



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA
Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Caracterización bioquímica parcial de las
proteasas de *Acanthamoeba mauritaniensis*”**

Tesis que presenta

Q.F.B. José Daniel Coronado Velázquez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directores de la tesis

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

Dr. José de Jesús Serrano Luna

México, Distrito Federal

JULIO, 2013

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas y el Dr. José de Jesús Serrano Luna. Así mismo este trabajo estuvo bajo la asesoría de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui y de la Dra. Abigail Betanzos Fernández.

Durante el desarrollo de este trabajo el autor fue becario de CONACyT con número 418624, además fue apoyado por el proyecto SEP-CONACyT con número 128317.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis tutores y amigos. Gracias Dra. Mineko Shibayama y Dr. Jesús Serrano Luna por el apoyo y estímulo en mi formación personal y científica.

Gracias a los investigadores que evaluaron y tuvieron tiempo para dirigir este trabajo desde su planteamiento hasta la conclusión del mismo. Gracias a la Dra. Rossana Arroyo Verástegui y a la Dra. Abigail Betanzos Fernández.

Gracias a todo mi equipo de trabajo, a las auxiliares M. en C. Karla Montserrat Gil Becerril por su apoyo en las técnicas de Biología Molecular; a la M. en C. Dora Angélica Silva Olivares por su apoyo con la microscopia confocal y en el manejo de cultivos celulares; a la Q.F.B. Silvia Galindo Gómez por su apoyo con los cultivos amibianos; a los técnicos Don Dagoberto Carrasco y Claudia Galindo por su apoyo técnico en la preparación del material de laboratorio; Martha Dueñas Mejía e Irma Miranda Orea por su apoyo en todos los aspectos secretariales y administrativos; al M. en C. Jaime Escobar Herrera por su apoyo técnico en la microscopia confocal.

Gracias a mi pareja Guadalupe Elide Morales Figueroa por su apoyo y amor incondicional en este camino de la ciencia.

Gracias a mis padres, José Isaías Coronado y Camerina Velázquez por su gran apoyo, su amor, su paciencia y estímulo brindado a su hijo.

Gracias a mis hermanas, María Luisa, Elizabeth y Ana Karina Coronado por compartir grandes momentos y por aguantarme todo el tiempo que hemos vivido.

Gracias a mis tíos, Yolanda Velázquez y Rafal León por darnos cobijo a mí y a mi novia Elide en su casa en los primeros meses del curso de la maestría, así como a mis primos Carlos Rafael y Rodrigo León por la convivencia en esos meses.

Gracias a mis compañeros y amigos, Moisés Martínez Castillo, Sarai Loza Medrano, Roberto Cárdenas y Paula Guzmán por su amistad y apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A mi familia, a mi pareja, a mis amigos y a mis mentores por su apoyo constante, por esa motivación que brindaron en los buenos y malos momentos.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------|----|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1. Amibas de vida libre..... | 5 |
| 1.2. <i>Acanthamoeba</i> spp..... | 5 |
| 1.3. CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA..... | 6 |
| 1.4. CICLO DE VIDA Y MORFOLOGÍA..... | 7 |
| 1.5. EPIDEMIOLOGÍA..... | 11 |
| 1.6. QUERATITIS AMIBIANA (QA)..... | 12 |
| 1.6.1. Histología de la córnea..... | 13 |
| 1.6.2. Manifestaciones clínicas..... | 15 |
| 1.6.3. Diagnóstico de QA..... | 15 |
| 1.6.4. Tratamiento para la QA..... | 16 |
| 1.7. ENCEFALITIS AMIBIANA GRANULOMATOSA (EAG)..... | 17 |
| 1.7.1. Diagnóstico de EAG..... | 19 |
| 1.7.2. Tratamiento de la EAG..... | 19 |
| 1.8. DERMATITIS AMIBIANA (DA)..... | 19 |
| 1.8.1. Diagnóstico de la DA..... | 21 |
| 1.8.2. Tratamiento de la DA..... | 21 |
| 1.9. FACTORES DE VIRULENCIA..... | 21 |

| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 2. PROTEASAS..... | 23 |
| 2.1. Inhibidores de proteasas..... | 28 |
| 3.UNIONES ESTRECHAS..... | 28 |
| 3.1. PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES..... | 30 |
| 3.1.1. PROTEÍNAS SUBMEMBRANALES..... | 32 |
| 4. ANTECEDENTES DIRECTOS..... | 35 |
| 5. JUSTIFICACIÓN..... | 38 |
| 6. HIPÓTESIS..... | 39 |
| 7. OBJETIVOS..... | 39 |
| 7.1. OBJETIVO GENERAL..... | 39 |
| 7.2. OBJETIVOS PARTICULARES..... | 39 |
| 8. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 41 |
| 8.1. Cultivos celulares..... | 41 |
| 8.2. Inhibidores de proteasas..... | 42 |
| 8.3. Obtención de muestras..... | 42 |
| 8.4. Zimogramas..... | 43 |
| 8.5. Determinación de la actividad proteolítica con azocoll..... | 44 |
| 8.6. Efecto citopático..... | 45 |
| 8.7. Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)..... | 45 |
| 8.8. Inmunofluorescencia indirecta..... | 46 |
| 8.9. Western blot..... | 47 |

| | |
|-----------------------|----|
| 9. RESULTADOS..... | 50 |
| 10. DISCUSIÓN..... | 73 |
| 11. CONCLUSIONES..... | 80 |
| 12. PERSPECTIVAS..... | 81 |
| 13. BIBLIOGRAFÍA..... | 82 |
| 14. APÉNDICE..... | 90 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Clasificación de protistas..... | 7 |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> | 9 |
| Figura 3. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de <i>A. castellanii</i> y <i>A. polyphaga</i> | 11 |
| Figura 4. Caso de QA producida por <i>Acanthamoeba castellanii</i> | 13 |
| Figura 5. Estructura de la córnea..... | 14 |
| Figura 6. Eventos fisiopatológicos de la QA..... | 17 |
| Figura 7. Caso fatal de EAG producida por <i>Acanthamoeba</i> | 18 |
| Figura 8. Úlcera cutánea necrótica causada por <i>Acanthamoeba</i> spp. presentada en paciente con VIH..... | 20 |
| Figura 9. Micrografías de MEB de trofozoítos de <i>A. castellanii</i> desplegando bocas fagocíticas hacia células de epitelio corneal de hámster..... | 22 |
| Figura 10. Clasificación de las proteasas según el aminoácido presente en su sitio activo..... | 24 |
| Figura 11. Localización y estructura molecular de las UE en células epiteliales | 29 |
| Figura 12. Análisis ultraestructural de trofozoítos de <i>Acanthamoeba mauritaniensis</i> | 59 |
| Figura 13. Ensayos de efecto citopático sobre células MDCK..... | 60 |
| Figura 14. Zimogramas de geles SDS-PAGE al 12% co-polimerizados con gelatina porcina al 0.1% e incubados a pH 7.0..... | 61 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15. Efecto del pH y temperatura en los patrones proteolíticos de extractos totales de <i>A. mauritaniensis</i> | 61 |
| Figura 16. Efecto de los inhibidores en la actividad proteolítica de extractos totales de <i>A. mauritaniensis</i> | 62 |
| Figura 17. Efecto del pH en los patrones proteolíticos del medio condicionado de <i>A. mauritaniensis</i> incubados a 37°C..... | 62 |
| Figura 18. Efecto de los inhibidores de la actividad proteolítica del medio condicionado de <i>A. mauritaniensis</i> | 63 |
| Figura 19. Actividad específica de proteasas en extracto total de <i>A. mauritaniensis</i> usando azocoll como sustrato e incubado con inhibidores de proteasas específicos..... | 65 |
| Figura 20. Actividad específica de proteasas en medio condicionado de <i>A. mauritaniensis</i> usando azocoll como sustrato e incubado con inhibidores de proteasas específicos..... | 66 |
| Figura 21. Efecto citopático sobre células MDCK en interacción con trofozoítos de <i>A. mauritaniensis</i> en relación 1:2..... | 67 |
| Figura 22. Efecto citopático sobre células RCE1 en interacción con trofozoítos de <i>A. mauritaniensis</i> en relación 1:1..... | 68 |
| Figura 23. Análisis de la localización de la proteína ZO-1 en células MDCK..... | 69 |
| Figura 24. Análisis de la localización de la proteína claudina-1 en células MDCK..... | 70 |
| Figura 25. Análisis de la localización de la proteína ocludina en células MDCK..... | 71 |

Figura 26. Degradación de la proteína de unión estrecha ZO-1..... 72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies patógenas y no patógenas de *Acanthamoeba*..... 8

Tabla 2. Inhibidores de proteasas..... 28

Tabla 3. Clasificación de las proteínas integrales de las UE's..... 37

Tabla 4. Concentración de Inhibidores de proteasas.....42

Tabla 5. Clasificación de bandas proteolíticas obtenidas en los zimogramas..... 64

RESUMEN

Acanthamoeba spp. pertenece al grupo de protozoarios conocidos como amibas de vida libre, se encuentran distribuidos ampliamente por todo el mundo, habitando en el suelo, cuerpos de agua e incluso en soluciones para lentes de contacto. Esta amiba es el agente causal de la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) y se presenta en individuos con algún compromiso en el sistema inmunológico. La infección en la córnea es denominada queratitis amibiana (QA), la cual se presenta principalmente en usuarios de lentes de contacto sanos. Las proteasas han sido descritas como mecanismos de patogenicidad en diferentes protozoarios. En nuestro grupo de investigación mediante el modelo de la córnea de hámster (*Mesocricetus auratus*) se observó que *A. castellanii* y *A. polyphaga* fueron capaces de desprender las células del epitelio corneal y se observó un daño a distancia en las células aladas. Se sabe que el aislado ambiental *A. mauritaniensis* produce daño *in vitro*. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar bioquímicamente a las proteasas de esta amiba, así como su posible papel en la alteración de las uniones estrechas (UE) utilizando como modelo células MDCK y queratinocitos de la línea celular RCE1. Como resultados se tiene que *A. mauritaniensis* presenta diferentes patrones proteolíticos, en zimogramas de extractos totales, así como también en el medio condicionado. Cuando estos son pre-incubados con los inhibidores de proteasas de serina aprotinina y PMSF, la actividad proteolítica disminuye. Con los ensayos de actividad proteolítica utilizando un sustrato cromogénico (Azocoll) se confirmó que el principal tipo de proteasas que tiene *A. mauritaniensis* son del tipo serina y en menor cantidad del tipo cisteína y metalo-proteasas. También se encontró que esta amiba es capaz de causar un efecto citopático sobre las células MDCK y RCE1 provocando la separación de las uniones intercelulares. Por otra parte, se encontró que al incubar a los trofozoítos de *A. mauritaniensis* con las células MDCK el marcaje de las proteínas de la UE, ZO-1, claudina-1 y ocludina disminuía con el tiempo de incubación. Tomando en cuenta todos los resultados, sugieren

que el aislado ambiental *A. mauritaniensis* tiene una alta actividad de proteasas y que a través de éstas podría degradar a las proteínas de las uniones estrechas ZO-1, claudina-1 y ocludina. Adicionalmente, esta amiba podría ser capaz de producir QA, al igual que los aislados clínicos de esta patología.

ABSTRACT

Acanthamoeba spp. is a free-living amoeba with a wide distribution in nature and found in soil, salt and fresh water, air conditioned filters, contact lens and lens cases. Occasionally, these organisms can infect the human eye producing the amoebic keratitis (AK), granulomatous amoebic encephalitis (GAE), and in some cases skin infections. Both GAE and skin lesions are seen in immunocompromised patients, whereas AK is commonly seen in contact lens wearers with a deficient hygiene. The proteases have been considered as part of the mechanisms of damage in opportunistic microorganisms such as *Acanthamoeba*. In a previous work, using a model of AK in hamster we reported that *A. castellanii* and *A. polyphaga* were able to detach the cells of the corneal epithelium, in early stages of infection. The environmental isolate *A. mauritaniensis* can produce *in vitro* damage. The objective of the present work was to analyze biochemically the proteases of this amoeba, using SDS-PAGE gels co-polymerized with porcine gelatin and also using a chromogenic substrate (Azocoll). On the other hand, we also studied the possible role in the alteration of the tight junction (TJs) proteins, in MDCK and RCE1 cell cultures. To determine the type of proteases present in *A. mauritaniensis* we used different inhibitors of these enzymes. The results showed that the zymograms presented different patterns of proteolytic activities when total amoebic extracts and conditioned medium were used. When we added the serine protease inhibitors, aprotinin and PMSF, into the total extracts and the secretion products the protease activity was almost abolished. The chromogenic substrate assays confirmed that the main protease activity is of the serine type, and PMSF was the main protease inhibitor that significantly decreased the activity. Also we found that this amoeba is capable to produce serious cytopathic effect on MDCK and RCE1 cultures and also produced the alteration of TJ's proteins on MDCK cells. These results suggest that an environmental isolated strain *A. mauritaniensis* has a high protease activity and probably is capable to produce AK, similarly to other AK isolates.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre son microorganismos eucariotas distribuidos ampliamente a lo largo del mundo y además se caracterizan por ser organismos anfitrónicos, es decir, que tienen la capacidad de completar su ciclo de vida sin la necesidad de un organismo hospedero. Entre estas amibas se encuentran los géneros: *Naegleria* spp., *Balamuthia* spp., *Acanthamoeba* spp. y *Sappinia diploidea* (Visvesvara et al., 2007).

1.2 *Acanthamoeba* spp.

Las amibas de vida libre más abundantes en la naturaleza son las del género *Acanthamoeba* y fue reportada por primera vez por Culbertson en 1958 mientras se producía la vacuna contra la poliomielitis. En estos estudios se encontró un contaminante en los cultivos de tejido y se aisló esta amiba, aunque inicialmente se pensó que se trataba de un virus. Posteriormente *Acanthamoeba* se inoculó en cerebros de monos tratados con cortisona, los cuales murieron una semana después, sugiriendo que esta amiba también podría afectar al humano (Visvesvara et al., 2007).

Al ser *Acanthamoeba* un microorganismo oportunista de vida libre, que no necesita de un organismo hospedero para sobrevivir (anfitrónico), es frecuente encontrarla habitando el suelo, agua, polvo, filtros de aire acondicionado, lentes de contacto y en los estuches de este tipo de lentes; de los cuales ya ha sido aislada esta amiba de manera exitosa (Siddiqui and Khan, 2012).

Acanthamoeba es capaz de tolerar un amplio rango de osmolaridad, condiciones de desecación, ambientes salinos, pH y temperaturas extremas, permitiendo su sobrevivencia en agua destilada, en agua dulce y marina, en la arena, aguas residuales, acuarios, ambientes hospitalarios, en unidades dentales y de diálisis, así como en lentes de contacto, soluciones

desinfectantes, cultivos de tejido y en diferentes fluidos corporales de mamíferos (Trabelsi et al., 2012).

Acanthamoeba puede causar la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) que es una enfermedad crónica que finalmente ocasiona la muerte de la persona infectada. Este padecimiento se presenta con una alta incidencia en pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo en personas que son tratadas con cortisona (a dosis inmunosupresoras), o pacientes infectados con el virus del VIH. Además de causar infecciones a nivel del sistema nervioso central (SNC), *Acanthamoeba* también es causante de la queratitis amibiana (QA), caracterizada por causar infecciones severas en la córnea en personas inmunocompetentes, así como en infecciones en pulmones, piel y otros órganos vitales (Visvesvara et al., 2007).

En las últimas décadas, estos organismos han ganado una creciente atención debido a sus diversos papeles que desempeñan en los ecosistemas y en particular como agentes causales de infecciones fatales en humanos (Siddiqui and Khan, 2012). Es por esto que se ha incrementado el interés por parte de la comunidad científica y clínica por este protozooario de vida libre; en los últimos años se ha incrementado la infección por el mal uso y cuidado de lentes de contacto y al aumento de pacientes con inmunodeficiencias como es el SIDA.

