de acanto-
podios es mayor, (Page, 1967).

La forma locomotriz extendida tiene una longitud que va--
ría de 26.0 a 38.4 micras. Cada amiba posee un solo núcleo vesí-
cuoloso colocado generalmente en el extremo anterior del endoplas-
ma durante la locomoción. El diámetro del núcleo varía de 5.0 -
a 8.2 micras y el del nucléolo de 2.9 a 5.4 micras.

En estas amibas la vacuola pulsátil se forma en la mayo--
ría de los casos por coalescencia de dos o más pequeñas vacuolas.

La vacuola vacía su contenido cerca del extremo posterior. Cuando la vacuola era muy grande disminuía la velocidad de desplazamiento. El diámetro de la vacuola varió de 9.2 a 11.0 micras. Las vacuolas digestivas o fagosomas son muy aparentes en esta especie de amiba y la alimentación se verifica mediante la formación de "copas" digestivas.

Aunque es posible que los acantopodios y el mismo lobópo do anterior pueden participar en la fagocitosis, como lo refiere Volkonsky en 1931 (Page, 1966), nosotros hemos observado que el fenómeno de la fagocitosis ocurre principalmente al formarse las "copas" digestivas, generalmente en las partes laterales del extremo posterior.

Pussard en 1934 (Page, 1966), consideró a esta estructura como un verdadero aparato bucal. Aunque estas "copas" pueden formarse en el extremo anterior del animal, su posición más común se halla en las regiones posterolaterales de la célula. Dos proyecciones romas que pueden considerarse como pseudópodos cortos son proyectadas simultáneamente y muy cercanas entre sí. Cuando estas dos proyecciones alcanzan una longitud aproximadamente dos veces mayor que su anchura, empiezan a encorvarse y a dirigirse una hacia la otra. Al mismo tiempo uno puede apreciar la aparición de una hoja delgada y clara de citoplasma en un plano paralelo al del sustrato; aparentemente hay dos de estas hojas y a medida que las paredes se encorvan y se juntan, se constituye la "copa" digestiva. La estructura completa puede ser --

más estrecha que el extremo posterior de la amiba, pero en ocasiones es más ancha. Los lados de la copa tienden a juntarse y al hacerlo algo del líquido capturado escapa. Estas copas digestivas no siempre encierran bacterias y pueden formarse aun en ausencia completa de las mismas, por lo cual no sólo participan en la fagocitosis sino también en la pinocitosis. Este tipo de copas se forman con bastante frecuencia y rapidez, pero su contenido demora de 2 a 3 minutos antes de entrar a formar parte del endoplasma como una vacuola. Dado que las bacterias se adhieren con facilidad a las amibas, son fácilmente capturadas mediante este procedimiento.

Las amibas de esta especie, presentan con frecuencia un gran número de glóbulos pequeños, amarillos y refráctiles. Su aspecto sugiere que se trate de estructuras con contenido en lípidos. En ocasiones estos glóbulos pueden ser relativamente escasos.

Cuando se suspenden en medio líquido, estas amibas adquieren una forma esférica bastante regular, con presencia de finos acantopodios en la superficie. Los diámetros de las formas pelágicas que contienen muchas vacuolas digestivas varían de 18.0 a 27.2 micras. No se observó transformación ameboflagelar.

Al tratarlos con la tinción de P.A.S. para polisacáridos, los organismos de esta especie mostraron positividad localizada en su contorno. El tratamiento con Sudán negro, no reveló inclusiones gra

sas. En algunas partes de la superficie celular la reacción al Sudán negro, fue positiva. La tinción del verde Jano para mitocondrias, demostró un buen número de estructuras teñidas en las formas locomotrices.

Quiste:

El enquistamiento comenzó aproximadamente a las 60 horas de haber inoculado al medio de cultivo. La amiba que se está enquistando adquiere una forma circular irregular al principio, pero se vuelve más poliédrica a medida que avanza este proceso. En un principio la superficie externa del quiste es lisa y flexible, puede apreciarse la vacuola pulsátil funcionando y el citoplasma contiene en estas primeras fases del enquistamiento, numerosos gránulos de aspecto irregular.

En estadios posteriores del enquistamiento, la superficie del quiste se torna irregular y hasta arrugada, formándose ma melones. Luego el ectoquiste se separa del endoquiste pero no totalmente, de manera que quedan puntos de contacto en donde se organizan los ostíolos. La vacuola pulsátil y los gránulos descritos en fases anteriores siguen presentes, pero aparecen unas nuevas esferas que son refráctiles. (Lámina IV, fig. 4).

El quiste maduro exhibe un citoplasma más o menos homogéneo en el que han desaparecido las esferas, la mayoría de los gránulos y la vacuola pulsátil. Persiste un grupo de gránulos -- orientados regularmente y que es característica de todas las ami-

bas del género Acanthamoeba. sp..

Tal parece que las esferas grandes observadas en el citoplasma durante el enquistamiento participan en la formación de la pared celular quística.

Otro hecho observado es que cuando las amibas se enquistan tienden a agruparse y formar cúmulos, esto es válido también para algunas amibas de la familia Vahlkampfiidae, como ya lo señalamos anteriormente. Tal parece que este agrupamiento no es estrictamente necesario para enquistarse, pues se encuentran con facilidad quistes aislados. Este fenómeno de agrupamiento de los animales que se enquistan es especialmente notable en los organismos de la especie A. astronyxis. Fue en relación con esta especie que Raper (1960), sugirió que los quistes maduros podrían secretar una sustancia que atrajera a otras amibas y que Acanthamoeba astronyxis "puede presentar un tipo de conducta celular que puede considerarse transicional entre las formas estrictamente libres y las que se conglomeran para después diferenciarse de acuerdo a patrones específicos". Esta especie frecuentemente muestra afinidad física entre los quistes de modo que si uno lava la placa de agar o la deja remojar, los quistes continúan unidos formando un grupo. Este fenómeno no excluye la posibilidad de enquistamiento individual, que también se presenta.

El quiste de Acanthamoeba astronyxis es uno de los principales criterios para clasificarla. Se trata de una forma-

biconvexa cuyo espesor depende de si los rayos del endoquiste de forma estrellada se situan en uno o varios planos. El ectoquiste es circular cuando todas las puntas del endoquiste están en el mismo plano, y a veces cuando 1 ó 2 se encuentran en dos planos distintos. La superficie es menos regular cuando las puntas del endoquiste se localizan en diferentes planos. El aspecto ondulado del ectoquiste es menos conspicuo que en otras especies de Acanthamoeba, de modo que el ectoquiste circular presenta una superficie casi lisa alrededor de un endoquiste con forma de estrella. Los rayos de esta estrella terminan en forma cónica y su contorno es más o menos triangular.

Vickerman (1962), en sus estudios con el microscopio electrónico, encontró verdaderos poros en las áreas en que se unen el ecto y el endoquiste. Ray y Hayes (1954), reportaron que: "los picos de la estrella se ponen en contacto normalmente con el ectoquiste en un mismo plano, pero esto puede variar". Aun cuando la distribución de los rayos del endoquiste ocurra en varios planos, parece que el ectoquiste se presenta como esencialmente redondo, aunque pueden estar presentes irregularidades en forma de ondulaciones.

Los diámetros de los quistes varían de 15.0 a 23.0 micras.

Los picos de la estrella que forma el endoquiste son numerosos y colocados en un mismo plano, pueden ser de 4 hasta 8.

Los núcleos a veces difíciles de observar tienen diámetros que -- van de 4.4 a 5.8 micras, mientras que los nucléolos varían de 2.8 a 3.6 micras. No encontramos evidencia de división nuclear en el quiste.

Lo que primero se aprecia durante el proceso de exquistamiento es la pérdida de orientación de los gránulos citoplásmicos. Aparecen de nuevo los gránulos irregulares y comienza a funcionar la vacuola pulsátil. Se observaron uno o más opérculos dentro del citoplasma del quiste.

La tinción de P.A.S. da una reacción muy intensa en el endoquiste. El ectoquiste es positivo con menor intensidad. El Sudán negro resultó muy positivo para el ectoquiste y el endoquiste fue algo positivo. Con el verde Jano se colorearon algunos de los gránulos periféricos del citoplasma.

Identificación y sinonimia:

El arreglo de los picos del endoquiste en uno o varios planos es uno de los criterios indiscutibles para clasificar a -- los animales de esta especie (Ray y Hayes, 1954). Las ilustraciones de los quistes que acompañan a la descripción de Singh de -- 1952, sobre Hartmannella rhyssodes sugieren que por lo menos una -- de las 4 cepas descritas por este autor es idéntica a Acanthamoeba astronyxis. Sin embargo, las otras cepas incluidas bajo la -- denominación de Hartmannella rhyssodes no reunían las características de A. astronyxis. El nombre específico dado por Ray y Ha-

yes (1954), debe ser considerado como válido.

Las figuras tanto del trofozoide como del quiste hechas por Nägler sobre Amoeba albida en 1909 (Page, 1966), sugieren -- fuertemente que se trata de Acanthamoeba astronyxis. Nägler reporta promitosis en su especie, un enunciado difícil de creer dada la semejanza tan grande del quiste por él descrito y el de Acanthamoeba. Nägler también reporta autogamia dentro del quiste. Dada la incertidumbre de estos hallazgos dudosos, el comparar e identificar Acanthamoeba astronyxis con Amoeba albida no es posible.

Hasta aquí la descripción de nuestros hallazgos con las microscopías de luz y electrónica. Enseguida comparamos nuestros resultados con microscopía de luz con aquellos obtenidos por Page (1966), en su estudio taxonómico sobre las amibas Limax, dado que son los más completos en su género, no sólo en nuestra opinión sino en la de muchos otros autores. (Singh y Das, 1970 ; Willaert, 1974, 1976).

Los cultivos utilizados por Page en su trabajo fueron, igual que los nuestros, de tipo monoclonal a partir de un quiste o de un trofozoito, aislados en ambos casos, en un bloque pequeño de agar que se corta y se transfiere a un cultivo nuevo. Page utilizó agar no nutritivo sembrado con Klebsiella aerogenes, para el crecimiento de sus clonas, mientras que nosotros empleamos agar no nutritivo sembrado con Escherichia coli, como lo sugiere Willaert (1976), cuando no se encuentra disponible la K. aerogenes.

El análisis comparativo entre nuestros hallazgos con microscopía de luz y aquellos reportados por Page (1966), para N. gruberi, aparece en la tabla IX.

Del examen de esta tabla se deduce que la cifra obtenida por nosotros para la longitud máxima de la amiba lista para la locomoción es ligeramente mayor, 45.7 micras, que la presentada por Page para el mismo caso, 40.7 micras. La media para esta misma característica es asimismo, ligeramente mayor para las cepas locales, 28.1 micras, contra 23.3 micras de las cepas extranjeras.

Otra diferencia es la del diámetro máximo de la vacuola contráctil que en las cepas locales fue de 5.2 micras, mientras que en las extranjeras fue de 4.8 micras. Sin embargo, todas estas pequeñas diferencias de dimensión no son estadísticamente significativas a la luz del análisis de varianza efectuado, por lo que las cepas regionales pueden considerarse con seguridad dentro de la misma especie que las extranjeras. Este hecho queda reforzado por los resultados obtenidos del estudio de otros caracteres de los organismos, tales como el diámetro del núcleo, el del nucleólo y aquéllos proporcionados por la medición de los quistes (Tabla IX).

También para N. gruberi, pero ahora con el estudio hecho con la microscopía electrónica de transmisión en la cepa Z-1, nuestras observaciones difieren parcialmente de las de otros autores y nos permiten ofrecer algunas aportaciones novedosas al acervo de datos ultraestructurales de esta especie.

En concordancia con otros autores (Carosi et al. 1977; Willaert y Ray, 1973; Carter, 1970), para diferentes especies -- del género Naeqleria sp., nuestras observaciones coinciden en el sentido de que la cepa regional (Z-1), exhibe un modelo estructu-
ral que es común a otras especies del mismo género como N. jadi-
ni Willaert y Ray, 1973; y como N. fowleri Carter, 1970.

Este patrón de organización estructural común a todas-
las especies del género Naeqleria sp. se halla constituido básic-
amente por: un núcleo delimitado por una envoltura provista de-
poros y de ribosomas en su hoja externa, un retículo endoplásmi-
co rugoso, un cariosoma en el centro del núcleo, la presencia de
vacuolas digestivas y pulsátiles, mitocondrias, y un retículo en-
doplásmico liso.

En cuanto a otras características que pueden variar de
especie a especie y aun de cepa a cepa, coincidimos con las ob-
servaciones de Vickerman (1962), Visvesvara y Callaway (1974), -
Lastovica (1975) y Carosi et al. (1977), dado que no encontramos
un aparato de Golgi bien definido y en su lugar detectamos sola-
mente algunas vacuolas alargadas que se asemejan burdamente a --
las cisternas típicas del organoide mencionado.

Las mitocondrias de los especímenes locales, aunque de
estructura variada, presentaron con frecuencia la forma de clava,
ya reportada para N. gruberi por Vickerman (1962), y Carosi et
al. (1977).

En este sentido pensamos junto con Carosi et al. que la forma de clava no debe considerarse como criterio diagnóstico exclusivo para esta especie, pues Carter(1970), Martínez et al. (1974), Visvesvara y Callaway (1974), y Lastovica (1975), la han reportado en N. fowleri, y también Rondanelli et al. (1976), la han encontrado, aun cuando en forma excepcional, en Acanthamoeba astronyxis.

En el caso de las mitocondrias de la cepa local, se encontraron frecuentemente, dentro de ellas, áreas densas ubicadas en la matriz, observación que coincide con lo reportado por Carosi et al. (1977), para la misma especie.

Otra de las características que se señala como criterio diagnóstico para esta especie (Carosi et al. 1977), es la de la asociación de glóbulos de lípidos con el retículo rugoso. Nosotros la encontramos en los organismos estudiados. Por otra parte, algunos autores (Visvesvara y Callaway, 1974; Carter, 1970; y Carosi et al. 1977), señalan también con carácter diagnóstico para N. gruberi la disposición de los glóbulos de lípidos en forma de una corona perinuclear. En este sentido nuestras observaciones no nos permiten afirmar la existencia de una corona perinuclear típica de glóbulos grasos en los especímenes estudiados.

Sólo en algunos casos las inclusiones de grasa se hallaban en relación con la hoja externa de la envoltura nuclear; en la mayoría, los glóbulos grasos, se encontraron dispersos en el citoplasma, asociados al retículo rugoso y en forma libre. En ca

so de repetirse esta observación en otras cepas regionales, tal hecho nos permitirá cuestionar la validez de la corona de lípidos perinucleares como criterio diagnóstico para N. gruberi, ya que la ausencia de esta característica en los especímenes locales puede ser propia de la cepa Z-1 y no de otras. De hecho, este constituye el objeto de análisis de un estudio que el autor desarrollará posteriormente.

Otros componentes ultraestructurales que algunos autores describen como típicos de N. gruberi, tales como las partículas semejantes a virus (Schuster, 1969; Schuster y Dunnebacke, 1974 a y b), no fueron detectadas nunca en el caso de la cepa estudiada.

Esta ausencia de partículas semejantes a virus en la cepa Z-1 está también en desacuerdo con las observaciones de Carosi et al. (1977), quienes las detectaron abundantemente en organismos de N. gruberi, N. fowleri y N. jadini. Lo mismo que dijimos para la corona perinuclear de lípidos vale para este hallazgo en la cepa local. Se requiere el estudio de más cepas que proporcione mayor información al respecto.

En cuanto a las vacuolas pulsátiles, Visvesvara y Callaway (1974), Lastovica (1975) y Carosi et al. (1977), señalan que se trata de organoides de estructura simple. Sin embargo, nosotros encontramos en la cepa estudiada una zona citoplásmica perivacuolar, provista con abundantes vesículas pequeñas y con algunas mitocondrias que en conjunto constituyen el espongioma,

complejo estructural que hasta hora sólo había sido descrito para las amibas grandes como A. proteus Leidy, 1879 (Andresen- -- 1973). Este hallazgo no había sido descrito antes para ninguna cepa de N. gruberi:

En síntesis, nuestras observaciones sobre la ultraestructura del trofozoíto de la cepa Z-1 de N. gruberi, concuerdan, en lo general, con las descritas en la literatura para otras cepas de la misma especie, y aún para especies diferentes dentro del mismo género; pero, hemos detectado algunas diferencias que pueden ser trascendentales si se reafirman en otras cepas, puesto que cuestionan la validez de algunos criterios que tradicionalmente se han venido considerando como diagnósticos, tanto a nivel específico como genérico. Tal es el caso de las partículas semejantes a virus y de la corona perinuclear de lípidos, que nunca fueron detectadas en los especímenes estudiados por nosotros.

Por otra parte sí hallamos una complejidad estructural en torno de la vacuola pulsátil, en la forma de un espongioma como el descrito para el grupo de las amibas grandes de vida libre.

Lo anteriormente expuesto, nos permite constatar que, en el caso de las amibas limax, la microscopía electrónica es un arma útil, aún no plenamente explotada, que puede proporcionar nuevos criterios y ratificar o rectificar los antiguos, todo lo cual conduce hacia una taxonomía más adecuada.

En lo que respecta a A. astronyxis, el análisis comparativo entre nuestros hallazgos con microscopía de luz y aquéllos reportados por Page (1966), para esta misma especie, aparece en la tabla X.

Del examen de esta tabla se deduce que los datos de nuestro estudio caen dentro de los intervalos de variación enunciados por Page para la cepa exgranjera excepto en los casos de diámetro máximo de la vacuola contráctil que es de 11.0 micras para las cepas regionales y de 10.4 micras para la extranjera; lo mismo puede decirse para el diámetro máximo de núcleo y del nucléolo que es de 5.8 micras y de 3.6 micras respectivamente dentro de las cepas regionales y de 5.3 micras y 3.3 micras para las extranjeras. Sin embargo, el análisis de varianza nos confirma aquí, igual que en el caso de N. gruberi, que estas variaciones no son significativas por lo que las cepas regionales pueden considerarse con seguridad dentro de la misma especie que la extranjera. Este hecho queda reforzado por los resultados obtenidos del estudio de otros caracteres de los organismos tales como la longitud de la ameba extendida, el diámetro del núcleo y del nucléolo etc. (Tabla. X).

Con esto concluimos este análisis descriptivo y comparativo de la fase trofozoide y quística de N. gruberi y de A. astronyxis para pasar a analizar uno de los procesos típicos que se presentan en N. gruberi, el de la capacidad de transformación-ameboflagelar.

C A P I T U L O I V .

RESULTADOS.

SEGUNDA PARTE:

TRANSFORMACION AMEBOFLAGELAR
ESPONTANEA E INDUCIDA EN OCHO
CEPAS REGIONALES DE NAEGLERIA
gruberi

"No te mezcles con aquéllos que
son dados a cambiar".....

Proverbios 24, 21.

Algunas amibas del grupo limax muestran dentro de su ciclo vital estadios transitorios, durante los cuales son capaces de producir flagelos. (Lámina II; figs. 2-4). Para ser más precisos la transformación ameboflagelar es un fenómeno demostrado hasta ahora en los géneros: Naegleria sp. Alexeieff, 1912, emend. Calkins, 1913; Tetramitus sp. Perty, 1853; y Heteramoeba sp. Droop, 1962; todos ellos pertenecientes a la familia vahikampfiidae.

El dimorfismo de estos organismos, determinó durante mucho tiempo la incertidumbre de su clasificación dentro del grupo de los Sarcodarios, y en ocasiones dentro del grupo de los flagelados, (Page, 1966; Bovee y Jahn, 1966).

Hollande en 1942 (Page, 1966), consideraba en su estudio sobre flagelados libres, que los ameboflagelados representaban las formas más evolucionadas dentro del grupo, más que un estadio pasajero de una amiba.

En contraposición a esto último algunos autores aceptan (Bovee y Jahn, 1966; Margulis 1967, 1968, 1971), que los ameboflagelados pueden parecerse a los representantes ancestrales de las amibas. En este sentido, los ameboflagelados fueron considerados por Schaeffer en 1926 (Page, 1966), como las formas más primitivas del grupo de las amibas que han conservado la capacidad, aun cuando transitoria, de formar flagelos.

Hemos realizado el estudio sobre la capacidad que los organismos de ocho cepas regionales de N. gruberi exhibieron pa-

ra transformarse, de individuos ameboides en organismos flagelados, proceso denominado transformación, y del fenómeno inverso, - es decir, del paso de la forma flagelar al estado ameboide, fenómeno denominado reversión.

INDUCCION DE LA TRANSFORMACION AMEBOFLAGELAR.

La inducción de la transformación se realizó utilizando agua destilada en proporción 1:1.

Transformación espontánea e inducida: la transformación ocurrió en forma espontánea en las ocho cepas estudiadas, mientras se hacía la observación de las muestras; pero también pudo ser inducida al diluir el medio de suspensión con agua destilada. La mayoría de las formas flagelares observadas reversionaron también, en forma espontánea, a la fase ameboide. Aunque no hicimos conteos para calcular la proporción de células que efectuaban la transformación, sí detectamos diferencias notables entre los organismos de distintas muestras, en cuanto al período de latencia necesario para que se iniciase la transformación, una vez inducida con agua destilada.

Siendo de tres minutos en las muestras que procedían de su hábitat natural (suelo y río) y de 35 y 65 mins. para las muestras procedentes de piscinas y grifos.

Observamos muestras en las que la mayoría de las amebas efectuaron la transformación, y sólo en una de las muestras de las piscinas, las formas ameboides se transformaron en flage-

lados en un cien por ciento.

La forma flagelar de N. gruberi casi siempre exhibe - dos flagelos, aunque pudimos encontrar organismos con uno solo - (Lámina II figs. 2 y 3).

En caso de existir dos flagelos, poseen la misma longi tud y son ligeramente más largos que la misma célula.

Los flagelos nacen de una pequeña depresión situada en la parte más anterior del organismo (en los casos de forma ovoide o elíptica), pero es difícil decir que se trata de un nacimien to anterior cuando la forma flagelar es esférica o cuando menos redondeada, como pudimos confirmar en varias ocasiones. (Lámina II, fig. 4).

En la mayoría de los casos el núcleo de los flagelados se localizó inmediatamente por detrás del punto de nacimiento de ambos flagelos.

Las formas flagelares no muestran la típica diferencia ción entre ecto y endoplasma. La célula puede ser piriforme, e- lliptoidal, alargada o redondeada. En el caso del contorno piri- forme, la parte posterior resulta redondeada. La vacuola con- tráctil es por lo general posterior en los flagelados. Independientemente de su forma los flagelados observados en vivo, no -- mostraron ningún cambio morfológico notable aun en el momento de desplazarse con rapidez por el batimiento de sus flagelos. Esto sugiere que el estado flagelar constituye una forma más o menos-

estable del organismo.

El flagelado rota sobre su eje longitudinal al desplazarse y su borde anterior dibuja una hélice. Se observaron individuos que aun cuando tenían todavía flagelos se fijaron al cubreobjetos y empezaron a emitir pseudópodos. Esta fase transitoria dimórfica puede darse durante la transformación y durante la reversión. En esta etapa de transición pudimos constatar que -- los organismos efectúan fagocitosis por circunfluencia. En cambio, parece ser que el flagelado bien definido, con su contorno rígido y sin citostoma, resulta incapaz de fagocitar.

No se observó en ningún momento división celular durante la fase flagelar. La longitud de las células flageladas en su forma nadadora más activa varió de 10.8 a 26.7 micras.

En la tabla XI se comparan las dimensiones de las formas flageladas regionales con las que presenta Page (1966), para ocho cepas extranjeras.

Del examen de esta tabla se deduce la gran semejanza entre las dimensiones de los dos grupos de cepas.

Durante nuestro estudio nunca encontramos formas con tres o cuatro flagelos, mientras que Page sí las observó, aunque en un porcentaje muy bajo.

En cuanto a las condiciones que propician la transformación espontánea pueden citarse cambios de p^H , de temperatura y de concentración de nutrimentos que ponen en peligro la integridad de la fase amibiana.

Por otra parte, la fase flagelar no implica, desde el -- punto de vista de la diferenciación celular, un estadio de rigidez o de inalterabilidad.

De hecho, la fase flagelar representa una forma inestable, que fácilmente puede revertir a la fase amibiana.

Hemos observado en concordancia con Fulton (1970), que cuando el animal alcanza la forma flagelada precisa y definida, -- sus paredes se tornan rígidas y es incapaz de fagocitar. Asimismo, en acuerdo con Page (1966), y Fulton (1970), no hemos detectado -- hasta ahora en la fase flagelar de los organismos estudiados, ni -- la fisión binaria característica de la fase trozoide, ni ningún -- otro tipo de división celular o fenómeno de sexualidad.

Sin embargo, hemos observado que en estadios intermedios de la transformación ameboflagelar aún no bien definidos, esto es, cuando el animal exhibe tanto pseudópodos como flagelos, es todavía capaz de fagocitar bacterias. Esto nos hace considerar que -- los fenómenos de transformación y reversión ameboflagelar no de-- ben considerarse como fenómenos biológicos discretos, sino contí-- nuos, dentro de los cuales no se puede establecer tajantemente, -- ni en forma rígida, determinado fenotipo convencional.

Por otra parte el tiempo de latencia necesario para iniciar la transformación fue variable para los organismos recolectados de diferentes hábitats. Así, observamos que las amibas obtenidas de su hábitat natural (suelo y río), presentaron el tiempo de latencia más corto, que fue de 3 mins., mientras que aquellos-

microorganismos colectados de las piscinas y de los grifos exhibieron un período de latencia más prolongado que varió de 35 -- hasta 65 mins.

Conviene mencionar aquí el hecho de que la fase flagelar tiene implicaciones desde el punto de vista epidemiológico y patogénico, cuando se trata de cepas que exhiben el poder patógeno (Callicot, 1968 ; Jadin, 1973; Vandepitte, 1974). Como ya fue descrito por Das (1974), parece que la fase flagelar resulta más efectiva para la invasión del huésped afectado. Esto puede deberse a la facilidad y rapidez de desplazamiento que exhiben los flagelados si los comparamos con las formas amebianas.

Das las características biológicas mencionadas y dado que algunas cepas de este grupo son patógenas para distintos grupos de animales y para el hombre mismo, (Mackinnon, 1961; Jadin et al. 1972; Chang, 1974), pensamos que estas variedades patógenas adaptadas por una parte a un medio de vida libre, y por otra a un hábitat endozoico, se encuentran en posición "ventajosa" si las comparamos con otras variedades ameboides o flagelares patógenas estrictamente endozoicas; como es el caso de Entamoeba histolytica (Neal, 1957) y de Trypanosoma cruzi, Chagas.

C A P I T U L O V.

RESULTADOS.

TERCERA PARTE:

SOBRE LA PATOGENICIDAD DE ALGUNAS

ESPECIES DEL GRUPO LIMAX

"...y expandieron su poder más allá de lo esperado, demoliendo las barreras y extendiendo sus confines...."

F. Rivera A. in litt.

Desde comienzos del presente siglo la patogenicidad de algunas amibas limax fue constatada por diversos autores. Recordemos que Naegleria gruberi fue aislada por Schardinger en -- 1899, en heces diarreicas, (Fulton, 1970).

Lesage en 1905, Musgrave y Clegg en 1906, Walker en -- 1908, y Noc en 1909, (Willaert, 1976), aislaron amibas limax en Indochina y Filipinas a partir de las heces diarreicas y de un absceso hepático; Chatton y Lalung-Bonnaire en 1912, (Fulton, -- 1970), reportaron haber aislado un organismo del género Vahlkampffia de las heces de un paciente con disentería. Estos autores observaron directamente las amibas en las heces, las aislaron y pudieron cultivarlas in vitro.

Wells en 1911, (Fulton, 1970; Willaert, 1976), aisló - amibas de vida libre de las partículas del aire polvoso y declaró haber encontrado cepas con poder patógeno.

Whitmore en 1911, Hartmann en 1915 y Pinto en 1922, -- (Willaert, 1976), señalaron haber aislado amibas limax en sus estudios sobre abscesos hepáticos. Estos autores consideraron a -- los organismos aislados como pertenecientes al género Vahlkampffia Chatton y Bonnaire, 1912.

Finalmente fueron las observaciones sucesivas de Jahnes y Fullmer (1957), junto con las de Culbertson et al. (1958, 1959) las que no dejaron duda acerca del carácter patógeno de algunas amibas de vida libre. En efecto, después de que estos autores - observaron las amibas como contaminantes de los cultivos de célu

las de riñón de mono, procedieron a aislarlas e inocularlas intracerebral e intranasalmente tanto en monos, como en ratones, provocando consecuentemente la muerte de estos animales a causa de meningoencefalitis aguda. Las amibas utilizadas en este experimento fueron descritas por Singh y Das (1970), como Hartmanella (Acanthamoeba) culbertsoni Singh y Das, 1970.

Después de esta confirmación de la patogenicidad en humanos, muchos autores corroboraron en casos subsecuentes la observación original al encontrar en los cortes histológicos de pacientes muertos por meningoencefalitis, las formas trofozooides de estas amibas, (Anderson et al. 1973; Callicot et al. 1968; Carter 1968, 1969, 1970 y 1972; Chang, 1974; Hermanne, 1974; Jadin et al. 1972; Kaspraz, 1974; Martin, 1974).

El interés sobre estas amibas se acentuó aún más cuando Wang y Feldman (1961) y Wang (1967), las encontraron en los cultivos hechos a partir de exudados faríngeos. Esta observación fue confirmada inmediatamente por Chang (1971), Armstrong y Pereira (1967) y Little (1968).

La patogenicidad en el hombre, de amibas del género Acanthamoeba, fue revelada originalmente por Fowler et al. (1965) y por Patras y Andujar (1966), quienes aislaron de un paciente con meningoencefalitis crónica, trofozoitos del género Acanthamoeba sp. en seguida, Callicot et al. (1968), y Callicot (1968), aislaron Acanthamoeba astronyxis en un paciente con meningoence

falitis.

Kenney (1971), identificó organismos del género Acantha moeba, sp., al realizar la autopsia de un paciente y lo mismo hicieron Jager y Stamm (1972), para especímenes de Hartmannella sp., Recientemente Sotelo-Avila et al. (1974, 1975), reportaron nuevos casos en Estados Unidos.

Fue Carter (1968), el que aisló por primera vez estas -- amibas a partir de líquido cefalorraquídeo de un paciente con meningoencefalitis. Este autor verificó posteriormente (1969, 1970, 1972), que se trataba de amibas pertenecientes al grupo limax, -- que se parecían mucho a Naegleria gruberi, y dió a esta nueva especie el nombre de Naegleria fowleri Carter, 1970.

Esta misma especie de amiba recibirá el nombre de Nae-- gleria aerobia, por Singh y Das (1970), y de Naegleria invades, -- por Chang (1971).

Jadin y Willaert (1972), reportaron tres casos de menin goencefalitis amibiana primaria por N. gruberi.