1.3 CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA

Debido a los constantes cambios en la taxonomía de este género realizados a lo largo del tiempo, hasta el momento no se cuenta con una clasificación definida para este tipo de amibas de vida libre. Después de un gran número de arreglos y ajustes a las clasificaciones *Acanthamoeba* quedó clasificada en el súper grupo Amoebozoa (Figura 1) (Siddiqui and Khan, 2012).

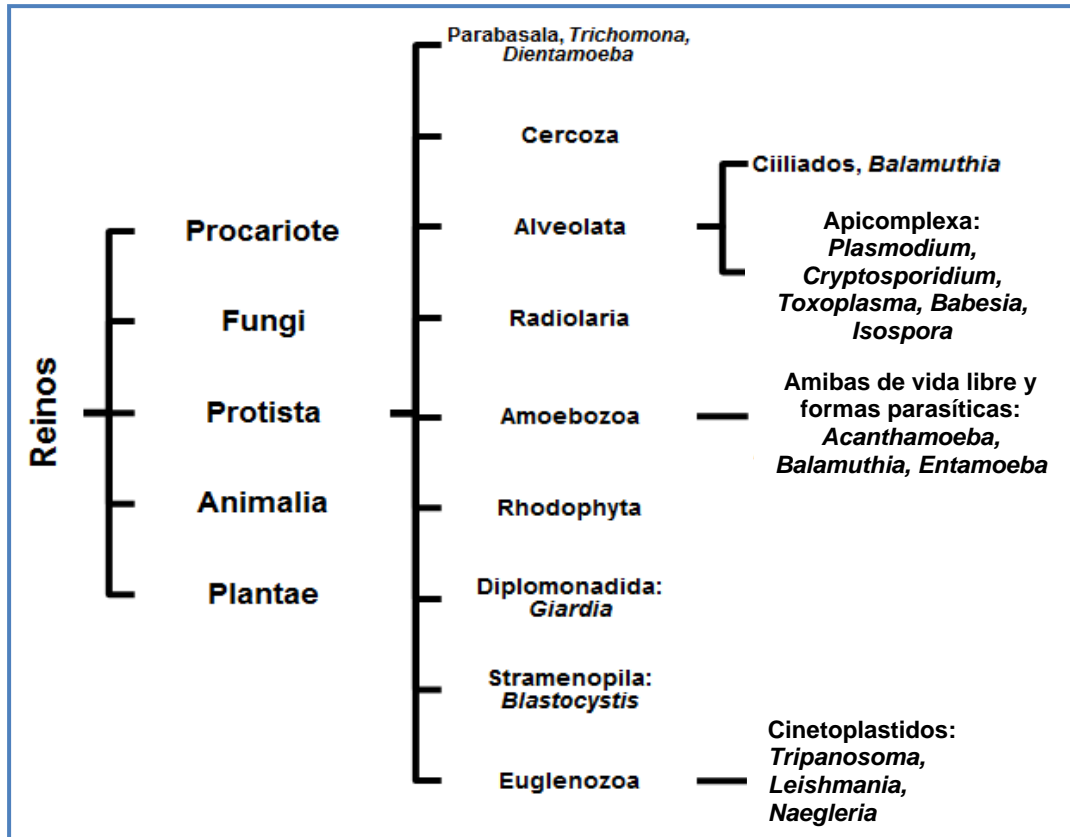


Figura 1. Clasificación de protistas (Siddiqui and Khan, 2012).

Actualmente se tienen identificadas más de 22 especies de *Acanthamoeba* (Tabla 1) y su clasificación en tres grupos se basa en criterios morfológicos y en el tamaño del quiste (Visvesvara et al., 2007).

En el grupo I están incluidas las especies de gran tamaño, donde el quiste es de 16 a 30 μm . El grupo II consiste en las especies con un tamaño del quiste de alrededor de 18 μm o menos. El grupo III también consiste en especies en donde el quiste también mide 18 μm o menos, pero presenta sutiles diferencias en su morfología. Debido a que la morfología resulta un tanto subjetiva, actualmente se cuentan con técnicas de biología molecular, en particular con la secuenciación de los rRNA 18s, con la cual se empieza a comprender la complejidad de las especies y la filogenia de *Acanthamoeba*, estableciéndose 15 genotipos (T1-T15) (Visvesvara et al., 2007).

Tabla 1. Especies patógenas y no patógenas de *Acanthamoeba* (Visvesvara et al., 2007).

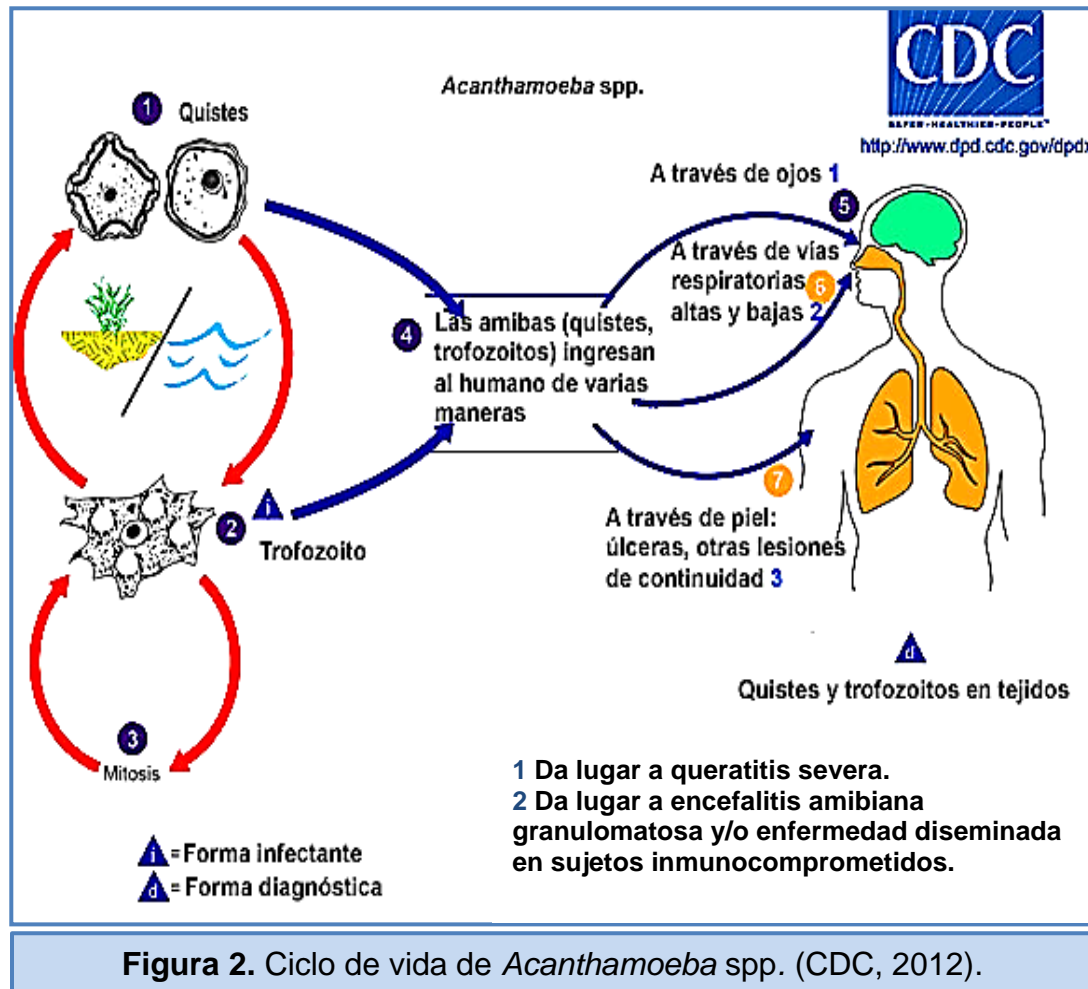
| Patógenas | No patógenas |
|-------------------------|--------------------------|
| <i>A. astronyxis</i> | <i>A. comandoni</i> |
| <i>A. castellanii</i> | <i>A. divionensis</i> |
| <i>A. culbertsoni</i> | <i>A. griffini</i> |
| <i>A. hatchetti</i> | <i>A. healyi</i> |
| <i>A. lugdunensis</i> | <i>A. jacobsi</i> |
| <i>A. palestinensis</i> | <i>A. lenticulata</i> |
| <i>A. polyphaga</i> | <i>A. mauritaniensis</i> |
| <i>A. quina</i> | <i>A. pearcei</i> |
| <i>A. rhyodes</i> | <i>A. postulosa</i> |
| | <i>A. royreba</i> |
| | <i>A. terricola</i> |
| | <i>A. triangularis</i> |
| | <i>A. tubiashi</i> |

1.4 CICLO DE VIDA Y MORFOLOGÍA

Acanthamoeba presenta dos etapas en su ciclo de vida, el estado vegetativo o trofozoíto y la fase de resistencia o quiste. El ciclo de *Acanthamoeba* comienza cuando el trofozoíto o quiste ingresan al humano por la vía respiratoria, por lesiones en la piel o la córnea produciendo la QA o se pueden diseminar por vía hematogena y producir la EAG (Figura 2).

El tamaño del trofozoíto varía entre los aislados de las diferentes especies o genotipos desde 12 a 35 µm de diámetro. Su morfología está caracterizada por la presencia de un solo núcleo con un nucléolo prominente (Khan, 2006), su citoplasma es finamente granular con un gran número de mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico rugoso, vacuolas fagocíticas y vacuolas contráctiles (Visvesvara et al., 2007), y además presentan finas

proyecciones que sobresalen de la superficie amibiana llamadas acantópodos (del griego “*acantos*” que significa espinas) (Figura 3 a, b).



Estos acantópodos le permiten adherirse a diferentes superficies, moverse y para capturar sustancias u otras células como bacterias, algas, levaduras o pequeñas partículas de materia orgánica dispersas para alimentarse. La división celular es asexual y ocurre por fisión binaria (Khan, 2006).

En condiciones adversas como la falta de nutrientes, aumento o disminución en la osmolaridad, así como temperaturas extremas y pH elevado, se induce la transformación de los trofozoitos a un estadio metabólicamente inactivo, el quiste que llega a medir entre 5 y 20 μm (Khan, 2006) (Figura 3 b, c). Durante el proceso de enquistamiento, los niveles celulares de RNA,

proteínas, triglicéridos y glucógeno bajan de manera sustancial lo que provoca la disminución del volumen celular (Khan, 2006). Esta estructura de quiste se caracteriza por tener una doble pared (Aksozek et al., 2002): la pared externa consiste en proteínas y polisacáridos principalmente compuesta por celulosa (Chávez-Munguía et al., 2005; Siddiqui and Khan, 2012), mientras que la pared interna presenta forma poligonal, redonda u oval y también contiene celulosa (Chávez-Munguía et al., 2005; Sriram et al., 2008).

Ambas paredes se encuentran separadas por un espacio, excepto en ciertos puntos llamados opérculos que se encuentran en el centro de los poros utilizados por el parásito para monitorear cambios en el ambiente conocidos como ostioles (Chávez-Munguía et al., 2005; Siddiqui and Khan, 2012).

Las diferencias de resistencia observadas en varias especies de *Acanthamoeba* se deben a la estructura de su pared externa, que es significativamente más gruesa en las especies más resistentes. Se ha demostrado que la pared del quiste contiene una gran cantidad de celulosa, la cual se incrementa cuando ocurre el proceso de enquistamiento, lo que a su vez aumenta su resistencia a biocidas (Coulon et al., 2010). Existen reportes donde se afirma que esta característica le ha permitido sobrevivir hasta por 20 años almacenadas en desecación (Sriram et al., 2008).

Los trofozoítos emergen del quiste bajo condiciones favorables del entorno, dejando atrás la pared exterior. Para llevar a cabo este proceso de desenquistamiento *Acanthamoeba castellanii* utiliza proteasas del tipo serina. En estudios realizados por Dudley et al. (2008) utilizando el inhibidor fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y RNA's de interferencia (siRNA) dirigidos contra los sitios catalíticos de las proteasas de serina (Asp-His-Ser), se demostró que las proteasas de serina son cruciales durante la diferenciación de quiste a trofozoíto.

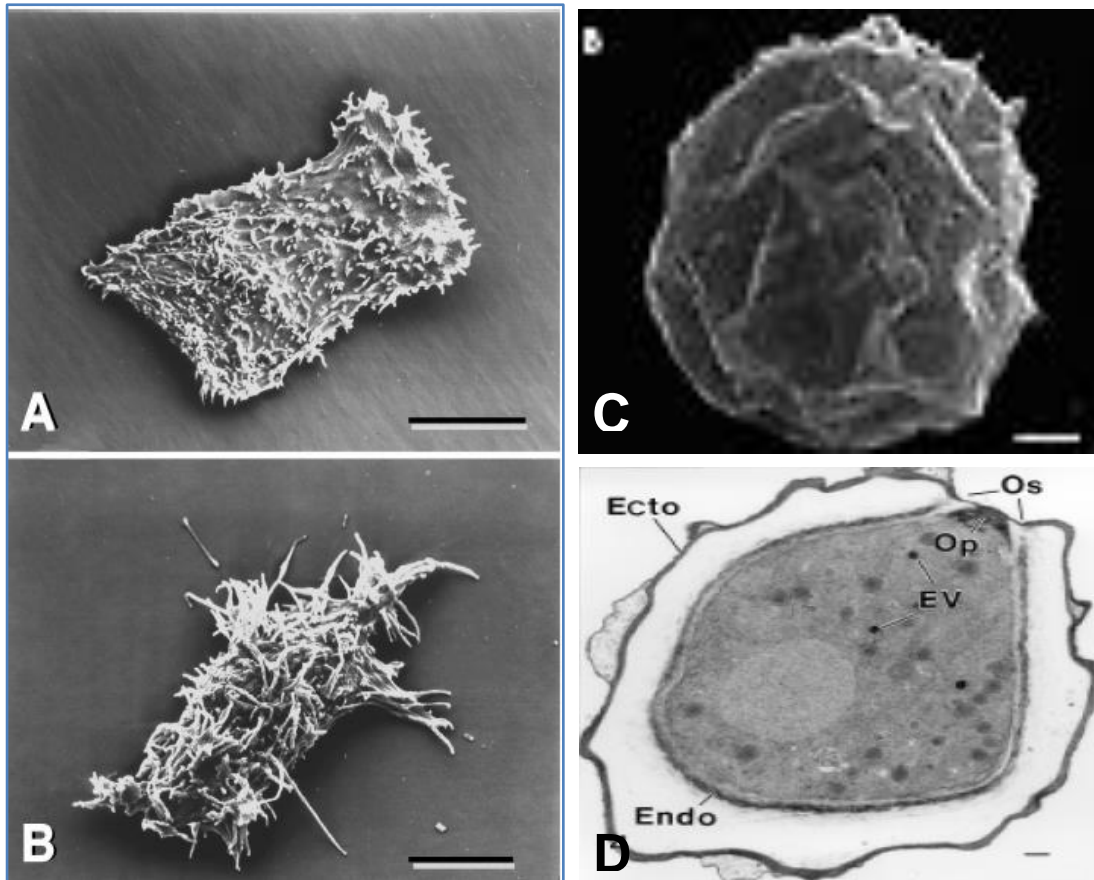


Figura 3. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de: A) trofozoíto de *Acanthamoeba castellanii*; B) *Acanthamoeba polyphaga* (Omaña-Molina et al., 2004); C) Quiste de *Acanthamoeba castellanii*. Microscopía electrónica de transmisión: D) Quiste de *Acanthamoeba castellanii*. Ecto: ectoquiste, Endo: endoquiste, Op: opérculo, Os: ostiol, EV: vesículas electron-densas (Fouque et al., 2012; Chávez-Munguía et al., 2005).