Hasta la fecha se han descrito en la literatura más de 100 casos de meningoencefalitis amibiana primaria. (Willaert, -- 1976). En la mayoría de los casos el agente causal aislado fue -- Naegleria fowleri, y en el resto, organismos de las especies Acanthamoeba castelani Douglas, 1930; A. astronyxis (Callicot, -- 1968); y N. gruberi (Jadin et. al. 1972).

Los casos reportados vienen de los cinco continentes.

El conocimiento del mecanismo por el cual las amibas de vida libre adquieren poder patógeno es bastante escaso. Nos podríamos preguntar: ¿son patógenas desde siempre, o adquieren su patogenicidad bajo condiciones dadas?. De acuerdo con Jirovec (1967), la patogenicidad de estas amibas parece estar asociada a numerosos factores uno de los cuales puede ser la adaptación perfecta de estas amibas a temperaturas elevadas encontradas en mamíferos homeotermos; otro podría ser la facultad de poder penetrar activamente en el cuerpo del huésped, y uno más, la formación de quistes que les permiten no sólo su resistencia, sino también, su diseminación a través del aire y del agua. En este sentido conviene mencionar los trabajos de Chang (1971, 1974), los de Griffin (1972) y los de Willaert (1976), en los que se señala que los organismos de Naegleria sp., y de Acanthamoeba sp. que pueden desarrollarse a las temperaturas normales del cuerpo humano (36.5°C a 37°C), o incluso más altas han resultado ser patógenos cuando se inoculan en roedores; mientras que los que no pueden hacerlo resultan inocuos. Según Chang (1971, 1974) y Griffin (1972) esta aseveración sólo es válida para estos dos géneros.

Se sabe que estas amibas, patógenas o no, no son obligatoriamente parásitas y podemos encontrarlas prácticamente en cualquier hábitat. Han sido aisladas, por ejemplo, en Australia a partir del agua dulce y del suelo (Anderson y Jamienson, 1972, 1973); en Bélgica, a partir de las piscinas y de los grifos (Wi--

llaert, 1976) en Estados Unidos a partir de lagos naturales (Chang, 1971) y en nuestro país, por el autor (Tabla VIII; Rivera et al. - 1979).

Tomando en cuenta el punto de vista médico, y refiriéndose se a nuestro país, el grupo de los ameboflagelados facultativamente patógenos reviste especial interés para la explicación y determinación del agente causal de algunos casos de meningoencefalitis-fulminantes, cuya etiología viral o bacteriana ha sido descartada.

Asimismo, creemos que el conocimiento de la existencia de estos organismos, así como de su ciclo de vida y la determinación de su capacidad patógena, por parte de nuestros médicos, puede facilitar tanto la identificación de estos organismos como agente causal de la enfermedad, así como la dictaminación de medidas profilácticas que eviten no sólo la infección, sino también interrumpen la diseminación en un momento u otro del ciclo vital de estos parásitos.

El conocimiento completo de la biología de estos organismos, refiriéndose ahora especialmente a los patógenos, podrá permitir que, en lo futuro, se obtengan armas de tipo químico o medicamentos que inhiban o cesen la multiplicación de estos organismos.

En relación a esto, conviene mencionar que hasta hoy la terapia medicamentosa que mostraba ser útil para el caso de las amibas del grupo de la histolytica, ha resultado ineficaz en el caso de estas amibas. En realidad, el único agente terapéutico eficiente, hoy por hoy, en la lucha contra estos parásitos es la Anfo

tericina B (Carter, 1969).

Deseamos asimismo, mencionar que aun cuando el desenlace de los casos humanos referidos en la literatura mundial de meningoencefalitis amibiana primaria, casi siempre es fatal, - la incidencia de los mismos es relativamente baja (más de 100 - en todo el mundo), si la comparamos con la frecuencia de meningoencefalitis de origen viral, bacteriano y amibiano de tipo - secundario (Entamoeba histolytica).

En cuanto a la patogenicidad de las doce cepas estudiadas en el presente trabajo, aunque no fue posible determinar esta capacidad mediante inoculación en mamíferos, por carecer de los medios adecuados, sí se incubaron las doce cepas a temperatura constante de 37°C durante catorce días (Tabla VIII), observándose la desaparición total de las fases trofozoide, quística y, en su caso, flagelar dentro de los siete primeros días de incubación. Señalamos este hecho como importante ya que, como lo mencionamos antes, tanto Chang (1971, 1974) como Griffin (1972), indican que los organismos de los géneros - Naegleria sp. y Acanthamoeba sp. que no sobreviven por más de dos semanas a temperatura constante de 37°C, en cualquiera de sus fases vitales, pueden considerarse confiablemente como no patógenos.

En el caso de las doce cepas locales incubadas a 37°C ninguna sobrevivió a la primera semana por lo que según Chang y Griffin deben considerarse como no patógenas.

La homogeneidad morfológica acentuada entre las amibas patógenas y las de vida libre, pertenecientes a los géneros Nae-gleria y Acanthamoeba, ha hecho que muchos autores, entre ellos Willaert (1976), tomen en consideración las características anti-génicas de la membrana celular amibiana, puestas en evidencia -- por el análisis inmunolectroforético, como criterio taxonómico, útil a nivel de género y especie.

Pensamos que este nuevo criterio, unido a los demás, -- podrá ser de gran utilidad en la identificación genérica y espe-cífica de las amibas de vida libre no patógenas y en las facul--tativamente patógenas para el hombre.

C A P I T U L O V I

DUSCUSION Y

CONCLUSIONES

"Se puede probar todo lo que uno quiera, pero la verdadera dificultad está en saber qué es lo que uno desea probar".

Alain.

Ya hemos analizado en la introducción y en el primer capítulo los aspectos más importantes sobre las dificultades que se han presentado históricamente en el devenir de la sistemática de las amibas; aquí queremos enfatizar los aspectos más interesantes y agregar asimismo algunos nuevos que junto con los anteriores nos permitan enunciar algunas conclusiones de utilidad dentro de este campo.

Cada autor, cada escuela, cada época, han aportado su punto de vista particular sobre los criterios taxonómicos que deben de tomarse en cuenta para hacer una taxonomía objetiva y consistente.

Uno de los criterios taxonómicos menos laborioso, y -- por ello más utilizado aun cuando menos confiable, es el de distinguir a las amibas por su morfología general y por la forma de sus pseudópodos. Este método fue el más usado sino es que el único, por los investigadores del siglo pasado y por los del principio del siglo XX. A este respecto conviene recordar las descripciones admirables de Dujardin en 1841 (Page, 1966), las de Leidy en 1879, sobre las grandes amibas de vida libre (Bovee y Jahn, 1966), las de Penard en 1890 y 1902 (Page, 1966) y las de Frenzel en 1892 (Bovee y Jahn, 1966). Fueron éstas, 6 décadas de intenso análisis descriptivo. Se trataba de explorar un nuevo mundo y había que realizar el inventario de todo lo que se fuese descubriendo. Este período corresponde cabalmente al estadio --

de la taxonomía alfa del que nos habla Corliss (1962).

El propio Schaeffer, no pudo escapar a utilizar preferentemente este criterio, y prueba de ello es su excelente monografía de amibas aparecida en 1926. Sin embargo, Schaeffer da un paso firme hacia delante y su trabajo no es sólo de análisis sino también de síntesis. Puede decirse con justicia que con Schaeffer se inaugura una nueva fase de la sistemática de las amibas, el estadio de la taxonomía beta. Ya en 1931 Schaeffer (Page, 1966), se adelanta a su época cuando sugiere que las diferencias morfológicas entre las amibas, no son más que un reflejo de su organización molecular proteica.

Este método de clasificación basado en un criterio estrictamente morfológico sigue siendo utilizado en la actualidad, pero enriquecido por los aspectos fisiológicos y aunado a una lista creciente de nuevos enfoques taxonómicos. En este sentido es válido mencionar los trabajos de Bovee (1953); Bovee y Jahn (1966), Page (1966, 1967), Singh y Das (1970) y Jahn Bovee y Jahn (1979).

Otro de los criterios taxonómicos más explotado por los investigadores para diferenciar las amibas, es el estudio del comportamiento del núcleo durante la mitosis. Es muy cierto que aunque exista homogeneidad en las estructuras celulares, también lo es el hecho de que exista heterogeneidad en la forma de división mitótica.

Sin embargo, el estudio de la mitosis ha probado ser útil sólo a nivel de familia, pues resulta un criterio insuficiente a nivel genérico y específico.

En este sentido destacan los trabajos sobre mitosis-- elaborados por Singh (1952, 1953), por Page (1966,1967), por -- Pussard (1963, 1973) por Singh y Das (1970), que dan un enfoque realista de este aspecto en los diferentes grupos de amibas; -- sin embargo, el propio Pussard (1973), señalaba la dificultad -- taxonómica que se presenta cuando se utiliza la mitosis como -- único criterio.

Es quizás Page (1966,1967), el que primero enfatiza sobre la necesidad de emplear todas las características disponibles, ya sean citoplásmicas, nucleares, quísticas o citoquímicas. Es por esto que sus trabajos taxonómicos para las amibas - limax son hasta ese momento los más completos.

Por su parte Baud y Morard (1953), proponen que se tome en cuenta como criterio taxonómico útil, la organización proteica submicroscópica. Sobre esta misma línea, Crick (1958), -- sugiere una taxonomía basada en las proteínas, que según él, -- son la expresión más fiel del fenotipo.

Adam (1959, 1964 a y b, 1969) y Adam y Blewett (1974), consideran criterios taxonómicos importantes los requerimientos nutricionales y la cantidad de ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico.

A diferencia de lo que ocurre con sus congéneres parásitas (Goldman, 1960; Talis et al. 1968, 1970; Lunde et al. - - 1969; y Capron et al. 1972), los estudios serológicos en las -- amibas de vida libre han sido lamentablemente escasos (Siddiqui y Balamuth, 1965; Balamuth y Kawakami, 1967; Cerva 1967, 1973; - Singh y Das, 1970; Saygi, 1971; y Willaert, 1973, 1974, 1976).

Actualmente la mayoría de los amebólogos dedicados -- al grupo limax (Adam et al. 1974; Cerva, 1973; Carter, 1972 --- Jadin, 1974 y Willaert, 1976), prefieren la taxonomía propues- -- ta por Page (1967), que sigue hasta el nivel de orden, la enun- -- ciada por Honigberg et al. (1964), Page partió de los trabajos -- de Alexeieff (Page, 1966) para elaborar su clasificación de - -- 1967. Ambos autores enfatizan los caracteres morfológicos y ci- -- toquímicos de las amibas.

La clasificación que se utiliza en segundo lu- -- gar preferencial para las amibas limax es la de Singh y Das - - (1970). Estos autores retoman el enfoque sobre el patrón de di- -- visión nuclear ya utilizado desde antes por Volkonsky (Singh, - 1953), para enunciar su esquema taxonómico.

Como ya lo consignamos al principio de este trabajo-- aunque tanto la clasificación de Page (1967), como la de Singh- -- y Das (1970), se fundamentan sobre criterios diferentes, la dis- -- tinción entre las familias Vahlkampfiidae (Schyzopirenidae) y -- Hartmannellidae, está esencialmente caracterizada por la forma- -- de división nuclear.

En efecto, la familia Vahlkampfiidae (Page) o Schyzopirenidae (Singh y Das), muestra el tipo de división nuclear llamada promitosis por Nägler en 1909 (Page, 1966); mientras que la familia Hartmannellidae, exhibe la mitosis típica de los eucariontes, que ha sido diferenciada recientemente por Pussard (1973),-- en mesomitosis y metamitosis.

Por nuestra parte pensamos que actualmente se está creando una taxonomía confiable y veraz, en la que se consideran todos los criterios taxonómicos disponibles y a los que se les da una jerarquización juiciosa y objetiva. Por lo que toca al grupo Limax podemos decir que coexisten los tres estadios de la sistemática (taxonomía alfa, beta y gama), pero que se tiende cada vez más a una taxonomía más integral. En nuestro estudio tomamos en cuenta como criterios taxonómicos todos aquéllos que nos eran accesibles, tales como: la forma de locomoción, la forma de los pseudópodos, el patrón de división nuclear, la forma de los quistes, la transformación ameboflagelar, todos ellos analizados con el microscopio de luz; y el estudio con microscopía electrónica (para la fase trofozoide de N. gruberi), y el análisis estadístico de todos los datos morfométricos a través de la obtención de medias y media de medias, intervalos de variación y análisis de varianza. Con todos estos datos hemos fundamentado nuestro diagnóstico sobre las dos especies estudiadas, N. gruberi y A. astronomyxis.

Este análisis global de diversos criterios taxonómicos, realizado con una tendencia integradora nos ha llevado a las siguientes conclusiones que pueden ser útiles para estudiar a las amibas limax:

La recolección de los organismos deberá hacerse con -- equipo estéril, no sólo para determinar el origen real de los -- especímenes, sino también para evitar el contar dos o más veces -- los mismos organismos.

El trabajo experimental habrá de hacerse de preferen-- cia con individuos de una misma clona, ya que de otra manera -- existiría siempre la incertidumbre de trabajar con una sola espe-- cie. De ahí la importancia de contar con cultivos monoclonales a partir, o de un quiste o de un trofozoito como se hizo para este trabajo.

Los cultivos habrán de estandarizarse lo más posible - para las diferentes cepas (como lo hicimos nosotros con base en agar no nutritivo inoculado en E. coli), ya que de no ser así -- uno no puede determinar cuánto de las variaciones detectadas se-- debe a la dieta o a la presencia o ausencia de determinados ali-- mentos. Aquí cabe recordar que el análisis comparativo que efec-- tuamos entre las cepas regionales y las presentadas por Page in-- volucraba un factor de variabilidad que podía haber sido signifi-- cativo, y que fue que nosotros utilizáramos en nuestros cultivos E. coli en vez de K. aerogenes como lo hizo Page. Sin embargo, -

el análisis de varianza nos confirmó que esta variable no fue significativa para la determinación de los caracteres analizados que fueron similares para los dos grupos de cepas.

Deberá observarse una gran cantidad de organismos, -- lo cual permitirá determinar con confianza estadística el intervalo de variación dentro de una especie; especialmente cuando se trabajan cepas clonales que suelen variar mucho pese a su genotipo común. En este sentido la mayoría de los estadísticos sugieren el examen de un mínimo de treinta especímenes (Sokal et al., 1969.) Nosotros examinamos cien especímenes de cada cepa -- para que nuestro análisis comparativo con las cepas extranjeras que también tuvieron cien organismos revisados para cada cepa, fuera más confiable.

Deberán estudiarse todos los estadios morfológicos -- del ciclo vital, en nuestro caso particular la fase amibiana, -- la flagelada y la quística; de preferencia no sólo con microscopio de luz sino también con el electrónico.

Deberán estudiarse las figuras mitóticas, puesto que este conocimiento nos permite ubicar los especímenes ya desde el nivel taxonómico de familia.

La microscopía electrónica podrá ser, como lo fue -- en nuestro caso, un instrumento utilísimo para detectar variaciones morfológicas de cepa a cepa y de especie a especie, y -- por ello habrá de hacerse de rutina.

Aunque no estuvo a nuestro alcance realizarlos, también son deseables los estudios bioquímicos e inmunoserológicos de las amibas.

Podríamos concluir finalmente que para la identificación y clasificación de las amibas limax el conocimiento del mayor número de características posible nunca está de sobra. A mayor conocimiento de la biología de estas amibas, mayor exactitud en su identificación y por ende, en su clasificación.

Abundando un poco más en las consideraciones sobre el cultivo de las dos especies en estudio, podemos decir que los métodos de aislamiento y cultivo utilizados durante la presente investigación, permitieron desarrollar organismos de vida libre sobre placas de agar inoculadas con E. coli. El desarrollo de las amibas bajo estas condiciones demuestra, una vez más, que éstas pueden vivir en un medio ambiente artificial, pero no nos precisa de modo definitivo las condiciones reales del hábitat natural en donde habitualmente se desarrollan.

Las amibas limax que pueden desarrollarse en placas de agar han sido denominadas por Page (1966), "amibas de cultivo", pero también "amibas del suelo" por otros autores (Singh, 1963; Singh y Das, 1970). Esta última designación ha sido aplicada específicamente a N. gruberi y A. astronyxis por Singh y Das (1970).

Las doce cepas estudiadas en la presente investigación han sido obtenidas de hábitats naturales (suelos y río) y artificia

les (grifos y piscinas) del Distrito Federal, México.

Por lo que toca a N. gruberi ya ha sido detectada previamente en nuestro país. Coronado (1973), la encontró en piscinas del Distrito Federal y del Estado de Morelos; López-Ochoterena et al. (1970), la consigna en su lista taxonómica de protozoarios de vida libre de México; Rico-Ferrat (1975), la nombra dentro de su listado de protozoarios de las aguas negras del Distrito Federal; y Tomasini (1975), la encuentra también en las aguas potables de la Ciudad de México. Esta misma especie ha sido reportada en el extranjero por diversos autores, tanto para hábitats naturales como artificiales (Page 1966, 1967, 1974; Bovee y Jahn, 1966; Jadin, 1974; Willaert 1974, 1976; Cerva, 1973; Chang, 1971, 1974).

En cuanto a Acanthamoeba astronyxis es en este trabajo que se cita por primera vez para México, tanto en hábitats naturales (río de Coyoacán en el D.F.), como en los artificiales (grifos y piscinas de la misma entidad). Es también ésta la primera vez a nivel mundial que se aísla A. astronyxis de las aguas de piscinas (cepas locales Al-1 y Al-2). Page (1966), aisló su cepa de esta misma especie de las aguas dulces de un lago en Wisconsin, Estados Unidos.

Tanto N. gruberi como A. astronyxis fueron recolectadas de zonas de muestreo con caracteres muy similares (Tablas VII y VIII), lo que nos hace pensar que el microhábitat de ambas especies puede ser muy semejante.

Dado que estas dos especies se encuentran adaptadas - no sólo a los tradicionalmente conocidos como sus hábitats naturales, sino también a los artificiales como las aguas de grifos y piscinas, bien podríamos llamarlas "amibas de hábitats clorados" para subrayar su adaptabilidad a estos medios.

De las nueve cepas regionales obtenidas a partir de - organismos recolectados de aguas cloradas, seis correspondieron a la especie N. gruberi y tres a A. astronyxis. De estas - nueve cepas, ocho se obtuvieron de organismos recolectados en la fase quística y una sola, la cepa Pi-4 de N. gruberi, de organismos recolectados en la fase trofozoide, a partir de las - aguas con cloro. Si se recurre a la tabla VII se corroborará - que la concentración de cloro activo para las piscinas varió - de 0.63 a 1.0 mg. por L., cifra que según Derreumaux et al. -- (1974), impediría, cuando menos, la supervivencia y el desarrollo de las formas trofozoides. Sin embargo, en nuestro estudio si bien es cierto que de seis cepas aisladas de piscinas, cinco de ellas sólo se obtuvieron de organismos recolectados en - la fase quística, también lo es el hecho de que una de las cepas se haya obtenido de formas trofozoides que "nadaban libremente" en aguas con una concentración de cloro activo de 0.70- mg/L.

De esto se desprende que las concentraciones de cloro- activo de 0.5 a 1.0 mg/l. consideradas hasta hoy confiablen-

te amebicidas por citólisis (Derreuiaux et al. 1974), no afectan ni la integridad ni la viabilidad de la fase quística de las cepas regionales y lo que es más trascendente si se trata de cepas patógenas, pueden no afectar, como sucedió con los trofozoitos de la cepa Pi-4 de N. gruberi la fase trofozoide de algunas amibas limax.

Podemos concluir que todas las cepas locales aisladas de grifos y piscinas están constituidas por organismos que han elaborado, a través de la forma quística la mayoría de ellos, y de la fase trofozoide, la minoría, mecanismos de resistencia a concentraciones de cloro activo que supuestamente deberían destruirlos por citólisis.

En cuanto a las cepas de la especie N. gruberi, adaptadas al hábitat artificial de grifos y piscinas, es interesante señalar que presentaron un período de latencia mayor para la iniciación de la transformación ameboflagelar, que el exhibido por sus congéneres del suelo y del río (Tabla XI).

Las dos especies de amibas limax estudiadas, exhiben pues, una gran capacidad de adaptación tanto en hábitats naturales (suelo, agua, aire) como artificiales (cultivos y aguas cloradas de grifos y piscinas).

Desde este punto de vista, tanto N. gruberi como A. --
astronyxis ofrecen especial interés. Se trata de animales prácticamente ubícuos, adaptados, como ya se dijo; mediante distin

tas formas de expresión fenotípica (quiste, trofozoíto, y en su caso, fase flagelar), a hábitats tanto naturales como artificiales.

En su forma quística son capaces de resistir la desecación, la escasez de nutrimentos, las alzas o bajas de pH, de temperatura, y hasta la cloración citolítica.

La fase quística constituye así; una forma de resistencia.

Por otra parte, algunos factores físicos, como las tolvaneras y ventarrones pueden propiciar la diseminación de estas dos especies por la vía aérea. De esta manera la forma quística se convierte no sólo en forma de resistencia sino también de diseminación.

La adaptación del animal en su fase trofozoide le permite fagocitar y reproducirse asexualmente por fisión binaria y en algunos casos resistir la cloración amebicida, (como en la cepa local Pi-4). Es esta, por lo tanto, la fase durante la cual los organismos de estas especies pueden multiplicarse.

En el caso particular de N. gruberi hay que considerar una tercera fase, la flagelar, alcanzada después de elaborados procesos de síntesis proteica y como respuesta a condiciones ambientales adversas para la fase trofozoide.

Desde el punto de vista de biología celular, las amibas pequeñas del grupo limax constituyen una herramienta mejor que sus compañeras de gran tamaño, para los estudios citológicos

cos, dada su gran versatilidad y adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y de cultivo.

Además de su gran adaptabilidad, propiciada por la -- versatilidad fenotípica que les permite colonizar casi cual -- quier hábitat, las amibas limax han trascendido las fronteras- del modo de vida libre para tornarse facultativamente patóge-- nas y por lo tanto parásitos. Han invadido algas, invertebra-- dos, peces, reptiles y mamíferos entre ellos al hombre mismo - (Mackinnon 1961, Culbertson et al. 1958; Carter, 1968).

Correspondió precisamente a Carter (1968) la denuncia del primer caso humano con enfermedad fulminante causada por - amibas hasta ese momento consideradas como inocuas para nues-- tra especie.

La transgresión de la barrera huésped-parásito por -- parte de algunas especies del grupo limax: N. gruberi, A. cul- bertsoni, A. astronyxis (Jadin. et al. 1972; Callicot, 1968; - Carter, 1972; Cerva, 1973; Sotelo-Avila et al. 1975), nunca-- fue tímida ni limitada. Las amibas que poseían esta capacidad-- patógena en los humanos, demostraron, desde el principio, una-- capacidad invasiva desusada, y por si esto fuera poco, un neu-- rotropismo alarmante, responsable, en última instancia, del -- efecto fulminante y letal. De este modo, de poblaciones de ami bas aparentemente libres surgen organismos patógenos altamente virulentos y de poder letal a corto plazo.

Organismos pertenecientes a las dos especies estudiadas en este trabajo han sido comprobados como patógenos para el hombre. Fue Callicot (1958), y Callicot et al. (1958), los que demostraron la patogenicidad de organismos de A. astronyxis y Jadin y Willaert (1972), los que la demostraron para especímenes de N. gruberi.

Por carecer del equipo necesario no hemos podido ir muy lejos en la determinación de la patogenicidad de los organismos de las cepas locales. Hasta ahora hemos tenido que conformarnos con la prueba de cultivo a temperatura constante de 37°C que según Griffin (1972), Chang (1971, 1974) y Willaert (1976) permite diferenciar las cepas patógenas de las que no lo son, en forma altamente confiable.

Si se observa la tabla VIII se corroborará que la sobrevivencia de las cepas cultivadas a 37°C más de dos semanas fue nula, mientras que todas las cepas sobrevivieron el mismo lapso pero con temperatura de 25°C. De acuerdo con este resultado ninguna de las cepas locales puede ser considerada como patógena.

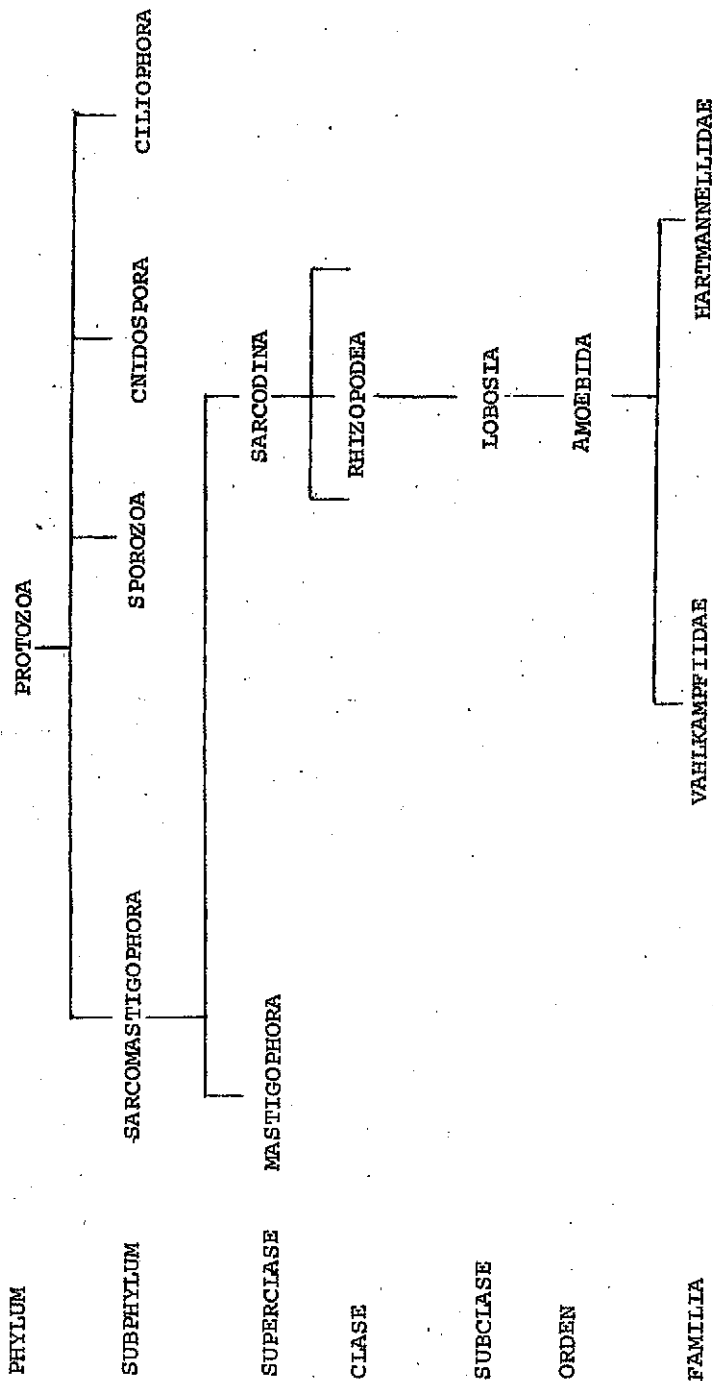
Cuando contemos en lo futuro con el equipo indispensable para efectuar cultivos axénicos podrá practicarse la prueba de la determinación de patogenicidad por inoculación en mamíferos.

Colateral a este trabajo hemos venido realizando una-

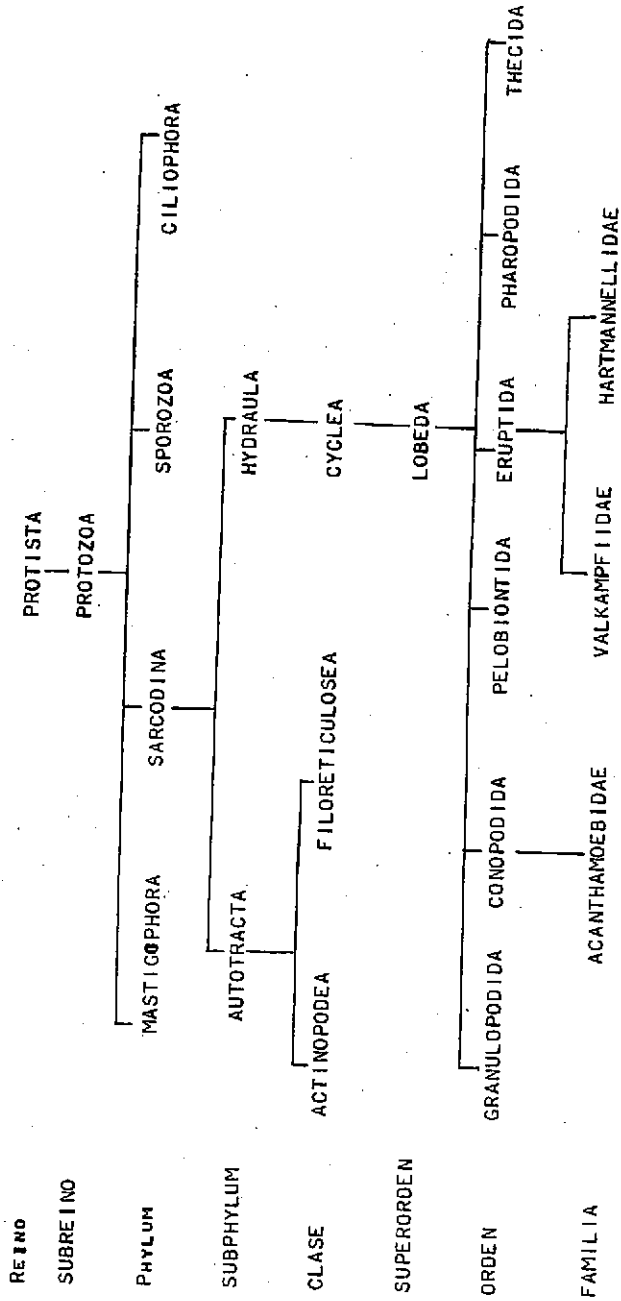
investigación retrospectiva de los casos de meningoencefalitis cuya etiología fue dudosa o nunca se pudo verificar. Esto con el fin de detectar posibles casos de meningoencefalitis amibiana primaria causada por organismos de los géneros Naegleria sp., y Acanthamoeba sp.

Hasta ahora sólo hemos revisado veinte casos, cuyas laminillas de cortes histológicos del sistema nervioso central se nos permitió observar en el Centro de Patología del Centro Médico Nacional. Los resultados han sido negativos, pero seguimos investigando nuevos casos.

Este trabajo constituye, pues, la fase preliminar de un estudio más amplio encaminado a la detección de cepas patógenas y al diagnóstico actual y retrospectivo de meningoencefalitis amibiana primaria en México.



CUÁDRO No. 1 Situación del Orden Amoebida y de las Familias Vahlkampfiidae y Hartmannellidae dentro del Phylum Protozoa, según Honigberg et al. (1964) y Page (1967).