1.5 EPIDEMIOLOGÍA

Las especies de *Acanthamoeba* invaden al humano causando infecciones sistémicas que incluyen a la EAG, acanthamebiasis cutánea y nasofaríngea (Trabelsi et al., 2012). Las infecciones cutáneas y nasofaríngeas progresan a EAG, ya que las amibas son transportadas por el torrente sanguíneo hacia el sistema nervioso central (SNC).

La EAG es una infección relativamente rara, de hecho solo han sido descritos 150 casos en el mundo. El problema radica en que la EAG ha sido

mal diagnosticada y confundida con encefalitis producidas por otro tipo de microorganismos (Trabelsi et al., 2012). En Francia se reportó un caso de EAG producida por *Acanthamoeba lenticulata* en un paciente que había recibido un trasplante de corazón con diseminación hacia el cerebro (Barete et al., 2007). Desafortunadamente en México no existe el seguimiento epidemiológico de esta enfermedad ya que no es considerada como problema de salud pública.

La queratitis amibiana (QA) es una infección de la córnea desarrollada en individuos inmunocompetentes y se ha relacionado con el uso de lentes de contacto. En años recientes el incremento de casos de QA correlaciona con el número de usuarios de este tipo de lentes. Se estima que hay 1.36 casos por millón de usuarios de lentes de contacto en Estados Unidos, contra 17 a 21 casos por millón de usuarios en Inglaterra. En Francia la QA es rara, presentándose 1 caso por 30 000 usuarios de lentes de contacto, pero su incidencia ha ido en aumento (Trabelsi et al., 2012). En estudios recientes, se ha reportado un aumento significativo en el número de pacientes de QA en los E.U., Australia, Italia, Nueva Zelanda y Brasil. En la actualidad hay más de 120 millones de personas que usan lentes de Contacto en todo el mundo (Siddiqui and Khan, 2012).

En nuestro país desafortunadamente no existen reportes epidemiológicos de QA, pero se sabe que también hay infecciones corneales producidas por virus (herpes) que pueden ser confundidas con este tipo de amibas y provocar la pérdida de la visión (Visvesvara et al., 2007).

1.6 QUERATITIS AMIBIANA (QA)

El primer caso de QA fue reportado en el reino unido en 1974 relacionado con heridas en el ojo. El primer caso descrito en usuarios de lentes de contacto data del año de 1984, en un paciente que usaba lentes de contacto en su bañera, de la cual se logró aislar a *Acanthamoeba* (Lorenzo-Morales et al., 2013).

Aunque la QA (Figura 4) está asociada al uso de lentes de contacto blandos, también se presenta en personas que no son usuarios y que inicialmente presentaron alguna abrasión corneal. La QA es un proceso multifactorial que depende del uso prolongado de los lentes de contacto, la falta de higiene personal, la limpieza inadecuada de los lentes de contacto, la formación de biopelículas en los lentes y la exposición a fuentes de agua contaminada.

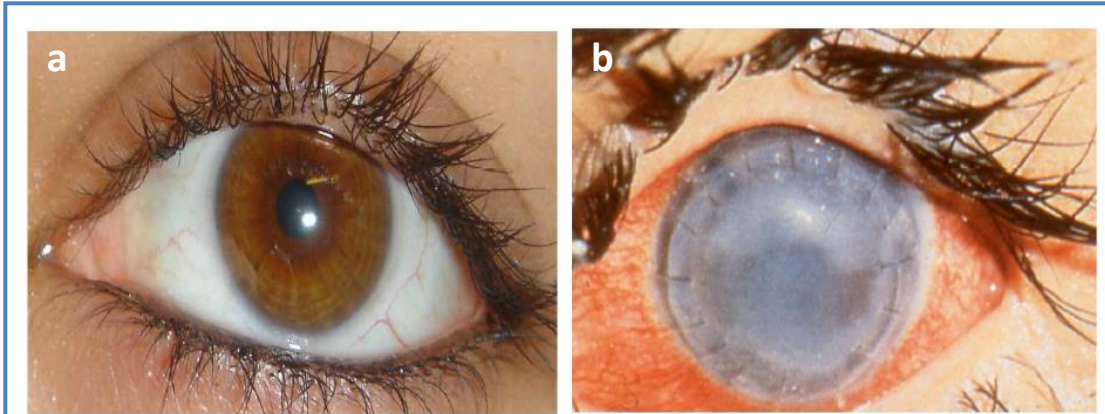


Figura 4. Caso de queratitis producida por *Acanthamoeba castellanii*. a) ojo normal, b) ojo dañado por recurrencia de la infección por *Acanthamoeba castellanii* posterior a un transplante de córnea, observándose daño severo a la córnea y pérdida de la visión (Siddiqui and Khan, 2012).

1.6.1 Histología de la córnea

La córnea es la parte frontal transparente del ojo humano que se encuentra cubriendo al iris, la pupila y la cámara anterior. La córnea, junto con la cámara anterior y el cristalino refracta la luz. La córnea es responsable de dos terceras partes de la potencia visual total del ojo. Debido a esta condición de primer lente, la córnea tiene gran importancia en nuestra visión, una falta de transparencia o una deformidad provocará una mala imagen en la retina. Este tejido del cuerpo humano es el que cuenta con el mayor número de terminaciones nerviosas, lo que le confiere una gran sensibilidad y una gran capacidad de regeneración. El tamaño y diámetro de la córnea oscila entre los 11 y 12 mm, su espesor varía según la persona y la raza, puede oscilar entre los 500 y 600 μm . La córnea está compuesta por seis

capas y es totalmente transparente (Figura 5), dentro de estas capas se encuentra el epitelio estratificado corneal, está compuesto de tres capas celulares: la superficial, la alada y la basal (Figura 5 a). Por debajo de esta capa se encuentra la membrana de Bowman (Figura 5 b), está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo VII y organizadas de forma irregular, tiene un espesor de 14 μm y está ausente o es muy fina en organismos no primates. Por debajo de la membrana de Bowman se encuentra el estroma corneal (Figura 5 c), el cual es una capa intermedia gruesa que consiste en láminas de fibras de colágena tipo I arregladas en forma regular. Entre cada lamina se localizan fibroblastos, que son las células encargadas de su mantenimiento. El estroma corneal mide alrededor de 500 μm de espesor. La membrana de Descemet (Figura 5 d), es una capa que carece de células y sirve como una membrana basal, modificada del epitelio posterior o endotelio corneal. Este estrato está formado principalmente por fibras de colágeno IV y tiene un espesor de 5 a 20 μm . Por último se encuentra el endotelio corneal (Figura 5 e), que es un endotelio simple, formado de células cúbicas ricas en mitocondrias y de aproximadamente 5 μm de espesor (Goldstein y Bruce, 2007).

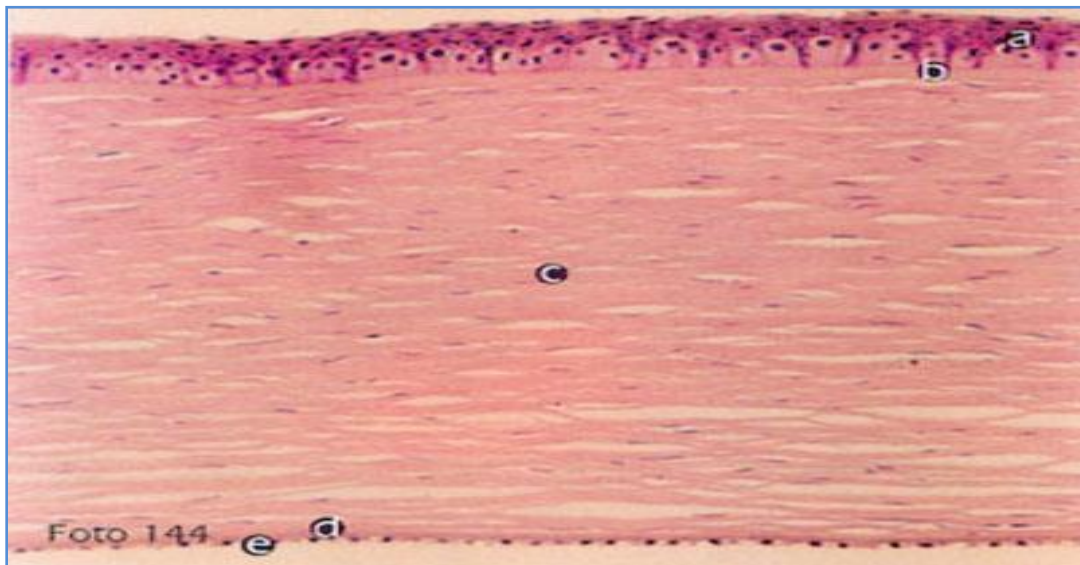


Figura 5. Estructura de la córnea. a) epitelio corneal, b) membrana de Bowman, c) estroma corneal, d) membrana de Descemet, e) endotelio corneal (Goldstein y Bruce, 2007).

1.6.2 Manifestaciones clínicas

La QA, implica la ruptura de la barrera epitelial, la invasión del estroma por la amiba, la reducción de los queratinocitos, la inducción de una respuesta inflamatoria intensa, fotofobia y finalmente necrosis del estroma, puede causar la ceguera (Figura 6) (Siddiqui and Khan, 2012; Lorenzo-Morales et al., 2013).

En la QA, generalmente solo un ojo se encuentra involucrado en la infección, aunque en ocasiones también puede involucrar ambos ojos. De manera desafortunada si la QA evoluciona a estados crónicos puede llevar a la pérdida del ojo o enucleación (Visvesvara et al., 2007).

1.6.3 Diagnóstico de la QA

El diagnóstico de la QA es complicado, ya que puede confundirse con infecciones bacterianas, virales o fúngicas. Es por ello que se ha empezado a implementar como método de diagnóstico, la microscopia de epifluorescencia de raspados corneales la cual debe realizarse por especialistas de la cámara anterior del ojo. Esta técnica no es invasiva y tiene una gran sensibilidad. Otro método de diagnóstico son los cultivos en placas de agar no nutritivo derivados de biopsias tomadas también de raspados corneales del ojo del paciente, o a partir de muestras obtenidas de los lentes de contacto, para ser observadas mediante microscopia de fluorescencia (Lorenzo-Morales et al., 2013). Recientemente han surgido nuevas metodologías de PCR como la PCR multiplex, PCR en tiempo real y PCR TaqMan; estas metodologías diagnósticas resultan ser más rápidas, específicas y sensibles (Siddiqui and Khan, 2012; Lorenzo-Morales et al., 2013).

1.6.4 Tratamiento para la QA

El diagnóstico temprano seguido por un tratamiento integral es indispensable para una resolución efectiva de la QA. No existe hasta el momento un solo fármaco que actúe de manera específica sobre cualquier cepa de *Acanthamoeba*, ya que hay múltiples factores que afectan la evolución de la enfermedad, por ejemplo el grado de virulencia de la cepa amibiana y la presencia de quistes en las lesiones corneales. Sin embargo, el tratamiento más comúnmente empleado consiste de fármacos tales como: polyhexametileno de biguanida (PHMB) o digluconato de clorhexidina, en combinación con isotionato de propamidina o hexamidina. Cuando están asociadas bacterias a la infección por *Acanthamoeba* se recomienda la adición de antibióticos como neomicina o cloranfenicol (Siddiqui and Khan, 2012; Lorenzo-Morales et al., 2013).

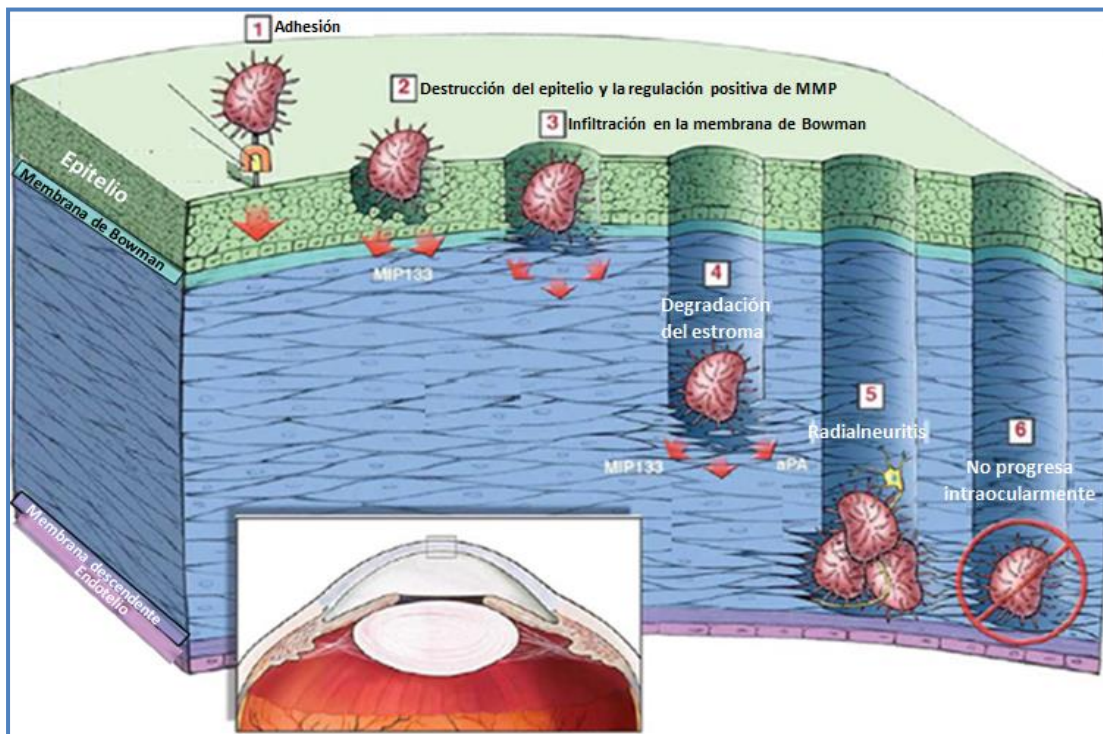


Figura 6. Eventos fisiopatológicos de la QA. (1) Los trofozoítos de *Acanthamoeba* se adhieren a glicoproteínas ricas en manosa, las cuales se sobre-regulan en respuesta a la abrasión corneal. (2) La exposición a la manosa induce la secreción de MIP133 (proteína inducida por manosa), la cual tiene un alto efecto citolítico en las células epiteliales de la córnea. (3) Los trofozoítos rompen la membrana de Bowman y entran al colágeno del estroma. (4) Los trofozoítos continúan con la producción de gran cantidad de proteasas (MIP133, colagenasa y MMP) que contribuyen a la degradación del estroma corneal. (5) Los trofozoítos forman acúmulos alrededor de los nervios corneales, produciendo queratoneuritis radial y dolor extremo. (6) La QA raramente progresa hacia el endotelio córneoal para producir infecciones intraoculares (Clarke and Niederkorn, 2006).