CUADRO No. 2 SITUACIÓN DE LOS ÓRDENES Y DE ALGUNAS FAMILIAS DE LAS AMIBAS LINAX,
 DENTRO DEL PHYLUM SARCODINA, SEGÚN JAHN, BOVEE Y JAHN (1979).

TABLA I.- Clasificación para las amibas pequeñas (incluidas las del grupo limax), Jahn (1949).

Phylum Protozoa Goldfuss, 1818 emend, Von Siebold, 1845.

Subphylum Sarcodina Hertwig y Lesser, 1874.

Clase Rhizopodea Von Siebold, 1845.

Orden Amoebida Kent, 1880.

Familia Dimastigamoebidae, Wenyon, 1926: formas pequeñas, generalmente menores de 20 micras; con fase ameboide y flagelar.

Género Naegleria Alexeieff, 1912 (Dimastigamoeba Blochmann, 1894).

Especie N. gruberi Schardinger, 1899.

Género Trimastigamoeba Whitmore, 1911.

Especie T. philippinensis Whitmore, 1911.

Familia Mayorellidae Schaeffer, 1926: con pseudópodos cónicos o puntiformes; material granuloso en el endoplasma cerca de la base del pseudópodo; tienen uroide; locomoción por flujo protoplásmico.

Genero Mayorella Schaeffer, 1926

Especies M. bigemma Schaeffer, 1918.

M. vespertilio Leidy, 1879.

M. spumosa Penard, 1902.

Género Astramoeba Vejdovsky, 1881.

Amoeba Bory, 1824.

Especie Amoeba radiosa Ehrenberg, 1830.

Género Flabellula Schaeffer, 1926.

Especie F. citata Schaeffer, 1926.

Género Vahlkampfia Chatton y Lalung-Bonnaire, 1912.

Especie V. limax Dujardin, 1841.

Género Thricamoeba Fromental, 1874.

Especie T. limax Dujardin, 1841.

Familia: Hyalodiscidae Poche, 1913.

Género Hyalodiscus Hertwig y Lesser, 1874.

Especie H. rubicundus Hertwig y Lesser, 1874.

Familia: Endamoebidae Calkins, 1913: dividida en cinco géneros sobre la base de la estructura de su núcleo que es vesiculoso; la mayoría de las especies son parásitas intestinales, forman quistes que se expulsan con las heces.

Género Endamoeba Leidy, 1879.

Especie E. blattae Bütschli, 1878.

Género Entamoeba Casagrandi y Barbagallo, 1895.

Especies E. histolytica Schaudinn, 1903.

E. coli Losch, 1875 emend, Schaudinn, 1903.

E. gingivalis Gros, 1849.

E. invadens Rodhain, 1934.

Género Iodamoeba Dobell, 1919.

Especie I. butschlii Prowasek, 1912.

Género Endolimax Kuenen y Swellengrebel, 1913.

Especie E. nana Wenyon y O'Connor, 1926.

Género Dientamoeba Jepps y Dobell, 1918.

Especie D. fragilis Jepps y Dobell, 1918.

TABLA II.- Clasificación para algunas de las amibas pequeñas-
del grupo limax según Singh (1953).

Hasta el taxón de orden (Amoebida), este autor sigue los linea-
mientos de la clasificación de Honigberg et al. (1964).

Familia Schizopyrenidae Singh, 1953.

Definición: El núcleo interfásico contiene un nucléolo central negativo al Feulgen, que se divide durante la mitosis para formar las masas polares; pueden formarse cuerpos interzonales (parte adelgazada de la clava). - Las amibas pueden tener más de un núcleo y algunos Géne-
ros efectúan la transformación ameboflagelar. Esta fa-
milia fue denominada así por Singh, por el Género pro-
totipo Schizopyrenus y de acuerdo con las reglas inter-
nacionales de la nomenclatura zoológica.

Género: Schizopyrenus Singh, 1952.

Nuécleo negativo al Feulgen, que se divide durante la mitosis para formar las masas polares. No efectúan la transformación ameboflagelar.

Especies: S. russelli Singh, 1952.

S. erythaenusa Singh, 1952.

S. atopus Singh, 1952.

El género Schizopyrenus se escoge como prototipo, ya que las amibas incluidas en él, no forman flagelos y porque las amibas que los producen son consideradas por algunos autores fuera -- del grupo de los sarcodarios.

Género Naegleria Alexeieff, 1912 Singh, 1953.

Se forman masas polares. Se encuentran presentes cuerpos interzonales negativos al Feulgen en las últimas - fases de la división nuclear. Efectúan la transformación ameboflagelar.

N. gruberi Schardinger, 1899. Especie tipo de este género.

Didascalus Singh, 1953.

Se forman masas polares, sin cuerpos interzonales durante la división. Existe la transformación ameboflagelar.

Familia Hartmannellidae Alexeieff, 1912; Singh, 1953.

El núcleo interfásico tiene uno o varios nucléolos negativos al Feulgen. Durante la mitosis él o los nucléolos se dispersan en forma de huso donde los cromosomas se disponen para formar la placa ecuatorial, proceso éste igual al encontrado en las células de plantas y animales superiores. Las amibas pueden ser uni o multinucleadas y no efectúan la transformación ameboflagelar. Esta familia toma su nombre del conocido-

Género Hartmannella.Género Hartmannella Alexeieff, 1912; Singh, 1953.

El núcleo interfásico contiene un solo nucléolo negativo al Feulgen, Durante la mitosis se dispersa el nucléolo, se organiza el huso y los cromosomas se disponen para formar la placa ecuatorial. No efectúan la transformación ameboflagelar

H. glebae Dobell, 1914.

H. rhysodes Singh, 1952.

H. leptocnemus Singh, 1952.

H. agricola Gooday, 1916; comb. Singh. 1952.

TABLA III.- Clasificación taxonómica para algunas amibas libres (incluidas las del grupo limax), Bovee y Jahn (1966).

Estos autores siguen en su clasificación los lineamientos establecidos por Honigberg et al. (1964), hasta el nivel de subclase (Lobosia Carpenter, 1861), y luego continúan con superórdenes, entre los cuales está el Loboda Bovee y Jahn, 1966, subdividido como sigue:

Superorden Loboda Bovee y Jahn, 1966.

Orden Granulopodida Bovee y Jahn, 1966.

Suborden Tubulina Bovee y Jahn, 1966.

Familia Amoebidae Bronn.

Género Amoeba Ehrenberg, 1838.

Especie A. proteus Leidy, 1879. (Volvox proteus Pallas, 1766.).

Suborden Limacina Bovee y Jahn, 1966.

Familia Pelomyxidae Greeff, 1874.

Género Pelomyxa Greeff, 1874.

Especie P. palustris Greeff, 1874 (P. villosa Leidy, 1878).

Orden Hyalopodida Bovee y Jahn, 1966.

Suborden Eruptina Bovee y Jahn, 1966.

Familia Hartmannellidae Volkonsky, 1931.

Género Hartmannella Alexeieff, 1912.

Especie Hartmannella glebae Dobell, 1914.

Suborden Conopodina Bovee y Jahn, 1966.

Familia Mayorellidae Schaeffer, 1926.

Género Mayorella Schaeffer, 1926.

Especie M. bigemma Schaeffer, 1918.

Familia Entamoebidae Calkins, 1913.

Género Entamoeba Casagrandi y Barbagallo, 1895.

Especie E. histolytica Schaudinn, 1903.

Orden Thecida Bovee y Jahn, 1966.

Familia Thecamoebidae Schaeffer, 1926.

Género Thecamoeba Fromentel, 1874.

Especie T. verrucosa Ehrenberg, 1838.

Las amibas limax quedan ubicadas dentro de este esquema en los órdenes Hyalopodida y Thecida.

Según esta clasificación N. gruberi y A. astronyxis pertenecen al orden Hyalopodida, suborden Eruptina y familia Hartmannellidae.

TABLA IV.- Clasificación taxonómica para las amibas pequeñas-
(incluidas las del grupo limax), Page (1967).

Orden Amoebida Kent, 1880.

Familia: Vahlkampfiidae Jollos y Lalung Bonnaire, 1912.

Género : Vahlkampfia Chatton y Bonnaire, 1912.

Especies: Vahlkampfia vahlkampfi Chatton, 1910.

vahlkampfia avara Page, 1967.

Vahlkampfia inorata Page, 1967.

Vahlkampfia jugosa Page, 1967.

Género: Naegleria Alexeieff, 1912.

Especies: Naegleria gruberi Schardinger, 1899.

Naegleria fowleri Carter, 1970.

Género: Tetramitus Perty, 1852.

Especies: Tetramitus rostratus Perty, 1852.

Familia Hartmannellidae Volkonsky, 1931.

Género: Hartmannella Alexeieff, 1912.

Especies: Hartmannella hyalina Dangeard, 1900.

Hartmannella vermiformis Page, 1967.

Hartmannella exundans Page, 1967.

Hartmannella limacoides Page, 1967.

Género: Acanthamoeba Volkonsky, 1931.

Especies: Acanthamoeba castellanii Douglas, 1930.

Acanthamoeba astronyxis Ray y Hayes, 1954.

Acanthamoeba poliphaga Puschkarew, 1915.

Acanthamoeba palestinensis Reich, 1933.

Familia: Endamoebidae Calkins, 1913.

Género : Entamoeba Casagrandi y Barbagallo, 1895.

Especies: Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903.

Entamoeba invadens Rodhain, 1934.

TABLA V.- Clasificación de algunas amibas pequeñas (incluidas las del grupo limax), según Singh y Das (1970) .

Estos autores siguen hasta el taxón de orden (Amoebida), la clasificación de Honiberg et al. (1964).

Familia : Schizopyrenidae Singh, 1952.

Género : Schizopyrenus Singh, 1952.

Especies: S. russelli Singh, 1952.

S. atopus Singh, 1952.

Género : Naegleria Alexeieff, 1912.

Especie: N. aerobia Singh y Das, 1970

Género : Didascalus Singh, 1952.

Especie : D. thorntoni Singh, 1952.

Género : Tetramitus Perty, 1852.

Especie : T. rostratus Perty, 1852

Familia : Hartmannellidae Volkonsky, 1931.

Género: Hartmannella Alexeieff, 1912.

Especies: H. glebae Dobell, 1914.

H. rhyodes Singh y Das, 1970.

H. culbertsoni Singh y Das, 1970.

H. castellanii Douglas, 1930.

H. astronyxis Ray y Hayes, 1954.

H. palestinensis Reich, 1963.

Familia : Endamoebidae Calkins, 1913.

Género : Endamoeba Casagrandi y Barbagallo, 1895.

Especies: E. histolytica Schaudinn, 1903.

E. invadens Rodhain, 1934.

TABLA VI.- Clasificación de las familias de amibas limax propuesta por Jahn, Bovee y Jahn (1979).

Estos autores abandonan por completo la clasificación de Honigberg et al. (1964), y elaboran la suya como sigue (Cuadro 2) :

Phylum Sarcodina Hertwig y Lesser, 1874.

Subphylum Hydraula Jahn, Bovee y Jahn, 1979.

Clase Cyclea Jahn, Bovee y Jahn, 1979.

Superorden Lobeda Bovee y Jahn, 1966.

Orden Conopodina Bovee y Jahn, 1966.

Familia Acanthamoebidae Jahn, Bovee y Jahn, 1979.

Género Acanthamoeba Volkonsky, 1931.

Familia Mayorellidae Schaeffer, 1926.

Género Mayorella Schaeffer, 1926.

Orden Eruptida Bovee y Jahn, 1966.

Familia vahlkampfiidae Jollos y Lalung-Bonnaire, 1912.

Género vahlkampfia Chatton y Bonnaire, 1912.

Familia Hartmannellidae Volkonsky, 1931.

Género Hartmannella Alexeieff, 1912.

Orden Pharopodida Jahn, Bovee y Jahn, 1979.

Familia Hyalodiscidae Poche, 1913.

Género Hyalodiscus Hertwig y Lesser, 1874.

Familia Flabellulidae Jahn, Bovee y Jahn, 1979.

Género Flabellula Schaeffer, 1926.

Orden Thecida Bovee y Jahn, 1966.

Familia Thecamoebidae Schaeffer, 1926.

Género Thecamoeba Fromentel, 1874.

Dentro de esta clasificación, N. gruberi pertenece a la familia vahlkampfiidae, y A. astronyxis a la familia Acanthamoebidae.

TABLE VII.- Caracterización de las muestras de piscinas de seis centros deportivos de la Ciudad de México,

Ubicación. Tipo de Local. Cloro Potencial. Cloro Activo. Temperatura y Volumen.*

PISCINA	UBICACION EN EL D.F.	TIPO	CL ⁻ POTENCIAL**	CL ⁻ ACTIVO***	TEMP. °C	pH	VOL. ML.
1.- Piscina 1	Delegación Coyoacán	Local cerrado con jardín interior	1.0 MG/L.	0.71 MG/L.	28°	7.0	1000 ML.
2.- Piscina 2	Delegación Miguel Hidalgo	Local cerrado	1.0 MG/L.	0.70 MG/L.	30°	7.0	1000 ML.
3.- Piscina 3	Delegación Miguel Hidalgo	Local cerrado	1.5 MG/L.	1.0 MG/L.	28°	7.0	1000 ML.
4.- Piscina 4	Delegación Coyoacán	Local cerrado con jardín interior	1.0 MG/L.	0.70 MG/L.	30°	7.0	1000 ML.
5.- Piscina 5	Delegación Coyoacán	A la intemperie	1.0 MG/L.	0.63 MG/L.	25°	7.2	1000 ML.
6.- Piscina 6	Delegación Coyoacán	A la intemperie	1.0 MG/L.	0.63 MG/L.	25°	7.2	1000 ML.

* La muestra de cada piscina se tomó del fondo, de las esquinas y de las paredes utilizando pipetas y garrafones estériles.

** Concentración calculada a partir de las muestras de agua de la piscina por el método de Palin (1957).

*** Cifra que se obtiene multiplicando la cantidad de Cl⁻ Potencial expresada en MG/L. por el coeficiente correspondiente, en función del pH y de la temperatura del agua, según el método de Derreumaux et al. (1974).

TABLA VIII. Listado de las cepas de N. gruberi y A. astronyx recolectadas de hábitats naturales y artificiales del Distrito Federal, y cultivadas monoclo^unal y monoxénicamente.

ESPECIE	CEPA	HABITAT	CULTIVO	SOBREVIVENCIA DE LA CEPA MAS DE 2 SEMANAS.	
				25°C	37°C
1. <u>N. gruberi</u>	Z	suelo ¹	Agar- <u>E. coli</u> ⁶	+	-
2. <u>N. gruberi</u>	Co-1	río ²	" "	+	-
3. <u>A. astronyxis</u>	Cy-1	río ²	" "	+	-
4. <u>N. gruberi</u>	Pi-1	piscina ³	" "	+	-
5. <u>N. gruberi</u>	Pi-2	"	" "	+	-
6. <u>N. gruberi</u>	Pi-3	"	" "	+	+
7. <u>N. gruberi</u>	Pi-4	"	" "	+	+
8. <u>A. astronyxis</u>	A1-1	"	" "	+	-
9. <u>A. astronyxis</u>	A1-2	"	" "	+	-
10. <u>N. gruberi</u>	FM-1	grifos ⁴	" "	+	-
11. <u>A. astronyxis</u>	M-1	grifos ⁵	" "	+	-
12. <u>N. gruberi</u>	Z-1	grifos ¹	" "	+	-

- 1.- Las cepas Z y Z-1 se recolectaron de los suelos y grifos del campus I de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza".
- 2.- Se trata de un pequeño río, el Churubusco que corre a un lado del parque Vivero de Coyoacán en el Distrito Federal.