1.7 ENCEFALITIS AMIBIANA GRANULOMATOSA (EAG)

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) (Figura 7) producida por *Acanthamoeba* es una infección rara que puede ser fatal. Este tipo de encefalitis se incrementa en individuos inmunocomprometidos, en terapia inmunosupresora, en individuos con desórdenes linfoproliferativos, con

diabetes mellitus, que reciben radioterapia o quimioterapia, entre otros. La patología característica encontrada en autopsias de cerebros, revela edema severo, necrosis hemorrágica e inflamación crónica caracterizada por la formación de granulomas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

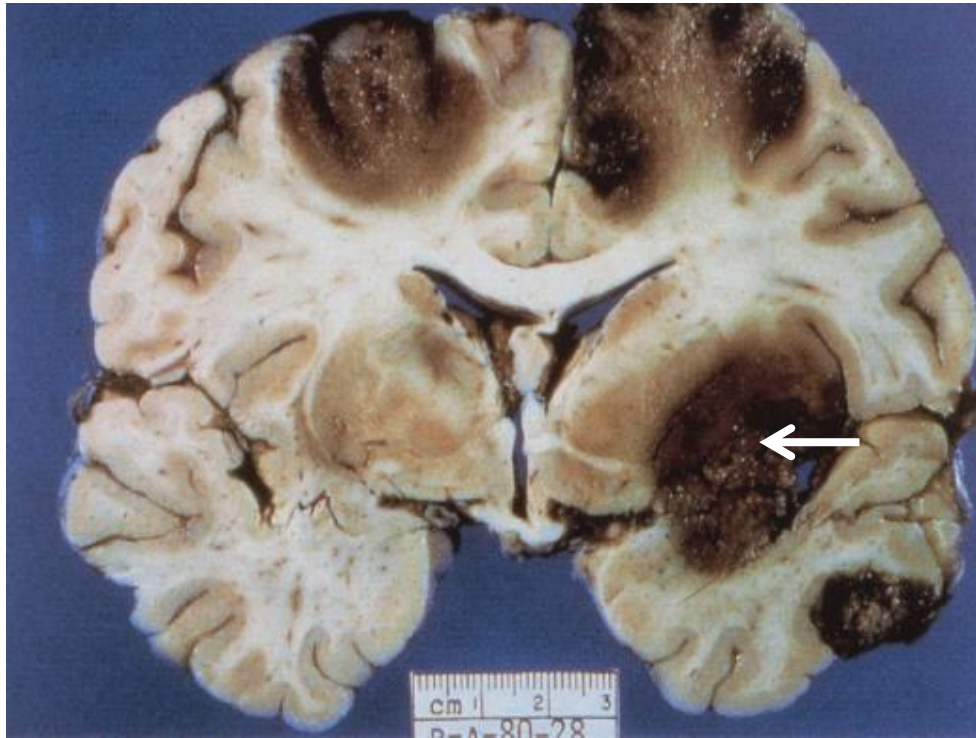


Figura 7. Caso fatal de EAG producida por *Acanthamoeba castellanii*. Sección coronal de hemisferios cerebrales, que presenta necrosis cortical y subcortical. Se observa necrosis y hemorragia (flecha). (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Con ensayos microscópicos post-mortem se puede observar la presencia de quistes en los capilares cerebrales, indicando la posible vía de llegada de los trofozoítos al cerebro (Siddiqui and Khan, 2012). En estudios *in vitro* realizados por Khan y Siddiqui en 2009, demostraron que *Acanthamoeba* afecta la integridad de las células endoteliales de la microvasculatura del cerebro, degradando a las proteínas que conforman a las uniones estrechas (UE) de estas células (Siddiqui and Khan, 2012).

1.7.1 Diagnóstico de EAG

Los síntomas de la EAG son similares a otras infecciones del SNC, entre las manifestaciones neurológicas se encuentran:

- Dolor de cabeza intenso
- Fiebre
- Cambios de comportamiento
- Letargia
- Vómito
- Rigidez del cuello o nuca
- Fotofobia

Las técnicas de imagenología como la tomografía computarizada han resultado útiles para el diagnóstico de la encefalitis, donde se pueden observar anillos en el sitio de la infección, exhibiendo una o varias masas en la corteza cerebral. En muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) se llega a observar leucocitosis con predominio de linfocitos, incremento en la concentración de proteínas, disminución de glucosa y turbidez del LCR, así como la presencia de trofozoítos de *Acanthamoeba* (Siddiqui and Khan, 2012).

1.7.2 Tratamiento de la EAG

No hay un tratamiento recomendado ya que en la mayoría de los casos el diagnóstico se lleva a cabo en etapas post-mortem, además de que no existen fármacos que puedan atravesar la barrera hematoencefálica. Existen muy escasos reportes de recuperación donde se utilizó ketoconazol, fluconazol, sulfadiazina, pentamidina, anfotericina B, itraconazol y rifampicina (Trabelsi et al., 2012).

1.8 DERMATITIS AMIBIANA (DA)

La DA o acanthamebiasis cutánea es una infección “rara” provocada por estas amibas oportunistas y que puede presentarse en pacientes

inmunocomprometidos particularmente en pacientes con VIH. En las formas características de las lesiones, se presentan nódulos, pústulas, pápulas y úlceras, las cuales se tornan purulentas (figura 8), conteniendo una mezcla de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba*, presentándose principalmente las especies *A. polyphaga* y *A. culbertsoni*.

Las zonas del cuerpo humano que son afectadas con mayor intensidad son la cara, torso y las extremidades. En pacientes inmunocomprometidos la ruta común de infección es por la vía hematógena, permitiendo su dispersión a diferentes tejidos. Cuando estas amibas logran llegar al SNC la infección es fatal para el humano y puede morir el paciente en un par de meses o en algunos años (Torno et al., 2000).



Figura 8. Úlcera cutánea que presenta necrosis del tejido causada por *Acanthamoeba* spp. en un paciente con VIH (Galarza et al., 2009).

1.8.1 Diagnóstico de la DA

Un diagnóstico positivo en biopsias del tejido necrótico, se observa una gran cantidad de trofozoítos, quistes y una reacción inflamatoria de tipo crónica. Otra manera de diagnosticar la infección cutánea por *Acanthamoeba* es mediante el cultivo del tejido (úlceras) en cajas con agar no nutritivo suplementados con bacterias como *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* muertas por calor (Trabelsi et al., 2012).

1.8.2 Tratamiento de la DA

El tratamiento de la DA al igual que el de las otras patologías antes descritas no es específico hacia la enfermedad, es por esto que se utiliza una amplia gama de fármacos para tratarla. El tratamiento consiste en aplicaciones tópicas de gluconato de ciclohexidina, ketoconazol, sulfadiazina, flucitosina, fluconazol e itraconazol, los cuales han tenido resultados terapéuticos favorables (Visvesvara et al., 2007).

1.9 FACTORES DE VIRULENCIA

El daño causado por los trofozoítos de *Acanthamoeba* en las infecciones de la córnea y el cerebro involucran al menos tres mecanismos descritos en estudios *in vitro*: citólisis directa, fagocitosis y apoptosis. Sin embargo, se requieren estudios *in vivo* para elucidar si estos mecanismos tienen significancia en el humano (Serrano-Luna et al., 2006).

Algunas amibas de vida libre como *Naegleria spp.* despliegan proyecciones citoplasmáticas conocidas como bocas fagocíticas. Se creía que *Acanthamoeba* carecía de bocas fagocíticas especializadas denominadas amebostomas. Más recientemente con estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) realizados por Pettit y colaboradores (1996) se demostró que varias especies de *Acanthamoeba* también presentan este tipo de estructuras. Cuando las amibas se interaccionaron con células del epitelio corneal de hámsteres (2 h) se

observaron estas bocas fagocíticas (Figura 9), lo cual sugiere fuertemente su participación en procesos fagocíticos (Omaña-Molina et al., 2004).

Para que *Acanthamoeba* pueda causar daño al hospedero, necesita adherirse al epitelio que invade. La especie *Acanthamoeba castellanii* expresa proteínas en su superficie, como es la proteína de unión a manosa (MBP) de un peso molecular de 130 kDa, que se ha involucrado en el proceso inicial de adhesión a las células epiteliales.

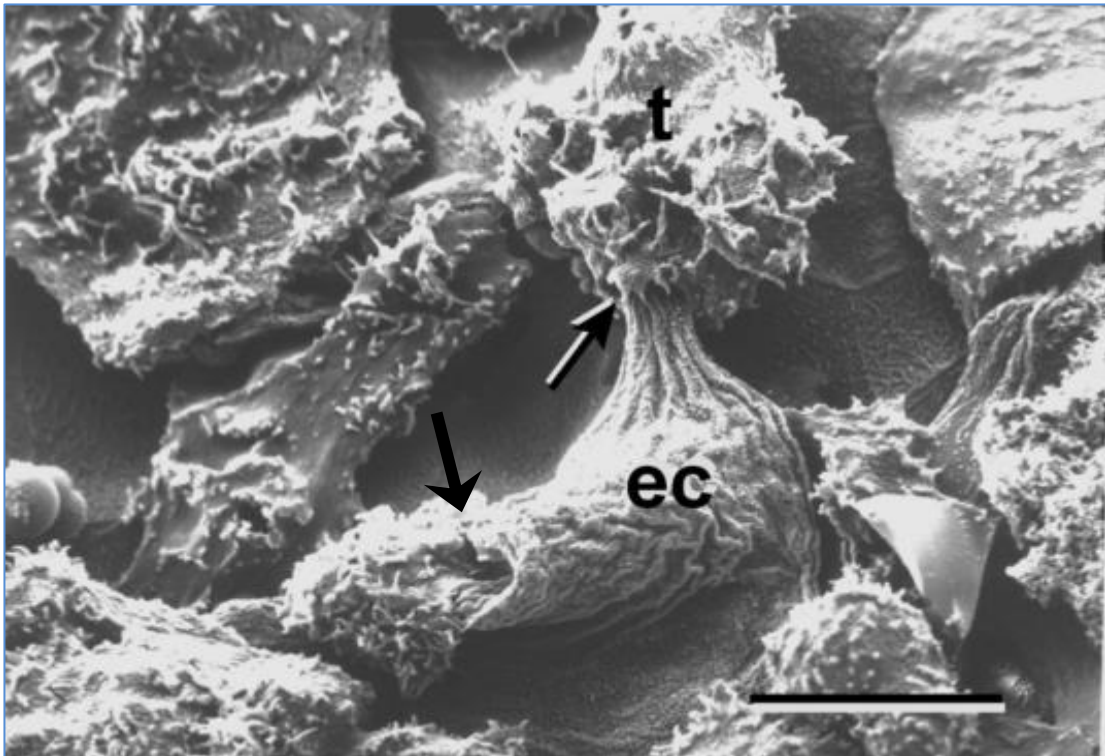


Figura 9. Micrografías de MEB de trofozoítos de *A. castellanii* desplegando bocas fagocíticas hacia células del epitelio corneal en el modelo de hámster. t: trofozoíto, ec: célula epitelial, flecha: boca fagocítica. (Omaña-Molina et al., 2004).

Además, se ha observado que la manosa, pero no otros azúcares, puede inhibir la unión de esta amiba a las células epiteliales (Garate et al., 2006).

La MBP se expresa tanto en quistes como en trofozoítos encontrados en el estroma corneal de pacientes con QA o en tratamiento, sugiriendo que puede servir como un factor de reinfección de esta amiba. En *Acanthamoeba*

castellanii la MBP ha sido considerada como una molécula importante en el proceso de adhesión e invasión por esta amiba, además de que se ha encontrado mayormente expresada en cepas patógenas de *Acanthamoeba* (Garate et al., 2006).

Se ha detectado una elevada actividad de fosfolipasas en cepas virulentas de *Acanthamoeba* en comparación con cepas de baja virulencia o avirulentas. Cursons y colaboradores en 1978, identificaron fosfolipasas en el medio de cultivo condicionado de la especie *Acanthamoeba culbertsoni*. Este grupo propone que estas fosfolipasas son responsables de la desmielinización de las vainas que envuelven a los axones.

Otro tipo de enzimas líticas que pudieran contribuir de manera importante a la patogénesis de *Acanthamoeba*, son las proteasas. Este tipo de enzimas pueden encontrarse en membrana o ser de secreción y pudieran justificar el efecto citolítico directo de las amibas, como las alteraciones del epitelio corneal en las capas celulares profundas, o el daño observado a distancia.

2. PROTEASAS

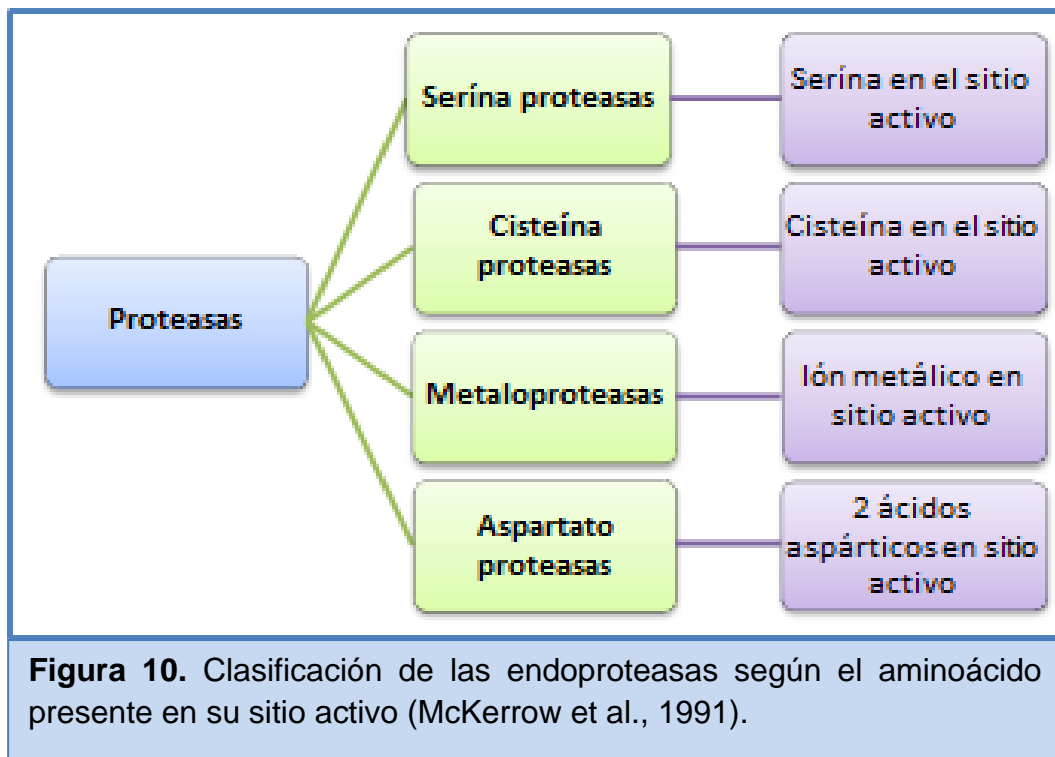
Como se mencionó anteriormente, las proteasas participan en los mecanismos de daño de células y tejidos que pueden ser determinantes en las especies de *Acanthamoeba*, los cuales están implicados directamente en la invasión y patogenicidad de la misma, ya que se ha reportado que solo las especies patógenas de estas amibas de vida libre son capaces de producirlas (Khan et al., 2000; Khan, 2003). Las proteasas o enzimas proteolíticas catalizan la degradación de enlaces peptídicos, participan en la manufactura y edición de nuevas proteínas y participan en rutas metabólicas en todos los organismos, en los mecanismos de defensa de las células del sistema inmune e incluso en el procesamiento de los antígenos por las células presentadoras de antígeno, entre otras funciones.

Este tipo de proteínas se han clasificado de acuerdo a su composición, estructura bioquímica y mecanismo de acción. De esta forma las proteasas

se pueden clasificar en relación con el sitio de corte de la proteína a degradar como:

- **Endoproteasas** – cortan en regiones centrales de la proteína.
- **Exoproteasas** - cortan en regiones de los extremos de la proteína.
 - **Carboxipeptidasas** – cortan en el extremo carboxilo de la proteína.
 - **Aminopeptidasas** – cortan en el extremo amino de la proteína.

Existe otra clasificación de las endoproteasas que se basa en el tipo de aminoácido presente en el sitio activo de la enzima: serina, cisteína, metalo (Zinc) y aspartato (figura 10).



Las proteasas del tipo serina pertenecen a una gran familia de enzimas proteolíticas. Se denominan así por el aminoácido serina que se encuentra en su sitio activo, en particular el grupo hidroxilo participa en la unión y

catálisis de los sustratos. En las proteasas de cisteína o de tioles, el grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína juega un papel similar en la unión y catálisis de los sustrato, al igual que las proteasas de serina. Las metalo-proteasas tiene un ion metálico (Zinc o Níquel) en su sitio activo el cual actúa en la unión y catálisis de su sustrato. Las proteasas de aspartato poseen dos ácidos aspárticos que participan en la catálisis de sus sustratos. Para que estas proteasas puedan tener actividad proteolítica necesitan de condiciones especiales, como el pH del ambiente donde se encuentren, por ejemplo las de tipo serina y metalo tiene pH óptimo entre 7 y 10, las de tipo cisteína trabajan mejor a pH 5.5 a 7.5 y las del tipo aspartato funcionan en un rango de pH de 2.5 a 4.5 (McKerrow, 1993).

En los organismos patógenos la acción de las proteasas tiene un efecto directo sobre la patogénesis de la enfermedad. Como en el caso de la larva de *Schistosoma mansoni* el principal componente proteolítico es una serina proteasa de secreción (McKerrow et al., 1991). En un aislado del hongo *Entomophthora coronata* a partir de un paciente se localizó la presencia de una elastasa, la cual estaba ausente en aislados de suelo del mismo hongo (Rippon et al., 1998).

Por otro lado, se ha estudiado el efecto de las proteasas en las patologías provocadas por protozoarios como la malaria, leishmaniasis, amibiasis y tripanosomiasis (McKerrow et al., 1993). En *Entamoeba histolytica*, el agente etiológico que produce la disentería amibiana y el absceso hepático amibiano, se han identificado proteasas de cisteína como su mayor componente proteolítico (Piña-Vázquez et al., 2012). En *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas, su mayor componente proteolítico corresponde a una proteasa de cisteína (Bontempi et al, 1984). A diferencia de *E. histolytica*, esta proteasa no se puede considerar como un factor de virulencia propiamente dicho, aunque participa en la replicación y la diferenciación celular del parásito, etapas que son de suma importancia para la invasión de las células del huésped.

En *Acanthamoeba* se ha descrito la presencia de enzimas proteolíticas que contribuyen al daño producido por esta amiba, entre las cuales se encuentran colagenasas y elastasas (He et al., 1990; Ferrante & Bates, 1988). Las colagenasas se caracterizaron en *Acanthamoeba castellanii* por el grupo de He y colaboradores en 1990, que describieron un número importante de casos de queratitis amibiana desde 1973, solo que aún no se conocía que factores de la amiba participaban en el daño a la córnea. Este grupo de investigación determinó que había enzimas con actividad colagenolítica que tenían la capacidad de producir daño al estroma corneal, lo cual se intensifica por la acción de los productos de neutrófilos (enzimas lisosomales y metabolitos de oxígeno) hacia el área de la infección. En el 2010 Souza-Carvalho y colaboradores utilizando muestras provenientes de pacientes con QA determinaron mediante zimogramas de gelatina y de colágena tipo I la presencia de proteasas de serina con actividad colagenolítica en sobrenadantes de cultivos con pesos moleculares entre 36 y 140 kDa. Las elastasas fueron identificadas en estudios por Ferrante y Bates (1988) en *Acanthamoeba polyphaga*, una especie patógena, donde se observó una marcada degradación en geles polimerizados con elastina. Con estos estudios se determinó la actividad enzimática de la elastasa y su peso molecular de 70 kDa. Estas elastasas se identificaron como metalo-proteasas mediante la utilización de inhibidores como la 1,10-fenantrolina. Además, este tipo de enzimas proteolíticas son importantes para la amiba, ya que le permiten obtener nutrientes provenientes del tejido que invaden. Por lo que las elastasas pueden ser considerados como factores claves en la colonización y dispersión de *Acanthamoeba*, ya que la elastina se encuentra distribuida en: pulmones, arterias, ligamentos, piel y de forma importante en las meninges y en la microvasculatura del cerebro (Ferrante y Bates, 1988).

En 1994 se describió la presencia de proteasas de serina y de cisteína, así como metalo-proteasas en *A. polyphaga* (Mitro et al., 1994). De acuerdo a diversas publicaciones, las proteasas secretadas que se encuentran en mayor abundancia y de mayor estudio en el protozooario son las proteasas del

tipo serina (Cho et al., 2000; Kim et al., 2003; Kim et al., 2006; Sissons et al., 2006; Serrano-Luna et al., 2006; Souza-Carvalho et al., 2010). Este tipo de proteasas también han sido aisladas de casos de EAG, sugiriendo que estas enzimas participan en este tipo de patología (Kong et al., 2000; Sissons et al., 2006). La actividad proteolítica de estas enzimas es muy importante en las cepas patógenas de *Acanthamoeba*, a diferencia de las amibas no patógenas, donde la actividad enzimática es baja; sugiriendo que estas proteasas facilitan la invasión y la obtención de nutrientes provenientes de las células lisadas (Visvesvara et al., 2007). El efecto citopático producido por las enzimas secretadas por *Acanthamoeba culbertsoni* se ha observado *in vitro* en cultivos celulares, lo que se podría atribuir también a actividades proteolíticas (Visvesvara et al., 2007).

Como ya se tenían antecedentes de que las cepas patógenas de *Acanthamoeba* producían daño en el cerebro probablemente por la acción de proteasas, en estudios recientes utilizando células endoteliales de la microvasculatura de cerebro humano las cuales constituyen la barrera hematoencefálica, se midió la resistencia eléctrica transepitelial (RET). Observándose que *A. castellanii* abole la RET lo que probablemente se deba a la degradación de las proteínas de las uniones estrechas tales como ocludina y ZO-1 en una vía dependiente de la cinasa de Rho permitiendo así el aumento de la permeabilidad de los capilares que conforman a la barrera hematoencefálica y probablemente propiciando la invasión hacia el cerebro por parte de la amiba (Khan y Siddiqui, 2009).

Con todos estos antecedentes podemos resumir que las proteasas de estos organismos promueven la invasión al huésped por la degradación de tejidos, la manipulación de su metabolismo, interacción con las cascadas de coagulación y la evasión del sistema inmune, así como en el ciclo biológico del protozoario.

2.1 Inhibidores de proteasas

Existen dos tipos de inhibidores de proteasas: naturales y sintéticos. Los inhibidores naturales juegan papeles importantes en la regulación postraduccional de la actividad proteolítica tanto en los parásitos como en el huésped. Los inhibidores sintéticos (Tabla 2) son herramientas importantes en la sub-clasificación de las proteasas dentro de los cuatro grupos principales. Se han utilizado sustratos peptídicos para mapear los sitios activos específicos de las proteasas y así proveer ensayos específicos y sensibles (McKerrow et al., 1993).

| Tabla 2. Inhibidores de Proteasas (Serrano-Luna et al., 2006). | |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteasas | Inhibidores |
| Serina proteasas | <ul style="list-style-type: none">• Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (5 mM)• Aprotinina (6 μM) |
| Cisteína proteasas | <ul style="list-style-type: none">• Ácido p-hidroximercuribenzoico (PHMB) (10 mM)• N-etilmaleimida (NEM) (5 mM)• Trans-epoxi-L-leucil-amido-(4-guanidino) butano (E-64) (10 μM) |
| Metalo-proteasas | <ul style="list-style-type: none">• Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) (2 mM) |

3. UNIONES ESTRECHAS (UE)

Los organismos complejos están compuestos por órganos que cumplen con funciones específicas que requieren del mantenimiento constante de su medio interno. Estos órganos se mantienen gracias a la acción de barreras formadas por epitelios y endotelios (Yu y Turner, 2008), Las células de estos tejidos se unen por un complejo de uniones intercelulares, donde se encuentran las UE. Las UE son regiones diferenciadas bioquímica y estructuralmente de la membrana plasmática y se localizan en la parte más apical de la membrana lateral (Figura 11) (Cereijido, 1992). A la fecha se han

descubierto una gran cantidad de nuevas proteínas, pero en general está formada por proteínas integrales de membrana, que se unen al citoesqueleto de actina, a través de proteínas corticales o de andamio. Adicionalmente, en esta estructura participan proteínas involucradas en el tráfico vesicular y hasta se han encontrado factores de transcripción, que permiten una comunicación con el núcleo (González-Mariscal et al., 2003).

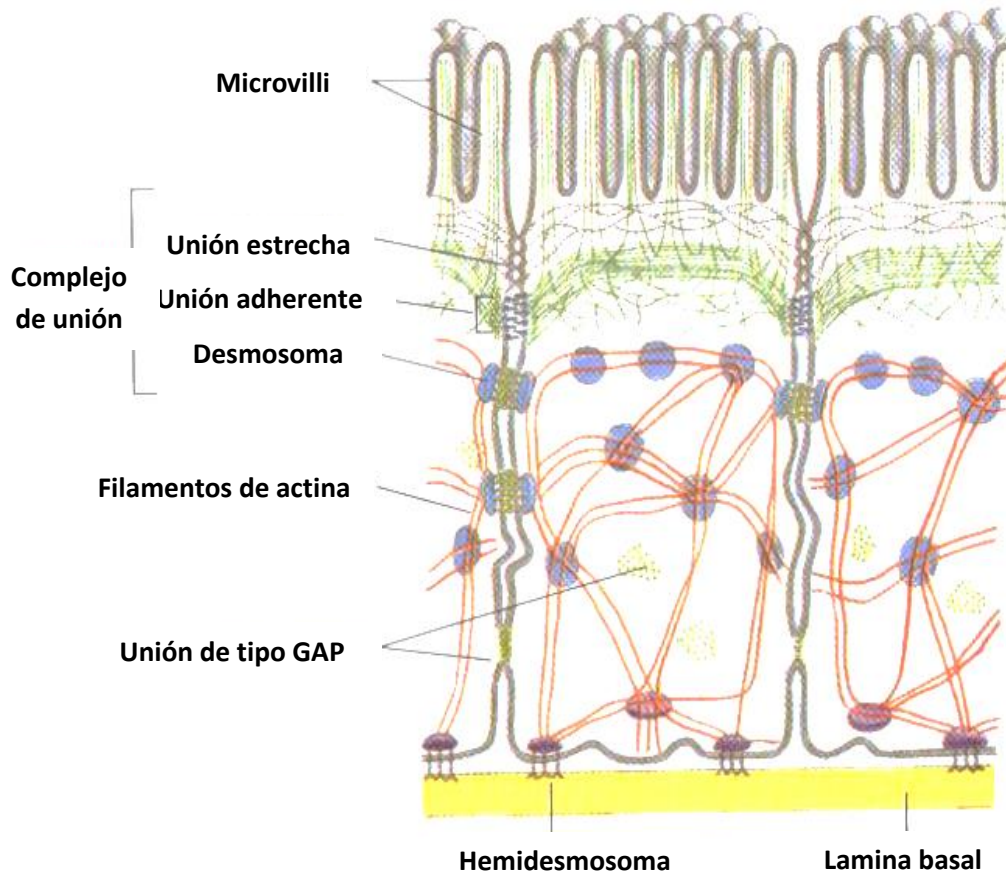


Figura 11. Localización y estructura molecular de las UE en células epiteliales (Niessen, 2007).

Las UE se describieron inicialmente en epitelios y endotelios; sin embargo, también se les encuentra en células mielinizadas y en el desarrollo del SNC y periférico (González-Mariscal et al., 2003).

3.1 PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES

Estas proteínas integrales se dividen en tres regiones (Cereijido, 1992):

- **Región extracelular.** Contiene moléculas o porciones de moléculas, que interactúan físicamente con moléculas semejantes de las células adyacentes o con componentes de la matriz extracelular.
- **Dominio transmembranal.** Sirve para conectar las proteínas externas con el citoplasma.
- **Zona submembranal.** Son componentes que median la interacción de los elementos transmembranales con las estructuras internas como el citoesqueleto. Los componentes de esta zona, no están directamente integrados en la bicapa lipídica.

La clasificación más reciente de estas proteínas se muestra en la tabla 4. Hasta el momento las proteínas integrales más estudiadas son la ocludina (64 kDa) y las claudinas (20-25 kDa).

La ocludina fue la primera proteína integral de membrana que se identificó. Su nombre proviene de la denominación en latín de las uniones estrechas: *Zonula occludens* que significa región que ocluye. (Furuse et al., 1993). Actualmente se encuentra clasificada dentro del grupo de las TAMP's (Tight Junction-associated Marvel proteins) (Shen et al., 2011). La participación de la ocludina en los filamentos de las UE se ha considerado muy importante, ya que tiene la capacidad de formar estructuras similares a las UE cuando estas son transfectadas en células que carecen de estas proteínas. Mediante la técnica de crio-fractura se logra observar a la ocludina entre los filamentos que conforman a las UE (Furuse 1998). Se tiene una gran cantidad de evidencia sobre la función importante que lleva a cabo la ocludina en las UE, ya que se sabe que la sobreexpresión de formas mutadas de ocludina en células epiteliales, dio lugar a cambios en la función de poro y barrera en las UE (Bamforth et al., 1999). Estructuralmente esta proteína se caracteriza por poseer cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y su grupo amino (NH₂) y carboxilo terminal (COOH) se encuentran localizados en

el citoplasma (Cereijido et al., 2004). La ocludina puede ser fosforilada por PKC en residuos de serina, treonina y tirosina confiriéndole un aumento en su peso molecular de 62 hasta los 82 kDa. En líneas celulares epiteliales se ha observado que la proteína ocludina altamente fosforilada se encuentra localizada en las UE y la ocludina fosforilada en menor cantidad se localiza en el citoplasma. La proteína ocludina es un claro constituyente de las UE y su abundancia se relaciona directamente con la capacidad de sellado del epitelio del cual está formando parte (González-Mariscal et al., 2003).

Tabla 4. Clasificación de las proteínas integrales de las UE's (Shen et al., 2011).

| Familia de la claudina | JAM's (Junctional adhesion molecules) |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Claudinas (24 miembros) | JAM-1/JAM-A JAM-2/JAM-B JAM-3/JAM-C IGSF5/JAM-4 |
| TAMP's (Tight Junction-associated Marvel proteins) | Familia de proteínas CAR (Coxsackievirus-adenovirus receptor) |
| Ocludina | CAR |
| Tricelulina | ESAM |
| MarvelD3 | CLMP |

Las claudinas son las principales proteínas transmembranales de las UE, estas proteínas forman parte de la familia de las tetraspaninas con alrededor de 24 miembros (Cereijido et al., 2004). Estas proteínas poseen cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y su grupo amino (NH₂) y carboxilo terminal (COOH) se localiza en el citoplasma (Cereijido et al., 2004). Por su parte las claudinas están divididas en dos subcategorías funcionales: 1) claudinas que incrementan la permeabilidad paracelular a

través de la formación de canales paracelulares (claudinas formadoras de poros), y 2) claudinas que reducen la permeabilidad paracelular (claudinas formadoras de barreras) (Krauze et al., 2008). De las claudinas que son capaces de formar poros, la más caracterizada es la claudina-2 (cldn-2), descubierta en células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) en donde se le adjudicó su fenotipo permeable por su capacidad de formar poros específicos para cationes monovalentes y agua (Rosenthal et al., 2010). Entre otras claudinas formadoras de poros se encuentran las claudinas 7, 15, 16 y 10 (Van-Itallie et al., 2005). Entre las claudinas que son capaces de formar barrera están las claudinas 1, 3, 5, 11 y 19. Sin embargo, esta habilidad de las claudinas de formar una barrera no está presente en todos los tejidos (ejemplo: asas del riñón), como la claudina-5 la cual puede presentar un fenotipo de barrera en el endotelio de la barrera hematoencefálica pero cuando se encuentra en los tejidos alveolares del pulmón la capacidad de barrera disminuye (Overgaard et al., 2011).