- 3.- Para las piscinas ver tabla VII, las cepas Pi-1, Pi-2, -- Pi-3 y Pi-4 corresponden a las piscinas numeradas del 1 - al 4. Las cepas A1-1 y A1-2 corresponden a las piscinas- 5 y 6.
- 4.- De la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- 5.- Del Hospital Infantil de Xochimilco, Distrito Federal.
- 6.- El cultivo monoclonal se realizó tanto a partir de un solo quiste como de un trofozoíto, aislados en un bloque de agar que se corta y se transfiere a un nuevo cultivo con agar y E. coli.

TABLA IX .- Análisis comparativo entre las dimensiones ¹ de ocho cepas regionales ² y ocho extranjeras (Page, 1966) ⁸ de N. grüberi.

PARAMETROS	C E P A S	
	REGIONALES	EXTRANJERAS .
1.- Longitud de la amiba lista para la locomoción.	Intervalo de variación: 25.7-45.7 media: 28.1	14.5-40.7 23.3
2.- Diámetro del núcleo	Intervalo de variación: 3.2-5.1	2.8-5.5
3.- Diámetro del núcleo lo.	Intervalo de variación: 2.8-2.9	1.8-3.4
4.- Vacuolas contractiles.	número por organismo: 1-2	1-2
Intervalo del diámetro máximo:	1.4-5.1	2.8-4.8
5.- Quistes.		
Intervalo del diámetro Total:	9-15.6	8.6-20.7
Intervalo del diámetro del núcleo:	2.3-3.6	3.3-5.2
Intervalo del diámetro nucleolar:	0.9-2.5	1.0-2.8

- 1.- Las dimensiones se dan en micras y representan el intervalo de variación o la media resultantes de la medición de 100 amibas de cada cepa, tanto en el caso de las regionales como en el de las extranjeras.
- 2.- Las referidas en la tabla VIII.
- 3.- Page estudió asimismo, ocho cepas diferentes, a las que clasificó numerándolas como sigue: 13,15,16,24,30,36,48 y 49. Estas cepas fueron aisladas de hábitats naturales de agua dulce en Wisconsin, Indiana, Minnesota y Alabama, Estados Unidos.

TABLA X.- Análisis comparativo entre las dimensiones¹ de cuatro-
cepas regionales² y una extranjera (Page 1966)³, de A.
astroomyxis.

PARAMETROS	C E P A S	
	REGIONALES	EXTRANJERAS.
1.- Longitud de la amiba exten- dida.		
Intervalo de variación:	26-38.4	25.5-60
Media:	35.1	41.0
2.- Diámetro del núcleo		
Intervalo:	5-8.2	4.8-9
3.- Diámetro del núcleo. Inter- valo	2.9-5.4	2.8-6.2
4.- Vacuolas contráctiles.		
Número por Organismo:	1	1
Intervalo del diámetro máximo:	9.2-11.0	9.0-10.4
5.- QUISTES.		
Intervalo del diámetro total:	15.0-23.0	14.0-25.0
Intervalo del diámetro nuclear:	4.4-5.8	4.0-5.3
Intervalo del diámetro nucleolar:	2.8-3.6	2.6-3.3
6.- Forma pelágica		
Intervalo del diámetro:	16.0-27.2	11.3-25.1

- 1.- Las dimensiones de dan en micras y representan el intervalo de variación o la media resultantes de la medición de 100 - amibas de cada cepa, tanto en el caso de las regionales como en el caso de la extranjera.
- 2.- Las referidas en la tabla VIII.
- 3.- Page estudió una sola cepa, clasificada como cepa 20, aislada de una laguna de agua dulce en Wisconsin, Estados Unidos.

TABLA XI.- Análisis comparativo entre las dimensiones¹ de la fase flagelar de ocho cepas regionales de *N. gruberi*², y ocho cepas extranjeras (Page, 1966)³, en la misma fase y de la misma especie.

PARAMETROS	C E P A S	
	REGIONALES	EXTRANJERAS
1.- Fase flagelada, Intervalo de la longitud máxima:	10.8-26.7	10.4-28.3
Media de la longitud máxima:	17.5	17.3
2.- Número de flagelos		
1	++	++
2	++++	++++
3 ó 4	-	+
3.- Período de latencia para iniciar la transformación ameboflagelar.		
{ Cepas de suelo y río	3 min.	-
{ Cepas de piscinas y grifos:	36 a 65 mins.	-

1.- Las dimensiones se dan en micras y representan el intervalo de variación y la media de la longitud máxima del flagelado, resultantes de la medición de 100 organismos de cada cepa, - tanto en el caso de las regionales como en el de las extranjeras.

2.- Las referidas en la tabla VIII.

3.- Corresponden a las cepas de N. gruberi numeradas como sigue:

13,15,16,24.30.36,48 y 49, en su trabajo taxonómico de 1966.

REFERENCIAS

- Adam K., 1959. The growth of Acanthamoeba sp. in a chemically defined medium, J. Gen. Microbiol., 21; 519-529.
- Adam K., 1964. a. The aminoacid requirements of Acanthamoeba-sp. Neff J. Protozool., 11:98-100.
- Adam K., 1964. b. A comparative study of Hartmannellid amoebae. J. Protozool., 11:423-430.
- Adam K., 1969. Classification of amoebae. DNA and other criteria. Prog. in Protozool., 3rd. Int. Congr. Protozool, (Leningrad), pp. 363.
- Adam K., y D.A. Blewett, 1974. Studies on DNA of Acanthamoeba. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 54:387-393.
- Ali Khan Z. y E. Meerovitch, 1968. A comparative study of the antigens of some histolytica-type strains of Entamoeba. A qualitative and quantitative evaluation of antigens by indirect hemagglutination, gel-precipitation and immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 17:538-539.
- Ali Khan Z. y E. Meerovitch, 1970. Studies on the purification of E. histolytica antigens by gel filtration. I. Some Physicochemical properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol., 16:485-492.

- Anderson K. y A. Jamieson, 1972. Agglutination test for the investigation of the genus Naeqleria. Pathology, 4:273-278.
- Anderson K., A. Jamieson, J.B. Jadin y E. Willaert, 1973. Primary amoebic meningoencephalitis. The Lancet, I:672.
- Andresen N., 1973. The biology of Amoeba. Academic Press, 4:-105.
- Armstrong J. y M. Pereira, 1967. Identification of "Ryan virus" in an amoeba of the genus Hartmannella. Brit. Med. J., 1:212-214.
- Balamuth W. y T. Kawakami, 1967. Antigenic relationships among selected hartmannelid amoebae and amoebae-flagellates. J. Protozool., 14 (Suppl): 31.
- Band R.N., 1961. Biotin a growth requirement for four soil amoebae. Nature, 192:674.
- Band R.N., 1962. The aminoacid requirements of the soil amoeba Hartmannella rhyssodes, Singh. J. Protozool., 9:377-379.
- Baud Ch. A. y J. C. Morard, 1953. Introduction des caracteres-morphologiques submicroscopiques en taxonomie. Application a la classification systematique-des amibes. Proc. 14th Int. Con. Zoology, (Copenhagen): 182-183.

- Bovee E.C., 1953. Morphological identification of free-living-amoebida. Proc. Iowa Acad. Sci., 60:599-615.
- Bovee E.C. y T.L. Jahn, 1966. Mechanism of movement in Taxonomy of Sarcodina III. Orders, Suborders, Families and Subfamilies in the Superorder Loboda. Syst. Zool., 15; 229-240.
- Bovee E.C., 1970. The Lobose Amebas. I, A key to the suborder -conopodina Bovee and Jahn 1966, and descriptions of thirteen new or little known Mayorella. Arch. Protistenk., 112;178-227.
- Callicot J.H., 1968. Amebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the Hartmannella (Acanthamoeba) Naegleria group. Am. J. Clin. Path., 49 (1) 84-91.
- Callicot J.H., M.M. Jones, E.C. Nelson, J.C. Dos Santos. J.P.-Urz, R.J. Duma y J.V. Morris, 1968. Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoeba. J. Am. Med. Ass., 206:579.
- Capron A., A. Vernes. G. Niel y M. Bouvry, 1972. Le diagnostic immunologique de l'amibiase. Med. Chir. Digest., 1:5-13.
- Carosi G., M. Scaglia, G. Filice y E. Willaert, 1977. A comparative electron microscope study of axenically cultivated trophozoites of free-living amoebae

of the genus Acanthamoeba and Naegleria, with special reference to the species N. gruberi -- (Schardinger 1899), N. fowleri (Carter 1970) - and N. jadini (Willaert y le Ray 1973). Arch.-Protistenk. 119:264-273.

Carter R.F., 1968. Primary amoebic meningoencephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. J. Path. Bact., 96:1-25.

Carter R.F., 1969. Sensitivity to amphotericin B of a Naegleria sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. J. Clin. Path., 22: - 470.

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. Path., 100:217-244.

Carter R.F., 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. Trans. R. Soc. - Trop. Med. Hyg., 66:193-213.

Cerva L., 1967. Immunological studies of Hartmannellid amoebae. Folia Parasit., (Praha), 14:19-25.

Cerva L., 1973. Problems of the identity of pathogenic and - - free-living Naegleria. Progress in Protozoology. IVth. Congr. Protozool. (Clermont-Ferrand).:83.

- Corliss J.O., 1962. Taxonomic procedures in classification of Protozoa. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 12:37 - 67.
- Coronado G.R., 1973. Estudio protozoológico e hidrológico de las piscinas de la Ciudad de México y del Estado de Morelos, México. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Crick F.H.C., 1958. On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol., 12:138-163.
- Culbertson C.G., J. Smith y J. Minner, 1958. Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity. Science, 127:1506.
- Culbertson C.G., J. Smith, H. Cohen y J. Minner, 1959. Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba. Am J. Path., 35:185-187.
- Chang S.L., 1971. Small free-living amebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis and resistance. Curr. Top. Comp. Pathobiol., 1:201-254.
- Chang S.L., 1974. Etiological, pathological, epidemiological -- and diagnostical considerations of primary -- amoebic meningoencephalitis. CRC Critical Reviews in Microbiol., pp. 135-159.

- Chatton E., 1953. *Ordre des amoebiens nus ou Amoebaea*. En *Traite de Zoologie*, P.P. Grassé Ed., Paris, Masson et Cie. Tomo I. segundo fascículo, pp. 5-91.
- Das S.R., 1974. Pathogenicity of flagellate stage of Naeqleria aerobia and its bearing on the epidemiology - of exogenous amoebiasis. Proceedings of an International Colloquium, Antwerp. pp. 103-108.
- Das S.R., E. Willaert. y J.B. Jadin. 1974. Studies on mitotic-division in Naeqleria jadini. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 54:141-146.
- Derreumaux A.L., J.B. Jadin, E. Willaert y R. Moret. 1974. Action du chlore sur les amibes de l'eau. Proceedings of an International Colloquium, Antwerp. pp. 191-204.
- Dobzhansky T., 1977. *Evolution*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Fowler M. y R.F. Carter, 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp. Brit. Med. J., 2: 740-742.
- Fulton C., 1970. Amebo-flagellates as research partners: the laboratory biology of Naeqleria and Tetramitus. Meth. Cell Physiol., 4:341-376.
- Goldman M., 1960. Antigenic analysis of Entamoeba histolytica

by means of stained amoebae. Exptl. Parasit.,
9:25-36.

Grell K.G., 1973. Protozoology, Springer-verlag Ed. New York--
Heidelberg Berlin.

Griffin J.L., 1972. Temperature Tolerance of pathogenic and --
non-pathogenic free-living amoebae. Sci., 178:
869-870.

Hermanne J., 1974. Meningo-encephalite amibienne primitive. As
pect clinique. Proceedings of an Internatio--
nal Colloquium. Antwerp. pp. 63-71.

Honigberg B.M. et al., 1964. A revised classification of Phy--
lum Protozoa. J. Protozool., 11:7-20.

Jadin J.B., y J. Hermanne, 1971. Trois cas de meningoencephali
te amibienne primitive en Europe occidentale,
a Anvers. Bol. Acad. Nat. de Med., 155:232- -
238.

Jadin J.B., Y E. Willaert, 1972. Trois cas de meningoencephali
te amibienne primitive a Naegleria gruberi -
observees a Anvers (Belgique). Protistologica.
8:95-100.

Jadin J.B., 1973. De la menigoencephalite amibienne et du pou
voir pathogene des amibes limax. Ann. Biol. -
12:305-342.

Jadin J.B., 1974. De la dispersion et du cycle des amibes li--

- bres. Proceedings of an International Colloquium. Antwerp. pp. 147-161.
- Jager B.V. y W.P. Stamm, 1972. Brain abscess caused by free-living amoeba, probably of the genus Hartmannella in a patient with Hodgkin's disease. The Lancet. pp. 1343-1345.
- Jahn J.L., 1949. How to know the Protozoa. W.M. C. Brown Company Publishers, Iowa U.S.A., pp. 110-127.
- Jahn T.C., E.C. Bovee y F. Jahn, 1979. How to know the Protozoa. W.M.C. Brown Co., Publishers, Iowa, U.S.A., pp. 38-42.
- Jahnes W., H. Fullmer y C. Li. 1957. Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 96:484-488.
- Jeon K.W., 1973. The Biology of Amoeba. Academic Press. Cap. 2: 38-39
- Jepps M.W., 1956. The Protozoa, Sarcodina. Oliver and Boyd, -- Edinburgh and London.
- Jirovec O., 1967. Parasitisme artificiel des protozoaires libres. Ann. Parasit. Hum. Comp., 42:133-140.
- Jirovec O., 1970. Amöben der Limax-gruppe als Erreger von tödlichen meningoencephaliden des Menschen. C. R. V^e Congr. Int. Mal. Inf. A IV/1 : 81-91.
- Kaspraz W., 1974. Studies on some pathogenic strains of free--

- living amoebae isolated from lakes in Poland.
Proc. Int. Coll. Antwerp. pp. 127-133.
- Kenney M., 1971. The micro-kolmer complement fixation test in-routine screening for soil ameba infection. -
Health Lab. Sci., 8:5.
- Lastovica A.J., 1975. Ultrastructure of pathogenic and non-pathogenic Naegleria amoebae. Trans. R. Soc. -- Trop. Med. Hyg., 69 (2):286-287.
- Little J., 1968. Effect of ionizing radiation on cell division in an amoeboid cell. Radiat. Res., 35:132-146.
- López-Ochoterena E., y M.T. Roure-Cane. 1970. Lista taxonómica comentada de protozoarios de vida libre de México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., 31:23-67.
- Luft J.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9:409-414.
- Lunde M.N. y L. S. Diamond, 1969. Studies on antigens from axenically cultivated Entamoeba histolytica and E. histolytica-like amoebae. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18:1-6.
- Mackinnon D.L., 1961. An introduction to the study of Protozoa. Oxford University Press. 1:23-30.
- Margulis L.S., 1967. The origin of eucellular animals and plants. J. Theoret. Biol., 14:225.
- Margulis L.S., 1968. On the evolution of early prokaryotes and

eukaryotes. Science. 161:1020.