3.1.1 PROTEÍNAS SUBMEMBRANALES

El dominio citoplasmático de las proteínas de unión membranales se unen a un complejo intracelular conocido como ZO-1 (225 kDa), ZO-2 (160 kDa) y ZO-3 (130 kDa), las cuales pertenecen a la familia de las guanilato cinasas asociadas a membrana (MAGUK) (Van-Itallie, 1995). Los miembros de esta familia se caracterizan por: 1) localizarse en estructuras de unión celular especializadas, como las densidades sinápticas, La UE y las uniones septadas (el equivalente de las UE en los insectos); 2) estar constituidas por un conjunto de módulos o dominios, cuyo número y disposición se ha conservado a través de la evolución, y 3) reclutar proteínas y transducir señales que modulan el desarrollo embrionario normal y suprimen tumores (Kim, 1995). El nombre ZO proviene de la abreviatura de *zonula occludens*, el latín de la UE y la numeración 1, 2 o 3 revela el orden con el que fueron descubiertas. Las proteínas ZO-1 y ZO-2 se asocian con proteínas involucradas en la regulación transcripcional de genes y con la proliferación

celular (González-Mariscal et al., 2003). Esta proteína se localiza en las UE de las células epiteliales y endoteliales. Sin embargo, también está presente en el citoplasma y los contactos puntuales de células no epiteliales tales como astrocitos, células de Schwann, fibroblastos, glioma, sarcoma y línea celular de mieloma (Howarth et al., 1992).

La expresión de ZO-1 desempeña un papel fundamental en la fisiología de la UE; así por ejemplo, se observa que existe más ZO-1 en los segmentos de alta resistencia en el riñón (túbulos colectores) que en los de alta permeabilidad (segmentos proximales) (González-Mariscal et al., 2000). Esta proteína contiene en su secuencia dos señales de direccionamiento nuclear y se localiza en el núcleo de monocapas epiteliales subconfluentes o con contactos célula-célula inmaduros. La localización nuclear sugiere nuevos roles para esta proteína y la reciente observación de su unión a un factor de transcripción (ZONAB) con el que regula la progresión del ciclo celular (Balda y Matter, 2000). ZO-2 contiene en su secuencia, señales de importación y exportación nuclear y es capaz de moverse entre el núcleo y la UE de acuerdo al estado de confluencia del epitelio (Islas et al., 2002), por último se tiene a la proteína ZO-3, la cual se identificó por su co-precipitación con ZO-1, su secuencia contiene dos señales de localización nuclear (González-Mariscal et al., 1999).

Las proteínas ZO contienen una serie de dominios PDZ capaces de interactuar con otras proteínas ZO, claudinas y con el citoesqueleto, así como dominios GUK capaces de unir a las ocludinas, así como dominios capaces de unir al citoesqueleto de actina. Las proteínas ZO son andamios que establecen numerosas interacciones proteína-proteína como cinasas, fosfatasas, proteínas G pequeñas (González-Mariscal, et al., 2003).

ANTECEDENTES DIRECTOS

4. ANTECEDENTES DIRECTOS

La actividad proteolítica en *Acanthamoeba* se describió por primera vez por Ferrante y Bates en 1988; sin embargo, en esta época aún no se conocía bien el potencial patogénico de estos protozoarios. Ferrante y Bates (1988) así como He y colaboradores (1990) reportaron que *Acanthamoeba* es capaz de producir elastasas, la cual degrada a las proteínas del tejido conectivo y causa daño a las células. Mitro y colaboradores (1994), mediante el estudio de *A. castellanii* demostraron la presencia de proteasas del tipo serina, cisteína y metalo, capaces de actuar a pH neutro y con una gran capacidad colagenolítica. En el año 2000 Kong y colaboradores purificaron y caracterizaron una proteasa de serina de 33 kDa presente en los productos de secreción de *Acanthamoeba healyi* aislada de un caso de EAG. Esta proteasa tiene un pH óptimo de 8, y se inhibe por los inhibidores PMSF y disopropil fluorofosfato, inhibidores de proteasas de serina. Esta proteasa degrada colágena tipo I y IV y fibronectina, los cuales son componentes de matriz extracelular; también degrada a otras proteínas como fibrinógeno, IgG, albumina y hemoglobina. Debido a que esta proteasa de serina producto de secreción tiene un amplio rango de sustratos se sugiere que podría estar implicada en la patogénesis de la EAG provocada por la especie *A. healyi*. En el año 2000 Cho y colaboradores purificaron y caracterizaron otra proteasa de serina de 42 kDa, que degrada colágena tipo I, componente principal del estroma corneal, así como extractos de córnea de conejo. Dato relevante, ya que *Acanthamoeba* es capaz de producir fuertes infecciones oculares.

En el año 2004, Omaña-Molina y colaboradores propusieron un modelo experimental para estudiar la evolución de la QA en tiempos tempranos (1, 2, 4, 8 y 12 h) provocada por *A. polyphaga* y *A. castellanii*, utilizando córneas de hámster sin previa abrasión corneal a diferencia de otros modelos que son más artificiales como la inyección directa de trofozoítos al estroma corneal (Van-Klink et al., 1993), modelos animales donde se produjo

abrasión corneal previa a la inoculación de la amiba (Badenoch et al., 1990), o la fabricación de pequeñas lentes con el protozooario pre-incubado para luego ser colocado en las córneas de los animales (Nieder Korn et al., 1999). En el trabajo de Omaña y colaboradores (2004) se demostró que *Acanthamoeba* es capaz de adherirse al epitelio corneal a 1 h de interacción, desprender y penetrar el epitelio corneal a las 2, 4 y 8 h mediante acción mecánica y mediante fagocitosis y además producir daño celular a distancia, sugiriendo la acción de enzimas proteolíticas. También se determinó que los extractos totales y el medio condicionado de *A. castellanii*, son capaces de disminuir la resistencia eléctrica transepitelial de secciones de córnea de hámster. La patogénesis de la queratitis amibiana producida por *Acanthamoeba* está mediada por acción mecánica, fagocitosis y por los productos de secreción de la amiba hacia la córnea del hospedero.

Serrano-Luna y colaboradores en el año 2006 caracterizaron la actividad de proteasas de las especies *A. polyphaga* y *A. castellanii* mediante geles SDS-PAGE co-polimerizados con gelatina, encontraron una gran variabilidad en el patrón de secreción de estas proteasas a pH's de 3 a 9 y a temperaturas de 25 a 37°C y mediante el uso de inhibidores de proteasas PMSF, aprotinina (serina), NEM, E-64, PHMB (cisteína), EDTA (metalo) y pepstatina A (aspartato). Siendo PMSF y aprotinina las que disminuían en mayor cantidad la actividad proteolítica de extractos totales y del medio condicionado, también se caracterizó de manera cuantitativa la actividad proteolítica mediante ensayos con los sustratos cromogénicos Azure y Azocoll donde de igual forma se observó mayor inhibición por parte del inhibidor PMSF y aprotinina en extractos y en el medio condicionado de ambas especies. Posteriormente realizaron ensayos de efecto citopático con cultivo de células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) donde observaron, que el extracto total de *A. castellanii* es capaz de dañar a la monocapa de células epiteliales y agregando los inhibidores para proteasas de serina PMSF y aprotinina se observó un fenómeno de protección en la monocapa. Con esto concluyen que en las especies *A. castellanii* y *A. polyphaga*, el pH óptimo y temperatura

de actividad proteolítica es 7 y 37°C respectivamente, siendo principalmente proteasas del tipo serina, esto fue corroborado mediante inhibidores de proteasas y por ensayos de efecto citopático sobre células MDCK.

La amiba de vida libre *Naegleria fowleri* agente etiológico de la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), también es capaz de producir proteasas principalmente del tipo cisteína (Serrano-Luna et al., 2006), y cuando esta amiba se interaccionó con células MDCK durante los tiempos de 1, 3, 6 y 10 h produce daño al cultivo celular y degrada de manera tiempo dependiente a las proteínas de unión estrecha claudina-1 y ZO-1 posterior a 3 h post-incubación, además de que produce la pérdida de la resistencia eléctrica transepitelial del cultivo de MDCK, sugiriendo que *N. fowleri* puede penetrar al sistema nervioso central destruyendo las uniones intercelulares y de esta forma facilitando su invasión (Shibayama et al., 2013).

En nuestro laboratorio se encontró que el aislado ambiental *Acanthamoeba mauritaniensis* que ha sido reportado como “no patógeno” produce daño citopático sobre la línea celular MDCK, por lo que en el presente estudio se realizó la caracterización bioquímica parcial de las proteasas presentes en extractos totales y en el medio condicionado de *A. mauritaniensis*, utilizando geles SDS-PAGE al 12% co-polimerizados con gelatina porcina al 0.1%, ensayos cuantitativos con azocoll y ensayos citopáticos utilizando la línea celular MDCK y la línea celular de epitelio corneal de conejo RCE1, así como el análisis de las proteínas de las uniones estrechas por análisis con microscopia confocal.

5. JUSTIFICACIÓN

Las amibas del género *Acanthamoeba* producen patologías importantes que comprometen al SNC y la visión, como es el caso de la QA y la EAG. En nuestro laboratorio se encontró que la especie ambiental, *Acanthamoeba mauritaniensis* causa un fuerte daño a las monocapas de células MDCK. Debido a lo anterior es de nuestro interés caracterizar e identificar las proteasas producidas por esta amiba así como evaluar su efecto sobre las proteínas de las UE presentes en las células epiteliales.

6. HIPÓTESIS

Acanthamoeba mauritaniensis posee actividad proteolítica, lo que le permite producir daño en células epiteliales, específicamente en las proteínas que conforman las UE de estas células.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímicamente a las proteasas de *A. mauritaniensis* en extractos totales y en productos de secreción, así como evaluar el daño en las proteínas de las uniones estrechas ZO-1, claudina-1 y ocludina.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar el patrón de proteasas en extractos totales y en el medio condicionado de trofozoítos de *A. mauritaniensis* a diferentes pH's y temperaturas.
2. Determinar el tipo de proteasas presentes en esta amiba.
3. Evaluar el efecto citopático de trofozoítos de *A. mauritaniensis* en las líneas celulares epiteliales MDCK y RCE1.
4. Evaluar las posibles alteraciones en las proteínas ZO-1, claudina-1 y ocludina.

MATERIALES Y MÉTODOS

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivos celulares

En todos los ensayos se utilizaron trofozoítos de *A. mauritaniensis* originalmente aislados de muestras de suelo (De Jonckheere, 1980), los cuales fueron proporcionados por el Dr. Govinda Visvesvara (CDC, Atlanta). La cepa amibiana se cultivó axénicamente a temperatura ambiente (25°C) en el medio de cultivo de Chang (peptona-biotriptasa 16.6 g/L; Na₂HPO₄ 1.5 g/L; dextrosa 2.7 g/L; KH₂PO₄ 0.9 g/L, pH 6.8), suplementado con suero fetal bovino (Equitech Bio, Texas) al 10%. El cultivo se mantuvo en fase logarítmica de crecimiento para evitar la formación de formas quísticas y se sembró cada 48-72 h. Las expansiones masivas de trofozoítos, fueron llevadas a cabo en cajas de cultivo de 75 cm² y 25 cm² (Corning, NY), con 20 y 10 mL de medio de cultivo respectivamente y en fase logarítmica de crecimiento.

Para observar el efecto citopático de extractos totales, trofozoítos completos y el medio condicionado se realizaron interacciones con la línea celular MDCK. Esta línea se deriva de epitelio de riñón de perro y se caracteriza por formar monocapas en cultivo, donde las UE's han sido ampliamente estudiadas y descritas. Monocapas de células MDCK fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio previamente silanizados (Sigma-Aldrich) y esterilizados en medio mínimo esencial MEM (Gibco), suplementado con suero fetal bovino al 20% y una mezcla comercial de antibióticos penicilina-estreptomina (1 000, 000 U-1mg respectivamente). Las células se crecieron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Los cultivos celulares de epitelio corneal de conejo (RCE1) fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Federico Castro MuñozLedo del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

8.2 Inhibidores de proteasas

Se usaron diferentes inhibidores para los 3 tipos de proteasas a estudiar en los zimogramas, en los ensayos cuantitativos y en los ensayos con células MDCK. Para metalo-proteasas se usó: EDTA; para las serina proteasas se utilizó PMSF, y aprotinina; para cisteína proteasas, PHMB, NEM y E-64 (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de Inhibidores de proteasas

| Inhibidor | Concentración |
|--------------------------------------------------------------------|---------------|
| N-etil-maleimida (NEM) (Sigma-Aldrich) | 5 mM |
| Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (J.T. Baker) | 2 mM |
| Ácido p-hidroximercuribenzoico (PHMB) (Sigma-Aldrich) | 10 mM |
| Aprotinina (Roche) | 6 µM |
| Trans-epoxi-L-leucil amido- (4-guanidino) butano (E-64) (Roche) | 10 µM |
| Ácido iodoacético (IAA) (Sigma-Aldrich) | 5 µM |
| Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich) | 5 mM |

8.3 Obtención de muestras

Los trofozoítos de *A. mauritaniensis* se cosecharon a las 48 h de crecimiento, enfriando las cajas de cultivo a 4°C en baño de hielo durante 60 min. Las amibas fueron centrifugadas a 1,500 rpm por 15 min y lavadas con PBS pH 7.2. Se agregó PBS en proporción 1:1 al volumen de la pastilla. El lisado celular de 20×10^6 trofozoítos se obtuvo mediante 10 ciclos de congelación-descongelación empleando nitrógeno líquido y agua hirviendo. La lisis celular se comprobó por microscopia de luz. Al extracto total amibiano se le adicionó un volumen de PBS igual al volumen de la pastilla obtenida por centrifugación y se calculó la concentración de los inhibidores en función del volumen total del PBS más el volumen de la pastilla celular se muestran en la tabla 5. Se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976) y las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso (no mayor a 3

días). Para la zimografía se realizaron los extractos totales de la forma antes descrita solo con la excepción del uso de los inhibidores de proteasas.

Para la obtención del medio condicionado se tomaron 6×10^6 trofozoítos crecidos en medio de Chang, suplementado con suero fetal bovino al 2% (Equitech Bio, Texas) en cajas de cultivo de 25 cm^2 (Corning, NY). Posteriormente se retiró el medio con suero y se adicionó 5 mL de medio nuevo sin suero fetal bovino y se incubó durante 24 h a 25°C , con la finalidad de concentrar los productos de secreción amibiana. Para confirmar que el medio condicionado provenga de amibas vivas, se valoró la viabilidad de los trofozoítos por la técnica de exclusión de azul de tripano la cual fue del 98%, este procedimiento se realizó cada vez que se obtuvo el medio condicionado. Después de 24 h, el medio se recuperó, se centrifugó a 7,000 rpm y se pasó a través de un filtro estéril de $0.22 \mu\text{m}$ de poro (Millipore, MA). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso (no mayor a 3 días).

8.4 Zimogramas

Para examinar la actividad proteolítica de los extractos totales (30 μg) y el medio condicionado (40 μL), se realizaron ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% co-polimerizados con gelatina de piel porcina (Sigma-Aldrich, Missouri) a una concentración de 0.1%. La electroforesis se llevó a cabo primero a 80 Voltios por 15 min para concentrar la muestra y posteriormente a 100 Voltios durante 3 h para la separación de las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en un baño de hielo con la finalidad de evitar la proteólisis de las muestras. Posteriormente los geles fueron lavados una 30 min en tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri) al 2.5%, con dos cambios cada 15 min para eliminar el SDS, ya que este detergente interfiere con la actividad proteolítica de las proteasas. A continuación los geles fueron incubados en el caso de los extractos totales durante 17 h y en el caso de los medios condicionados durante 24 h. La incubación de los geles se realizó con los amortiguadores de activación a diferentes pH's: pH 3 (CH_3COOH 100 mM; CaCl_2 , 2 mM), pH 5 (CH_3COONa , 100 mM, CaCl_2 2

mM), pH 7 (Tris-OH, 100 mM; CaCl₂ 2 mM) y pH 9 (Glicina, 100 mM; CaCl₂ 2 mM). Los geles, también fueron incubados a diferentes temperaturas (25 y 37°C). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich, Missouri) al 0.5% por 2 h y se destiñeron con una solución de metanol (J.T. Baker): ácido acético (J.T. Baker): agua (45:10:50 v:v:v) hasta la aparición de las bandas proteolíticas, las cuales se visualizaron como bandas claras donde no se presentó tinción debido a que se produjo la degradación de la gelatina. Para determinar el tipo de proteasas presentes en el patrón proteolítico del extracto total y del medio condicionado, se utilizaron inhibidores para los tipos de proteasas de serina, cisteína y metalo. Los inhibidores fueron agregados a las muestras en la concentración descrita previamente en la tabla 5 e incubados durante 1 h a temperatura ambiente en agitación orbital y en ausencia del amortiguador de muestra.