- Margulis L.S., 1971. The origin of the eukaryotes. Sci. Amer., 225:48.
- Martin J.J., 1974. Neuropathological study of three cases of primary amoebic meningoencephalitis. Proc. -- Int. Coll. Antwerp, pp. 81-95.
- Martínez A. J., R.J. Duma, D.G. Fultz y R.B. Finley. 1974. Ultrastructural study of trophozoites and cysts of Acanthamoeba-Hartmannella and Naegleria -- species. 32nd Ann. Proc. Electron Microsc. -- Soc. Amer., St. Louis, Missouri.
- Neal R.A., 1957. Virulence in Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 51:313.
- Nissembaum G., 1953. A combined method for the rapid fixation and adhesion of ciliates and flagellates. -- Science, 118:31-32.
- Page F.C., 1966. Taxonomical criteria for small amoebae, with a re-definition of the genera Hartmannella -- and Acanthamoeba and descriptions of three -- new species. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin.
- Page F.C., 1967. Taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of three new species of Hartmannella -- and three of Vahlkampfia. J. Protozool., --

14:499-521.

- Page F.C., 1967. Re-definition of the genus Acanthamoeba with descriptions of three species. J. Protozool., 14(4):709-724.
- Page F.C., 1974. A further study of taxonomic criteria for li max amoebae. With descriptions of new species and a key to genera. Arch. Protistenk., 116:-149-184.
- Palin A.T., 1957. The determination of free and combined chlorine in water by the use of N.N-diethyl-p-phenylenediamine. J. Am. W.W. Ass., 49:873-880.
- Patras D. y J. Andujar. 1966. Meningoencephalitis due to Hartmannella (Acanthamoeba). Amer. J. Clin. Path., 46:226-233.
- Pittam M.D., 1963. Studies of an amoeba-flagellate Naegleria - gruberi. Q. Journ. Micr. Sci., 104:513-529.
- Pussard M., 1963. La caryocinese des amibes du genre Acanthamoeba (Famille des Hartmannellidae) C.R. Acad. Sci., 256:2695-2697.
- Pussard M., 1964a. Cytologie d'une amibe terricole, Acanthamoeba terricola n. sp. Ann. Sci. Nat. Zool. Paris. 12^e ser., 6:565-600.
- Pussard M., 1964b. Acanthamoeba comandoni n. sp. Comparaison avec Acanthamoeba terricola, Pussard. Rev. -

Ecol. Biol. Sol., 1:587-610.

- Pussard M., 1972. Comparaison morphologique de quatre souches-
d'Acanthamoeba du groupe astronyxis-comandoni.
J. Protozool., 19:557.
- Pussard M., 1973. Modalites de la division nucleaire et taxono-
mie chez les amibes. Revision des notions de-
promitose, mesamitose et metamitose. Protisto
logica, 9:163 - 173.
- Rafalko J.S., 1951. Mitotic division in the amoeba-flagellate-
Tetramitus rostratus. J. Morphol., 89:71-90.
- Ray D.L. y R.E. Hayes. 1954. Hartmannella astronyxis a new --
species of free-living ameba. J. Morphol., -
95:159-188.
- Rico-Ferrat G., 1975. Aspectos biológicos de los protozoarios de
aguas negras. Tesis profesional. Facultad de Cien-
cias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rivera F., A. Ortega, E. López-Ochoterena y M.E. Paz, 1979. A -
quantitative morphological and ecological stu-
dy of protozoa polluting tap-waters in México
City. Trans. Amer. Micr. Soc., 98(3):465-469.
- Robertson J.D., 1959. The ultrastructure of cell membranes and
their derivatives. Biochem. Soc. Symp., 16:3
- Rondanelli E.G., G. Carosi, G. Filice y M. Scaglia, 1974. Attua-
lità in tema di amebiasi: nasografia, accerta

- mento diagnostico, quadri ultrastrutturali -
delle amebe patogene per l'uomo. Le Basi bio
logiche della Medicina Moderna, III:291-311.
- Saygi G., 1971. Studies on free-living amoebae. Ph. D. Thesis.
Liverpool.
- Schuster F., 1963. An electron microscope study of the amoeb-
flagellate Naegleria gruberi (Schardinger). --
I.- The amoeboid and flagellate stages. J. --
Protozool., 10:297-313.
- Schuster F., 1969. Intranuclear virus-like bodies in the amoe-
bo-flagellate Naegleria gruberi. J. Protozool.,
16:724-727.
- Schuster F., y T.H. Dunnebacke, 1974a. Virus-like particles --
and an Unassociated infectious agent in ---
amoebae of the genus Naegleria. Ann. Soc. Bel
ge Med. Trop., 54(4/4):359-370.
- Schuster F. y T.H. Dunnebacke, 1974b. Growth at 37°C of the --
EGs strain of the amoeb-flagellate Naegleria
gruberi containing virus-like particles. I.-
Nuclear changes. J. Invert. Path., 23:172-181.
- Sen A., S. Mukerjee y J.C. Ray, 1961. Observations on the anti
genic make-up of amoebae. Ann. Biochem. Exptl.
Med., 21:323-326.
- Siddiqui W.A., y W. Balamuth, 1965. Serological comparison of-

selected parasitic and free-living amoebae in vitro, using diffusion-precipitation and fluorescent-antibody techniques. J. Protozool., 13:175-182.

Singh B.N., 1952. Nuclear division in nine species of small -- free-living amoebae and its bearing on the -- classification of the Order Amoebida. Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B 236:405-461.

Singh B.N., 1953. A new system of classifying amoebae based on their nuclear division and possible phylogenetic relationships. Bul. Nat. Inst. Sci., India, New Delhi, No. 7.

Singh B.N., S. Mathew, R. Sharma y U. Saxena, 1958. Virulence of strains of Entamoeba histolytica from human carrier and acute cases in rats. V. of Sci. Industr. Res., New Delhi. 17C, pp. 201.

Singh B.N., 1963. Recent advances in soil protozoology. Proceedings of the first Summer School of Zoology (Simla), pp. 79-103.

Singh B.N. y S.R. Das. 1970. Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the Order Amoebida. Phil. Trans. Roy. Soc. 250:435-476.

- Sokal R. Robert y J.F. Rohlf. 1969. Biometry. Ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sotelo-Avila C., F.M. Taylor y C.W. Ewing. 1974. Primary amebic meningoencephalitis in a healthy 7-year old boy. J. Ped., 85:131-136.
- Sotelo-Avila C., A.J. Martínez, E. Willaert y W. P. Stamm. 1975. Amebic encephalitis, probably from Acanthamoeba sp. Clinical, morphological, immunofluorescent antibody and ultrastructural observations. Abstr. 27th Ann. Meeting Amer. Acad. Neurol.
- Talis B., M. Lahav y S. Ben-Efrim, 1963. Immunological study on some strains of Entamoeba histolytica. Bull. Res. Counc. Israel. 10E:130-136.
- Tomasini O.P., 1975. Aspectos biológicos de los protozoarios del agua potable. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vandepitte J., 1974. A new case of primary amoebic meningoencephalitis observed in Belgium. Proc. Int. Coll. Antwerp, pp. 205-216.
- Vickerman K., 1962. Patterns of cellular organization in limax amoebae. An electron microscope study. Exptl. Cell Res., 26:497-519.

- Visvesvara G. y C. Callaway, 1974. Light and electron microscopic observations on the pathogenesis of Naegleria fowleri in mouse brain and tissue cultures. J. Protozool., 21:239-259.
- Wang S. y H. Feldman, 1961. Occurrence of Acanthamoeba in tissue cultures inoculated with human pharyngeal --- swabs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 1:50-53.
- Wang S., 1967. Isolation of Hartmannella species from human --- throats. New Eng. J. Med. 277: 1175-1179.
- Willaert E., 1971. Isolement et culture in vitro des amibes du genre Naegleria. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 51:701-708.
- Willaert E. y D. Le Ray, 1973. Caracteres morphologiques et immunologiques de Naegleria jadini n. sp. (Amoebida, Vahlkampfiidae). Protistologica, 9: 417-426.
- Willaert E., 1974. Primary amoebic meningoencephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 54:205-216.
- Willaert E., 1974. Etude immunotaxonomique du genre Naegleria. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 54:395-404.
- Willaert E., 1976. Etude immunotaxonomique des genres Naegleria et Acanthamoeba (Protozoa: Amoebida). Ac

ta Zoologica et Pathologica Antverpiensia, --

Bull. Soc. Roy. de Zool. D'Anvers, 65:201-217.

L A M I N A I

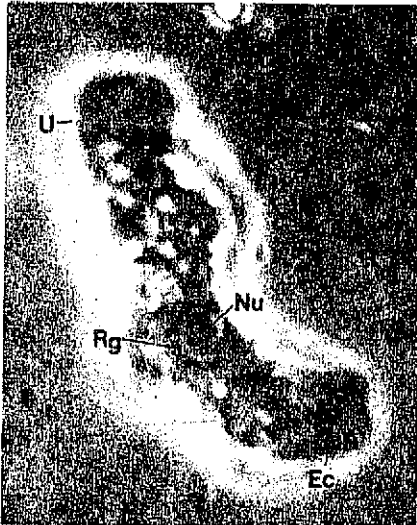
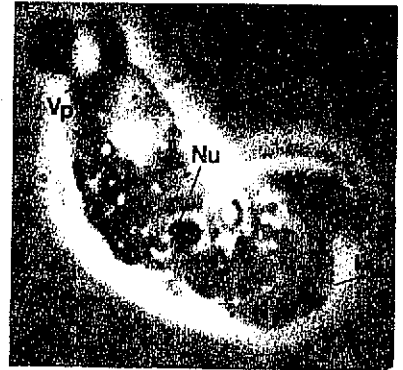
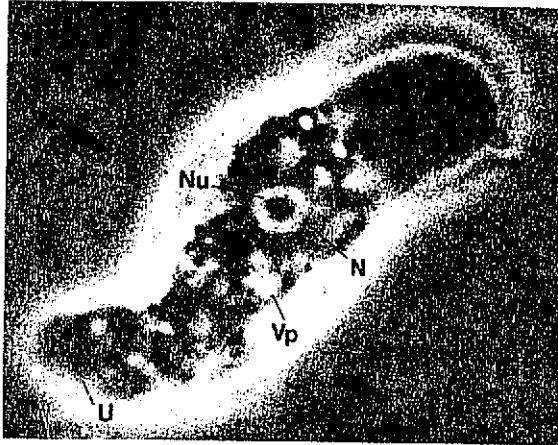
FIGURA 1.- Trofozoíto de N. gruberi que muestra la típica forma limax o de babosa. La. lobópodo anterior; N, núcleo; U, uroide-3600 X .

FIGURA 2.- Trofozoíto de N. gruberi que exhibe la formación de dos lobópodos anteriores y una vacuola pulsátil en la región del uroide. La. lobópodos anteriores; Nu, nucléolo; Vp, vacuola pulsátil. 3100 X.

FIGURA 3.- Trofozoíto de N. gruberi en el que se distingue fácilmente el ectoplasma de la región anterior en forma de lobópodo. El núcleo es particularmente visible y se puede observar en su interior el cariosoma y una región granulosa por fuera de la envoltura nuclear. Ec, ectoplasma; Nu , núcleo; Rg, región granulosa perinuclear; U, uroide 3120 X .

FIGURA 4.- Forma trofozoide de N. gruberi que muestra la emisión de un pseudópodo lateral surgido de la región central de la ameba que le permite modificar su dirección. Pl, pseudópodo lateral; Nu, nucléolo; U, uroide; La, lobópodo anterior. 3000 X.

LAMINA I



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A II

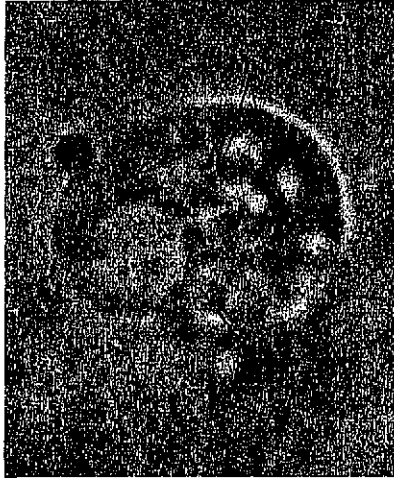
FIGURA 1.- Trofozoíto de N. gruberi en el proceso de asumir la forma esférica. Coloración supravital con verde de Jano. Vp, vacuola pulsátil; Mi, mitocondrias; Nu, nucléolo o cariosoma. 33-00 X .

FIGURA 2.- Forma uniflagelada de N. gruberi después de la inducción con agua destilada. F, flagelo; Da, depresión anterior; S, soma. 3000 X .

FIGURA 3.- Forma flagelada elipsoidal de N. gruberi en la que se observa la vacuola pulsátil (Vp). como es lo habitual el flagelo (F), es ligeramente más largo que la célula. 3000 X .

FIGURA 4.- Fase flagelar de N. gruberi con soma esférico. F, flagelo; Vp, vacuola pulsátil; S, soma. 2200 X .

LAMINA II



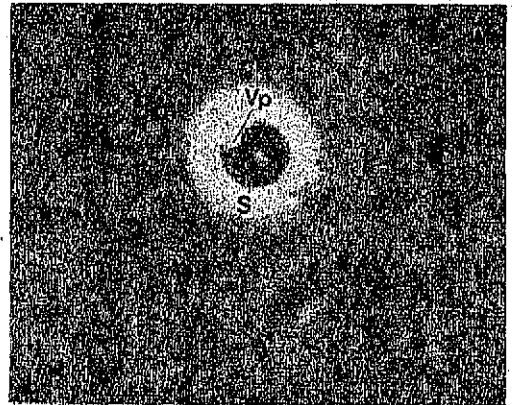
1



2



3



4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A III

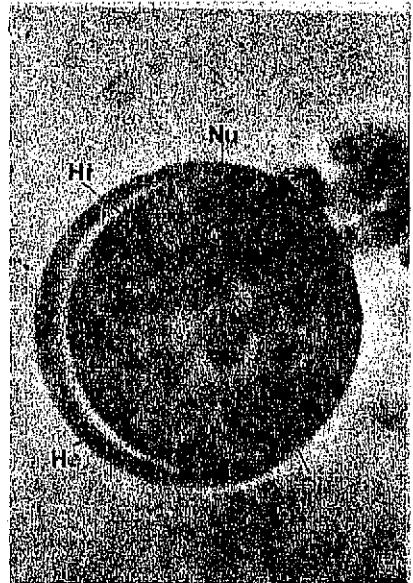
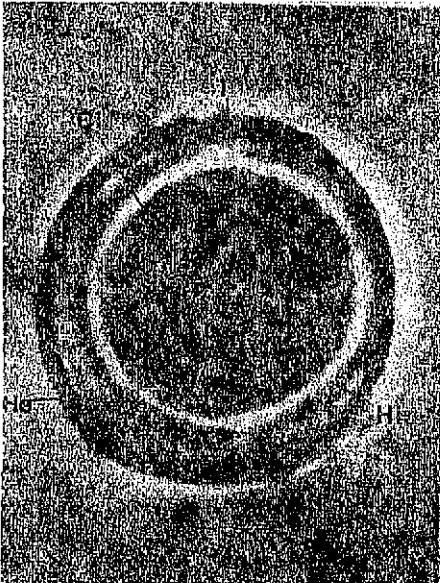
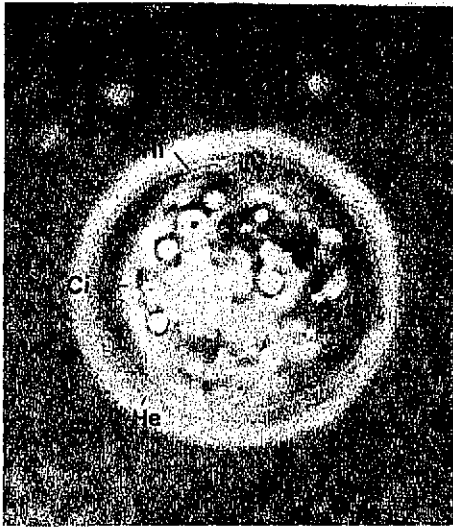
FIGURA 1.- Fase quística temprana de N. gruberi. Se observan - las dos hojas que constituyen la pared del quiste y el citoplasma granuloso. He, hoja externa del quiste; Hi, hoja interna del quiste; Ci, citoplasma. 2800 X .