8.5 Determinación de la actividad proteolítica con azocoll

Para determinar cuantitativamente la actividad proteolítica de las proteasas presentes en los extractos totales y medio condicionado se realizaron ensayos con azocoll (Millipore, MA), sustrato cromogénico para proteasas. Estos sustratos son insolubles; de manera que cuando los aminoácidos que están unidos al colorante Azo se degradan por la acción proteolítica, se disuelven y generan un color rojo en el sobrenadante al ocurrir la proteólisis, el cual puede ser cuantificado por espectrofotometría a 520 nm. La absorbancia resultante es directamente proporcional a la actividad proteolítica de las muestras. Las mezclas de reacción, preparadas en los tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, se ajustaron a un volumen final del 500 µL que contienen: azocoll 2 mg; soluciones amortiguadoras a pH 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 (c.b.p. de amortiguador para 500 µL) preparados como se indicó previamente; y 250 µg de proteína de extractos totales o 200 µL del medio condicionado, se detiene la reacción con 500 µL de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich, Missouri) al 10% y se deja reposar por 5 min. Posteriormente las muestras se centrifugan en los tubos a 7000 rpm por 15 min se recuperó

el sobrenadante, al cual se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm.

8.6 Efecto citopático

Para la realización de los ensayos citopáticos una vez determinada la identidad de las proteasas, se realizaron las interacciones a una relación 1:2 con células MDCK y a las relaciones 1:1 y 1:3 con células de epitelio corneal de conejo RCE1, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Federico Castro MuñozLedo del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN. Estas interacciones se realizaron en medio MEM (Gibco-Invitrogen, NY) sin suero fetal bovino con los trofozoítos completos de *A. mauritaniensis* durante 1, 3, 6 y 10 h para MDCK y para las células RCE1 durante 1, 2 y 3 h. Posteriormente, se evaluó la capacidad de daño a los cultivos mediante un microscopio óptico invertido.

8.7 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Para corroborar por ultraestructura que se trabajó con la especie *A. mauritaniensis* se realizaron estudios de MET y se comparó con la especie *A. castellanii*. Se partió de 20×10^6 trofozoítos de ambas especies, se colocaron en baño de hielo durante 60 min y se recuperaron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min, se realizaron tres lavados del paquete celular con PBS pH 7.4, las amibas fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M (pH 7.4) durante 1 h, se realizaron tres lavados con cacodilato de sodio 0.1 M, se post-fijaron las muestras en 1 mL de tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Sciences, PA) al 2% diluido 1:1 en cacodilato de sodio 0.2 M durante 1 h (en agitación), se realizaron 3 lavados con cacodilato de sodio (Electron Microscopy Sciences, PA) 0.1 M y se deshidrataron las muestras en alcohol al 70, 80, 90% y dos veces en alcohol al 100% durante 5 min en agitación, se añadió 1 mL de óxido de propileno a cada tubo durante 10 min y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Luego, se añadió la resina de

pre-inclusión diluida 1:1 en óxido de propileno durante 1 h, los tubos se colocaron en el desecador durante 12 h, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se decantaron los tubos, se incluyeron las muestras (pastillas) en resina total (Epon, Electron Microscopy Sciences), se mezclaron las pastillas y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se dejaron polimerizar en una estufa durante 48 h a una temperatura de 55-65°C. Posteriormente se realizaron cortes semifinos de 0.5 µm de espesor y se tiñeron con azul de toluidina para observarlos al microscopio óptico, enseguida se realizaron los cortes finos de 80 nm de espesor y se colocaron en rejillas de cobre, en donde se contrastaron con acetato de uranilo (Electron Microscopy Sciences, PA) y citrato de plomo (Electron Microscopy Sciences, PA), se realizó un enjuague con agua bidestilada y se secaron cuidadosamente con papel filtro. Finalmente, se observaron las muestras por MET en un microscopio ZEISS-910.

8.8 Inmunofluorescencia Indirecta

A monocapas con una confluencia del 98%, se les agregaron 5×10^5 trofozoítos completos y se interaccionaron durante 4 h. Durante el tiempo de la interacción, el MEM (Gibco, NY) se utilizó sin suero fetal bovino para impedir la proliferación celular. Después de la incubación se realizaron 3 lavados con MEM sin suero, se lavó 3 veces con PBS frío y estéril para eliminar el medio y los trofozoítos. Ya realizados los lavados los cultivos fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 20 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS frío y estéril para eliminar el fijador durante 5 min. Las células se permeabilizaron con tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.2% en PBS durante 15 min, y se realizaron tres lavados con PBS. Las muestras se bloquearon con albúmina al 1%, durante 30 min a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo se eliminó el excedente de albúmina nuevamente con tres lavados con PBS frío de 5 minutos cada uno. Posteriormente, las células fueron incubadas por 2 h a 37°C con los anticuerpos primarios contra las proteínas de las UE: de ratón anti-occludina (dilución 1:20), de conejo anti-

claudina-1 (dilución 1:20) y de conejo anti-ZO-1 (dilución 1:20) (Zymed-Invitrogen, CA). Para marcar también a los trofozoítos, se empleó un anticuerpo de ratón anti-amiba (dilución 1:50). Concluido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS frío y estéril. Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios fluoresceínados específicos para las proteínas de las UE: de cabra anti-conejo (dilución 1:25), y de cabra anti-ratón (dilución 1:25) (Santa Cruz Biotechnology, Texas). Para marcar a los trofozoítos, se utilizó un anticuerpo secundario de ratón acoplado a CY5 en una dilución 1:50. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó a 37°C durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados durante 5 min c/u con PBS frío y estéril. Para la marca de los núcleos se empleó yoduro de propidio al 0.001% durante 5 min. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con resina Vecta Shield y se sellaron con barniz transparente. Las muestras se almacenaron en oscuridad y 4°C para conservar la fluorescencia. Finalmente, se realizó el análisis mediante un microscopio confocal Olympus (modelo FV-500).

8.9 Western blot

Para la evaluación del daño en los niveles de expresión de las proteínas de la UE las células MDCK se interaccionaron con los trofozoítos de *A. mauritaniensis* en medio sin suero fetal. Posteriormente, se retiró el medio y se agregó PBS pH 7.4 y las preparaciones se colocaron en hielo por 15 min para despegar a las amibas adheridas a la monocapa. A continuación, las células se lisaron con amortiguador de lisis (150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y Trizma base 50 mM pH 8.4 (Sigma-Aldrich)) con inhibidores de proteasas. Los inhibidores de proteasas y sus concentraciones finales que se utilizaron se mencionan en la tabla 5. El lisado recuperado se dejó en agitación orbital por una hora a 4°C y posteriormente fue centrifugado a 15 rpm por 20 min y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976). Se tomaron 40 µg de extractos proteicos de la

interacción MDCK-amiba las cuales fueron separadas en geles de poliacrilamida al 7.5% primero a 80 Voltios por 15 min y después por 170 min a 100 Voltios. Se realizó la electro-transferencia a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore, MA) por 45 min a 400 miliamperes (mA) a 4°C. Terminada la transferencia, la membrana fue bloqueada con leche descremada (Sveltty) al 10%, en PBS durante 1 h a 37°C o toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS-tween 0.05% dos lavados durante 5 min y uno por 10 min. Después se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico para la proteína ZO-1 (dilución 1:300) y contra la proteína ERK (dilución 1:500) (Zymed-Invitrogen, CA), durante 1-2 h a 37°C o toda la noche a 4°C en agitación suave. La membrana se lavó 4 veces con PBS-tween 0.05% frío durante 5 min. Se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa contra conejo a una dilución de 1:500 y 1:1000 para ERK (Zymed-Invitrogen, CA) diluidas en leche descremada (Sveltty) al 7% en PBS. Se dejó incubar durante 1 h a 37°C y se lavó 6 veces (5 min cada vez) con PBS-tween 0.05% frío. Para el revelado de la asociación antígeno-anticuerpo se utilizó una solución de luminol-peroxidasa (1:1) (Santa Cruz Biotechnology, Texas), la cual se expuso en placas autoradiográficas. Las placas se colocaron en una solución reveladora al 20% (Kodak, NY), seguido de la solución fijadora (Kodak, NY) para después ser lavado con agua corriente.

RESULTADOS

9. RESULTADOS

9.1 Análisis ultraestructural de *Acanthamoeba mauritaniensis*

Para corroborar que nuestra cepa utilizada en el laboratorio correspondiera a la especie *A. mauritaniensis*, que además no estuviera contaminada por microorganismos endosimbiontes y que además pudiéramos conocer su morfología, se comparó con *A. castellanii* mediante MET (Figura 12). En las imágenes no se encontró contaminación por otros microorganismos; además *A. mauritaniensis* presentó diferencias muy marcadas con *A. castellanii*, teniendo un mayor número de mitocondrias de gran tamaño (m) así como mayor cantidad de acantópodos (cabeza de flecha), que se caracterizan por ser más largos y anchos. Por lo tanto, mediante MET se pudo conocer y corroborar la morfología de la especie *A. mauritaniensis*.

9.2 Capacidad de daño de *Acanthamoeba mauritaniensis*

Para ver la capacidad de daño de *A. mauritaniensis*, se determinó el efecto citopático de los trofozoítos sobre monocapas de células MDCK durante 1, 3, 6 y 10 h de co-incubación en una relación 1:1 (una célula epitelial por una amiba). Observaciones al microscopio óptico, revelaron que las monocapas control mantienen su morfología íntegra con el paso del tiempo (1-10 h) (Figura 13 A). En cambio, *A. mauritaniensis* comienza a producir daño considerable en las MDCK, separándolas y lisándolas, desde la primer hora, y siendo mayor el efecto a las 10 h (Figura 13 C). El daño producido por *A. mauritaniensis* es igual al causado por *A. castellanii* (Figura 13 B) que utilizamos como control positivo de daño. Por lo tanto podemos sugerir que *A. mauritaniensis* tiene la misma capacidad de daño sobre la monocapa de células MDCK, que *A. castellanii* (Figura 13).

9.3 Caracterización de las proteasas de *A. mauritaniensis*

En primer lugar, quisimos establecer el porcentaje adecuado de los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) co-polimerizados con gelatina porcina para llevar a cabo el análisis de la actividad proteolítica, tanto de extractos totales como

del medio condicionados de la amiba a estudiar. Nuestros resultados, nos permitieron determinar que los geles al 12% resuelven bandas proteolíticas bien definidas. Al analizar la actividad proteolítica de extractos totales de *A. castellanii* y *A. mauritaniensis* (Figura 14), observamos que ambas cepas despliegan actividades proteolíticas similares cuando se incuban a 25°C y con un pH de 7.0, encontrándose pesos moleculares de 27, 53.7, 80.3, 100 y 173 kDa (Figura 14 A). Cuando los extractos totales fueron incubados a 37°C y al mismo pH, se observó una marcada actividad proteolítica diferencial por parte de *A. mauritaniensis* dentro de los pesos moleculares de 20, 25.8, 31.6, 38.7 y 55.3 kDa. Identificada la actividad proteolítica de *A. mauritaniensis*, se procedió a evaluar el efecto del pH, en ambas temperaturas (25°C y 37°C) (Figura 15). Los resultados mostraron que a 25°C y a un pH de 3.0, la actividad proteolítica corresponde a bandas de pesos moleculares de 146, 119, 64, 42 kDa, mientras que a pH de 5.0 se observaron las mismas bandas y apareció una banda adicional de 32.4 kDa (Figura 15 A). En el pH de 7.0 se observó actividad proteolítica mayor con bandas de pesos moleculares de 146, 119, 64.2, 80 y 42 kDa. La actividad proteolítica a pH de 9.0 fue menor en proporción a los demás pH's, mostrándose solo las bandas de 146, 119 y 64.2 kDa (Figura 15 A). En los geles incubados a 37°C y a pH de 3.0 se observaron solo bandas que corresponden a los pesos de 146, 119 y 64 kDa, mientras que a pH de 5.0 la actividad aumenta con la aparición de una banda de 42 kDa. En el pH de 7.0 se observó el mismo bandeo, surgiendo bandas de 32 y 23 kDa. En la incubación a pH de 9.0 se repitió el patrón de bandas de 146, 119, 64.2, 42.6 y 32 kDa (Figura 15 B). En conclusión, se observó que hay una mayor actividad de proteasas en extractos totales a la temperatura de 37°C en los pH's de 5.0 a 9.0.

9.4 Determinación del tipo de proteasas en *A. mauritaniensis* en extractos totales

Para la determinación del tipo de proteasas presentes en los extractos totales de *A. mauritaniensis*, de igual manera se realizaron zimogramas en

presencia de los inhibidores de proteasas para los tres tipos de proteasas ya previamente reportadas presentes en la especie *Acanthamoeba* (Figura 16 A y 16 B) (He et al., 1990; Ferrante & Bates, 1988; Mitro et al., 1994; Serrano-Luna et al., 2006; Hadaz & Mazur, 1993; Cao et al., 1998) inhibidores para serina proteasas: PMSF y Aprotinina. Inhibidores para cisteína proteasas: PHMB, NEM, E-64 y para metalo-proteasas: EDTA. Cuando se utilizaron los inhibidores para las proteasas de serina, a un pH de 7.0 y una temperatura de 37°C, se observó que el PMSF evita la presencia de casi todas las bandas proteolíticas, mientras que la aprotinina presenta un inhibición parcial (Figura 16). Adicionalmente se observó una inhibición parcial cuando se utilizaron los inhibidores para cisteína proteasas E-64, NEM, PHMB así como con el inhibidor de metalo-proteasas EDTA. Cabe mencionar que estos inhibidores funcionan mejor a un pH de 7.0 (Figura 16 B). Las bandas obtenidas en los geles de extractos totales con los pesos moleculares se resumen en la tabla 5. Por lo tanto el tipo de proteasas presentes en mayor cantidad en extractos totales de *A. mauritaniensis* son las proteasas del tipo serina.

9.5 Caracterización y determinación del tipo de proteasas en *A. mauritaniensis* en el medio condicionado

Por otro lado también se analizó el medio condicionado de *A. mauritaniensis* en zimogramas incubados a pH's de 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 a una temperatura de 37°C (Figura 17 A). Donde se observó que a pH 3.0 la proteólisis de la gelatina fue en menor magnitud en comparación de los pH's de 5.0 a 9.0 donde se observó mayor actividad proteolítica en los geles de sustrato, observándose bandas proteolíticas en los pesos moleculares de 24.3, 29, 43.2, 56.4, 70.5, 100.6 y 164 kDa. De igual manera se utilizaron los inhibidores de proteasas específicos ya mencionados, para determinar el tipo de proteasas presentes en el medio condicionado. Cuando las muestras fueron incubadas a pH's de 5.0 y 7.0 (Figura 18), se observó la inhibición completa cuando se utilizaron los inhibidores de proteasas de serina PMSF seguida por aprotinina, también se logró observar inhibiciones parciales con

los inhibidores de proteasas de cisteína (E-64, NEM y PHMB) y con el inhibidor de metalo-proteasas EDTA. Las bandas obtenidas en los geles de medio condicionado con los pesos moleculares se resumen en la tabla 5. Por lo que se puede concluir que de igual manera que en los extractos totales y en el medio condicionado también predominan las proteasas de serina y en menor cantidad las cisteína y metalo.

9.6 Cuantificación de la actividad proteolítica de extractos totales y del medio condicionado de *A. mauritaniensis*

Para cuantificar la actividad proteolítica de *A. mauritaniensis* se realizaron ensayos con el sustrato cromogénico azocoll, el cual es un sustrato general para medir la actividad de proteasas. Utilizando este sustrato se determinó el comportamiento de la actividad proteolítica de los extractos totales incubados a pH's de 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 a 37°C, siendo la principal actividad proteolítica en los pH's de 7.0 y 9.0 (Figura 19). Estos extractos totales también fueron incubados por una hora con inhibidores de proteasas específicos previamente descritos. Cuando se utilizaron los inhibidores para las proteasas de serina, aprotinina y PMSF se observó que la disminución fue estadísticamente significativa en cuanto al control de cada pH por parte de estos dos inhibidores siendo más marcada en el caso del inhibidor PMSF y aun pH de 9.0 (Figura 19 A). Posteriormente se realizaron los ensayos de azocoll en extractos totales para determinar proteasas de cisteína con los inhibidores E-64 y NEM. Observándose que hay una disminución estadísticamente significativa en comparación con el control de actividad proteolítica del extracto total en todos los pH's a los que fue incubado, destacándose la incubación a pH 7.0 donde la inhibición por el inhibidor E-64 fue significativamente mayor que la inhibición con NEM (Figura 19 B). Sin embargo, la disminución de la actividad proteolítica con estos inhibidores no fue tan pronunciada como cuando se inhibieron las proteasas de serina. Cuando se utilizó el inhibidor de metalo-proteasas EDTA solo se observó disminución significativa a pH's de 5.0 y 7.0 (Figura 19 C). Por lo tanto, con

estos ensayos cuantitativos corroboramos al igual que en los zimogramas de extractos totales que el principal tipo de proteasas son las de tipo serina.

Posteriormente se realizaron los mismos ensayos de azocoll, pero en este caso se cuantificó la actividad proteolítica del medio condicionado. Se observó que la actividad proteolítica aumenta de manera importante desde el pH de 5.0 siendo mayor a pH de 7.0 y disminuyendo ligeramente a pH de 9.0 (Figura 20).

El medio condicionado se incubó con los inhibidores de proteasas específicos para el tipo serina, cisteína y metalo (Figura 20). Al igual que los extractos totales, en el medio condicionado los inhibidores de las proteasas de serina presentaron un mayor efecto (Figura 20 A), que los inhibidores de las cisteína y metalo-proteasas (Figura 20 C). Siendo nuevamente el PMSF, el inhibidor que disminuye más significativamente la actividad proteolítica a todos los pH's evaluados (Figura 20 A). Por lo tanto, en los ensayos con azocoll se encontró que en el medio condicionado se encuentran principalmente proteasas del tipo serina y en menor cantidad las del tipo cisteína y metalo-proteasas, corroborando los datos encontrados en los zimogramas.

9.7 Efecto citopático sobre células MDCK

Para determinar el efecto citopático producido por *A. mauritaniensis* sobre las monocapas de células MDCK se realizaron experimentos en una relación de 1 célula MDCK por cada 2 amibas durante 15 y 30 min, 1, 3 y 6 h (Figura 21). Estas interacciones se llevaron a cabo en medio MEM (Gibco, NY) libre de suero para impedir la proliferación celular y tener una confluencia celular del 90%. Se utilizaron como control en todos los tiempos a células MDCK sin interaccionar con trofozoítos de *A. mauritaniensis*. A los 15 min (Figura 21 B) se observó que las amibas se adherían a las células, muchas de ellas se encontraron en las uniones intercelulares. A los 30 min de co-incubación (Figura 21 C) se observaron más trofozoítos en las uniones

intercelulares y también se observó que las células MDCK comenzaron a separarse unas de otras. A la hora post-interacción se observaron mayores zonas de lisis celular (asteriscos) así como la pérdida de la morfología característica de las células MDCK en cultivo (flechas) (Figura 21 D). A las 3 h las áreas de lisis celular fueron más evidentes (asteriscos), además las células presentaron una morfología más redondeada (flechas) (Figura 21 E). A las 6 h de interacción se observó gran daño en la monocapa de células MDCK (Figura 21 F). Esto nos indica que *A. mauritaniensis* causa un gran efecto citopático sobre la línea celular MDCK desde tiempos muy tempranos, iniciándose con la adhesión de las amibas y localizándose entre las uniones intercelulares. Posteriormente se observó un daño más evidente entre las células y en algunas zonas de la monocapa se observó lisis celular.

9.8 Ensayos de efecto citopático sobre células RCE1

Con el objetivo de estudiar el efecto de *A. mauritaniensis* en una línea celular proveniente de córnea y que sea más representativo a nivel fisiopatológico a lo que ocurre en la QA, se utilizaron cultivos de queratinocitos provenientes de epitelio corneal de conejo (RCE1), estas células se co-cultivan con fibroblastos 5T5 que sirven como productores de la base de colágena como sustrato (Figura 22) (Castro-Muñozledo, 1994).

Como control en todos los tiempos se utilizaron células RCE1 sin interaccionar con trofozoítos de *A. mauritaniensis*. Se realizaron las interacciones en una relación 1 célula RCE1 por cada amiba (relación 1:1) en medio MEM libre de suero fetal y con una confluencia del 90%. Posterior a la hora de interacción (Figura 22 B) se observaron a las amibas adheridas a las células e interesantemente se visualizaron con una localización entre las uniones intercelulares. A un mayor aumento, se observa mejor como los trofozoítos separan a los queratinocitos, afectando principalmente las uniones entre las células (Figura 22 C) (asteriscos).

Cabe mencionar que solo se interaccionó por una hora con los queratinocitos ya que a las 3 h la capa de células del cultivo se levantaba completamente, esto provocado probablemente por la acción de las proteasas secretadas por los trofozoítos de *A. mauritaniensis* sobre la base de colágena (proveniente de los fibroblastos). Estos resultados los podemos transpolar a que probablemente esta amiba es capaz de producir queratitis amibiana ya que fue capaz de dañar gravemente a los cultivos de células del epitelio corneal de conejo.

9.9 Análisis de la localización de las proteínas de la UE después del contacto con *A. mauritaniensis*

Dado que la amiba *A. mauritaniensis* daña las monocapas epiteliales MDCK y REC1, y específicamente se ubica en las regiones de contacto célula-célula, cabe especular que altera alguna de las estructuras del complejo de unión intercelular (CUI). Siendo la UE la estructura del CUI más expuesta al medio y a los microorganismos, es posible que sus componentes se ven afectados por *A. mauritaniensis*. En primer lugar evaluamos la localización de las proteínas de la UE, ZO-1, claudina-1 y ocludina mediante ensayos de inmunofluorescencia, en células MDCK incubadas con trofozoítos completos de *A. mauritaniensis* durante 3 y 6 h (Figura 23).

Para determinar la ubicación de las amibas, estas se tiñeron con un anticuerpo específico anti-proteínas totales en azul. Adicionalmente, los núcleos fueron teñidos en rojo con yoduro de propidio.

Como se puede ver en las células control, la proteína ZO-1 se localiza en los bordes celulares (Figura 23 A), con un patrón continuo a lo largo de la membrana plasmática. En cambio, en presencia de *A. mauritaniensis*, la proteína ZO-1 se pierde en algunas zonas a las 3 h de interacción (Figura 23 B) (flechas) y a las 6 h las pocas células con marca, presentan un patrón discontinuo en la membrana (Figura 23 C). Cabe aclarar que todos los tiempos se observaron a las amibas situadas entre las uniones intercelulares.

Estos resultados nos sugieren que la localización de la proteína ZO-1 está siendo alterada por *A. mauritaniensis* de una forma dependiente del tiempo de incubación.

Posteriormente se analizó a la proteína claudina-1 en los mismos tiempos ya mencionados anteriormente (Figura 24). En el control de células MDCK se pudo observar la marca de claudina-1 como un patrón continuo en la periferia de la célula (Figura 24 A). A las 3 h de interacción con las amibas se observó que el patrón de claudina-1 se pierde en algunas células (Figura 24 B). A las 6 h de interacción, la marca de claudina-1 casi se ha perdido observándose el mismo patrón de parches discontinuos en las periferias celulares (Figura 24 C). Estos resultados nos sugieren que al igual que ZO-1, la claudina-1 también se altera por *A. mauritaniensis* de manera tiempo dependiente.

Por último, se analizó a la proteína ocludina en los mismos tiempos estudiados y de la misma manera (Figura 25). En el control de 6 h se pudo observar la marca de ocludina como un patrón continuo en la periferia de las células (Figura 25 A). A las 3 h de interacción, se observó que el patrón continuo en la periferia comienza a perderse en la periferia de algunas células. En este tiempo, la localización de la ocludina no se alteró tanto como la de ZO-1 y claudina (Figura 25 B). En cambio, a las 6 h de interacción, la tinción de ocludina muestra un patrón de parches similar al observado para ZO-1 y claudina-1, en las pocas células con marca (Figura 25 C). Estos resultados nos sugieren que al igual que ZO-1 y claudina-1, la proteína ocludina también se altera por los trofozoítos de *A. mauritaniensis* de manera tiempo dependiente, pero en menor grado que ZO-1 y claudina-1.

9.10 Integridad de la proteína ZO-1 mediante western blot

Cuando la amiba *A. mauritaniensis* interacciona con las células epiteliales MDCK, altera la localización de las proteínas de la UE ZO-1, claudina-1 y ocludina; sin embargo, se desconoce si también afecta su estabilidad. Por lo tanto, en segundo lugar evaluamos si la proteína ZO-1 es degradada cuando

A. mauritaniensis interacciona con las células epiteliales. Mediante ensayos de western blot, se analizaron extractos de proteícos de MDCK incubados por 1, 3, 6 y 10 h con trofozoítos completos de *A. mauritaniensis*. Los resultados muestran que ZO-1 se degrada a partir de las 3 h de interacción y esta degradación incrementa conforme pasa el tiempo, en comparación con células control no incubadas con amibas (Figura 26 A). La degradación de la proteína se hizo más evidente cuando los niveles de ZO-1 se analizaron mediante el “software ImageJ” y fue expresada como densidad óptica relativa (DOR) (Figura 26 B). Como control de carga utilizamos marcaje contra la proteína ERK, debido a que esta proteína se encuentra en el citoplasma y no varía en nuestro estudio. Estos resultados nos sugieren que la proteína ZO-1 la cual forma parte del complejo de las UE se degrada por *A. mauritaniensis* de manera tiempo dependiente.

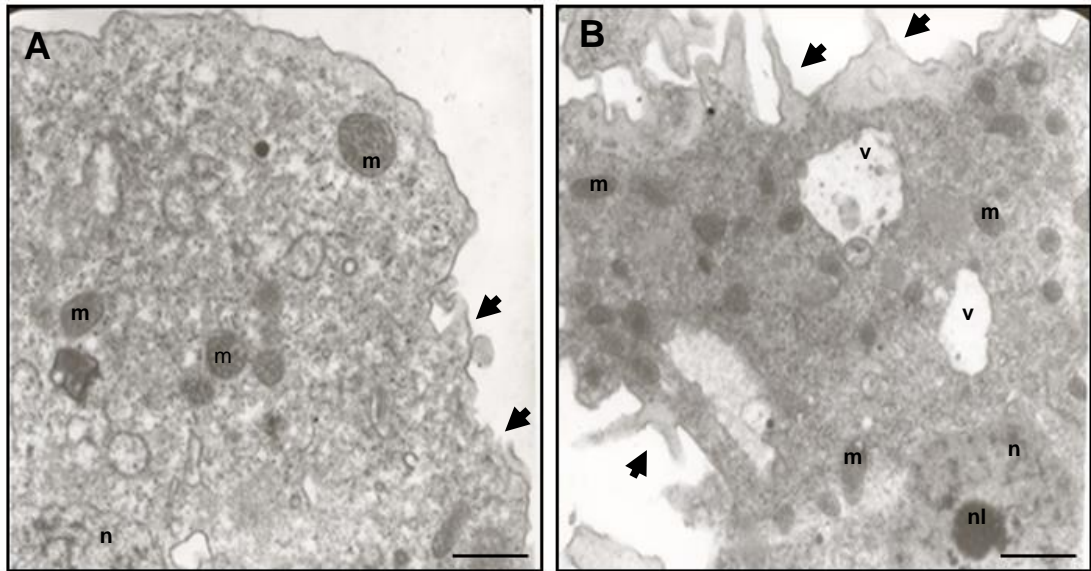


Figura 12. Análisis ultraestructural de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.
A) *Acanthamoeba castellanii*. B) *Acanthamoeba mauritaniensis*.
Flechas: pseudópodos; m: mitocondrias; v: vacuolas; n: núcleo;
nl; nucléolo. Barra = 0.8 μ m.

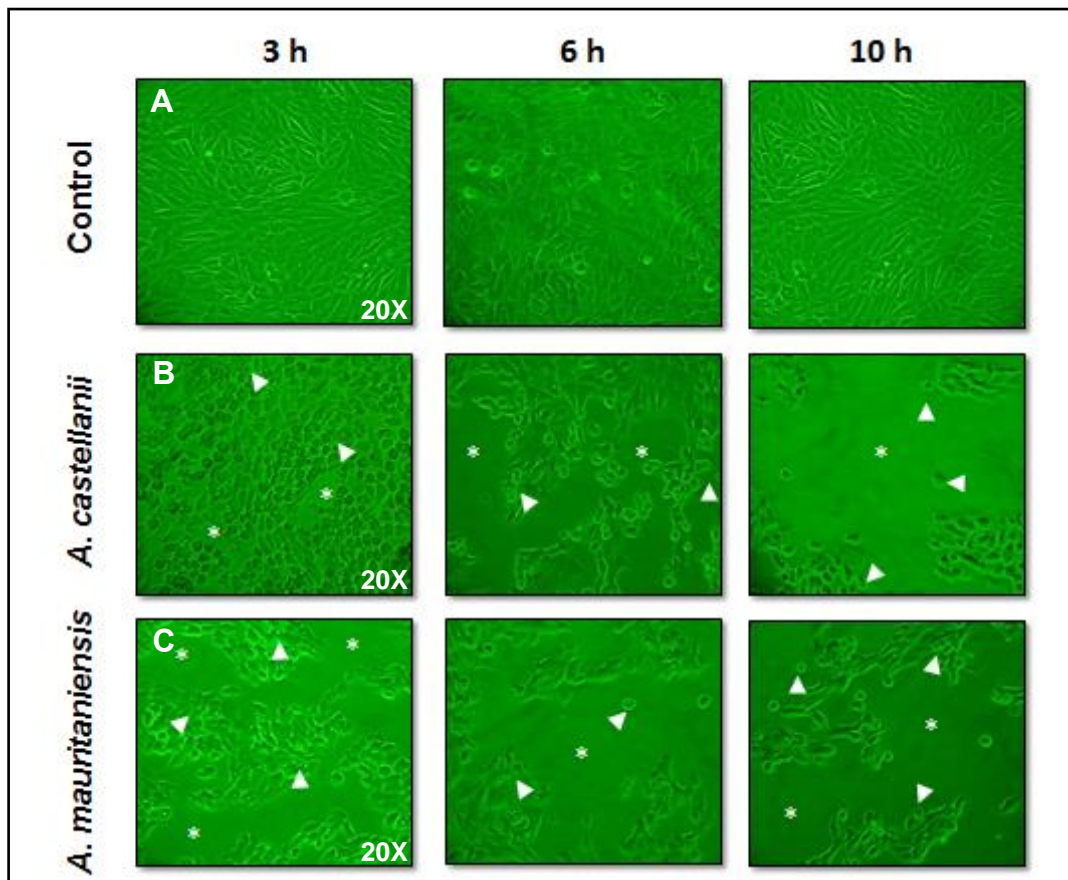


Figura 13. Efecto citopático sobre células MDCK. Interacciones de *Acanthamoeba* spp. con células MDCK relación 1:1 a tiempos de 3, 6 y 10 h. A) MDCK sin amibas; B) Células MDCK interaccionadas con *A. castellanii*; C) Células MDCK en interacción con *A. mauritaniensis*. Cabezas de flechas: amibas, asteriscos: lisis de la monocapa.