FIGURA 2.- Quiste maduro de N. gruberi inmerso en un enjambre - bacteriano. He, hoja externa del quiste; Hi, hoja interna del quiste; Ci, citoplasma. 2800 X .

FIGURA 3.- Quiste maduro de N. gruberi teñido con coloración supravital que evidencia los componentes lípidos de la pared quística y de los tapones de los poros. T, tapón; He, hoja externa del quiste; Hi, hoja interna del quiste; Ci, citoplasma. 3700 X. Sudán negro.

FIGURA 4.- Quiste maduro de N. gruberi coloreado supravitalmente (Sudán negro), en el que pueden distinguirse las dos hojas de la pared quística. He, hoja externa; Hi, hoja interna; Nu, nucléolo; Ci, citoplasma . 3700 X .

LAMINA III



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A IV

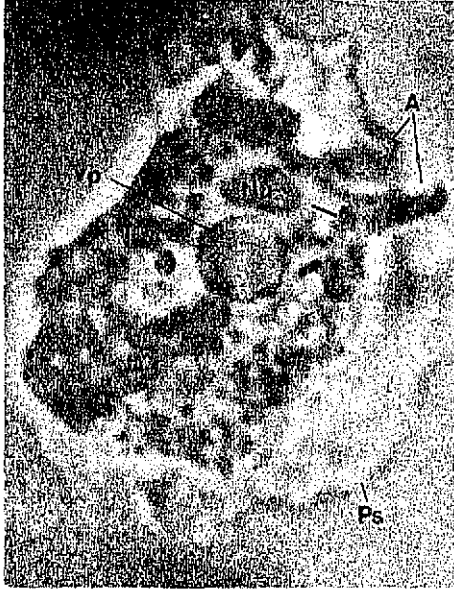
FIGURA 1.- Trofozoïto de Acanthamoeba astronxix en el que se observa un pseudópodo anterior ancho y varias proyecciones finas del ectoplasma que constituyen los acantopodios. A, acantopodios; Ps, pseudópodo ancho; Vp, vacuola pulsátil; N, nucléolo; U, uroïde. 2800 X .

FIGURA 2.- Forma trofozoïde de Acanthamoeba astronxix en la que la formación de acantopodios es predominante; A, acantopodios; Vp, vacuola pulsátil; U, uroïde 3500 X .

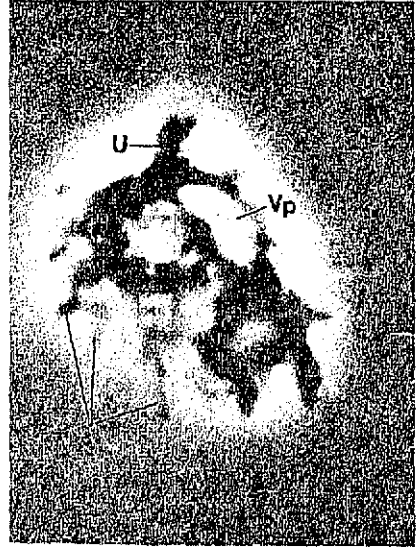
FIGURA 3.- Forma trofozoïde de A. astronxix en la que se observa la región del uroïde. Ps, pseudópodo anterior; U, región del uroïde; Cd, copa digestiva; B, bacterias próximas a la copa. 3000 X .

FIGURA 4.- Quiste de A. astronxix. Ec, ectoquiste; En, endoquiste; Ci, citoplasma. 4000 X .

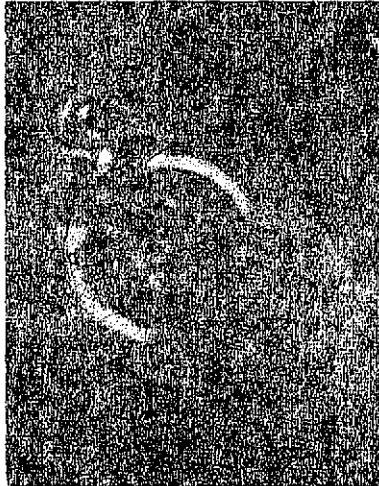
LAMINA IV



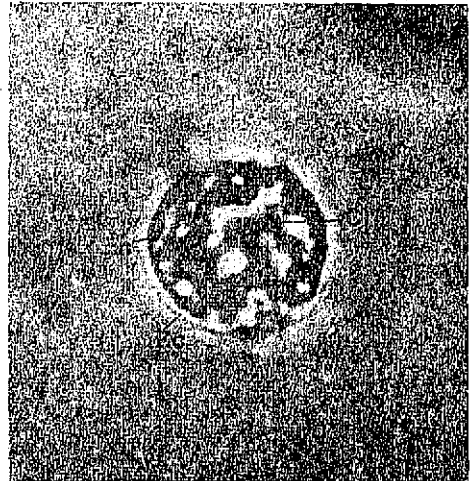
1



2



3



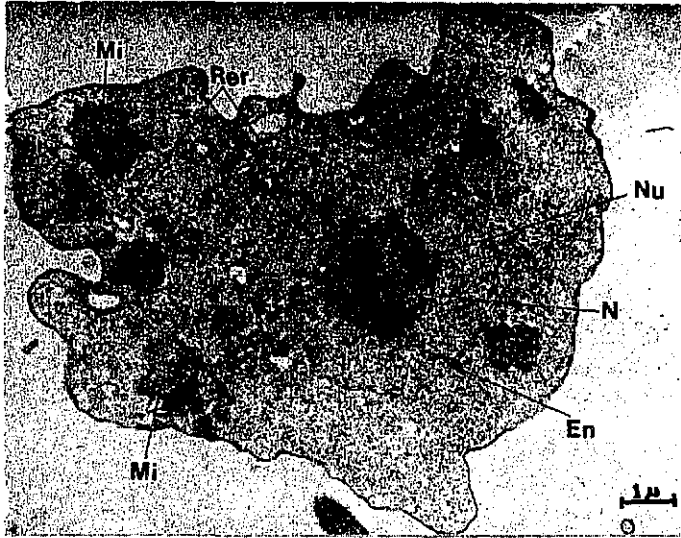
4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A V

Micrografía electrónica de una amiba de la especie N. gruberi. N, núcleo; Nu, nucléolo; En, envoltura nuclear; Mi, mitocondrias; Ps, Pseudópodo; Rer, retículo endoplásmico rugoso 12000 X. - Barra 1 u.

LAMINA V



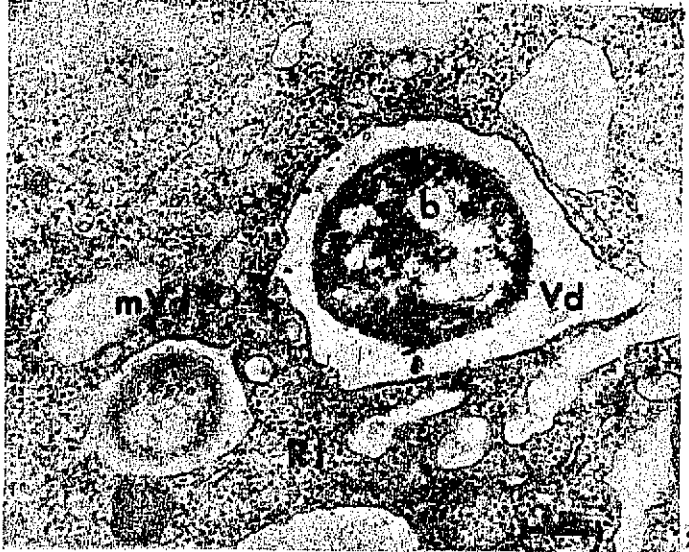
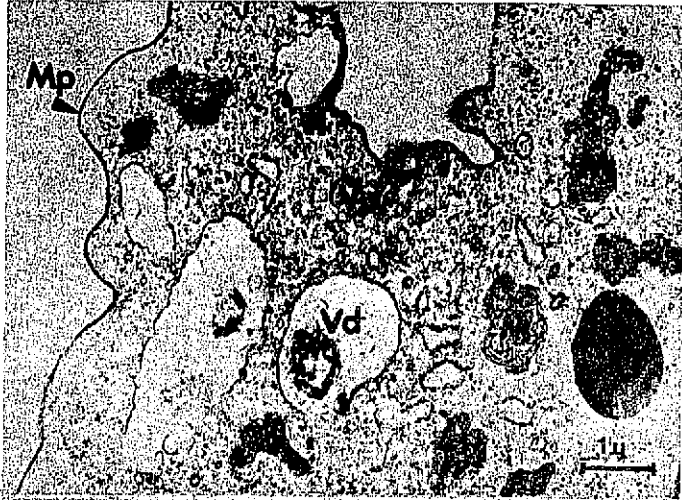
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A VI

FIGURA 1.- Micrografía electrónica de N. gruberi en la que se observa la membrana plasmática (Mp), vacuolas de pinocitosis (Vp), mitocondrias (M), ovoides o en forma de clava y una inclusión de lípidos (Li). 21750 X. Barra 1 u.

FIGURA 2.- Micrografía electrónica de N. guberi en la que se observa la vacuola digestiva (Vd) y su membrana limitante (Mvd), así como los residuos de la digestión de una bacteria (b). También se observan numerosos ribosomas libres (Rl). 43500 X . Barra 0.5 u.

LAMINA VI



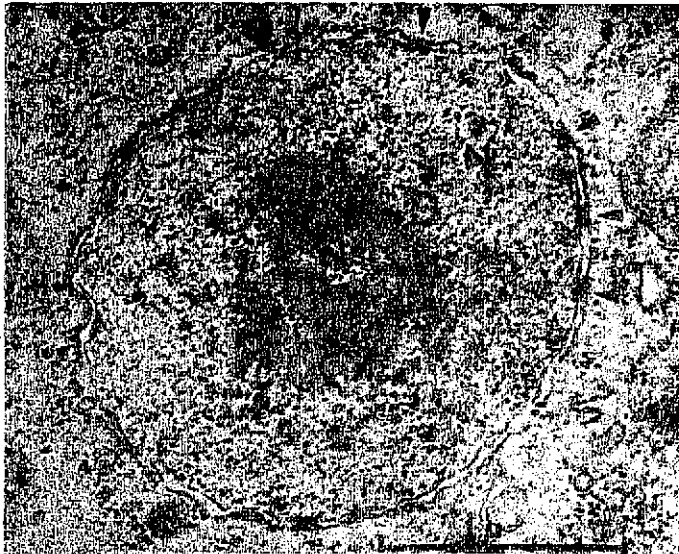
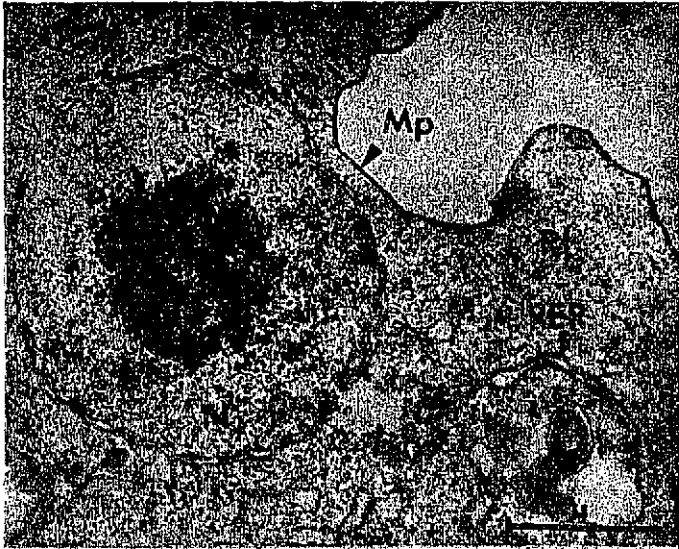
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A VII

FIGURA 1.- Micrografía electrónica de N. gruberi en la que se observa el núcleo (N) y el nucléolo (Ncl), el retículo endoplásmico rugoso (Rer), la membrana plasmática (Mp), los ribosomas libres (Rl) y las mitocondrias (M). 29000 X. Barra 1 u.

FIGURA 2.- Micrografía electrónica de N. gruberi en la que se observa la envoltura nuclear con sus poros (puntas de flecha) y con ribosomas adheridos a la hoja externa (doble asterisco), N (núcleo). 43500 X . Barra 1 u .

LAMINA VII



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A VIII

FIGURA 1.- Micrografía electrónica que permite evidenciar la abundancia de retículo endoplásmico rugoso (puntas de flecha), así como la existencia de lisosomas primarios (L), ribosomas libres (Rl), núcleo (N), y los poros nucleares (Pn). 14500 X. Barra 1 u .

FIGURA 2.- Micrografía electrónica de N. gruberi que permite evidenciar un cuerpo residual (Cr), la vacuola digestiva (Vd), los ribosomas libres (Rl) y el retículo endoplásmico rugoso - (Rer) 14500 X. Barra 1 u .

LAMINA VIII



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A IX

FIGURA 1.- Micrografía electrónica de N. gruberi en la que se evidencian además de las mitocondrias (M), el núcleo (N) el nucléolo (Ncl) y sobre todo el espongioma (E) adyacente a la vacuola contráctil (Vc). 14500 X. Barra 1 u .

FIGURA 2.- Micrografía electrónica de N. gruberi que ilustra la presencia del ectoplasma (Ep) entre la membrana plasmática y el endoplasma, así como la presencia de cuerpos intramitocondriales (Cim) en mitocondrias de tipo esférico (M) 14500 X. Barra 1 u . En el recuadro se muestra un par de mitocondrias con los cuerpos de inclusión. 50000 X . Barra 0.2u.

LAMINA IX

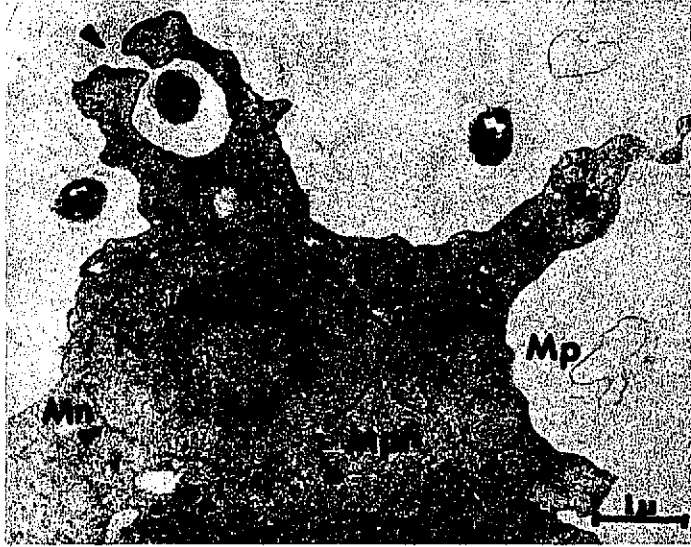


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L A M I N A X

Micrografía electrónica de N. gruberi que pone en evidencia la presencia de mitocondrias perinucleares (Mpn), la de los pseudópodos (Ps) así como el proceso de fagocitosis, señalado por la punta de flecha. N, núcleo; Mp, membrana plasmática. Mn, membrana nuclear 14000 X. Barra 1 u.

LAMINAX



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN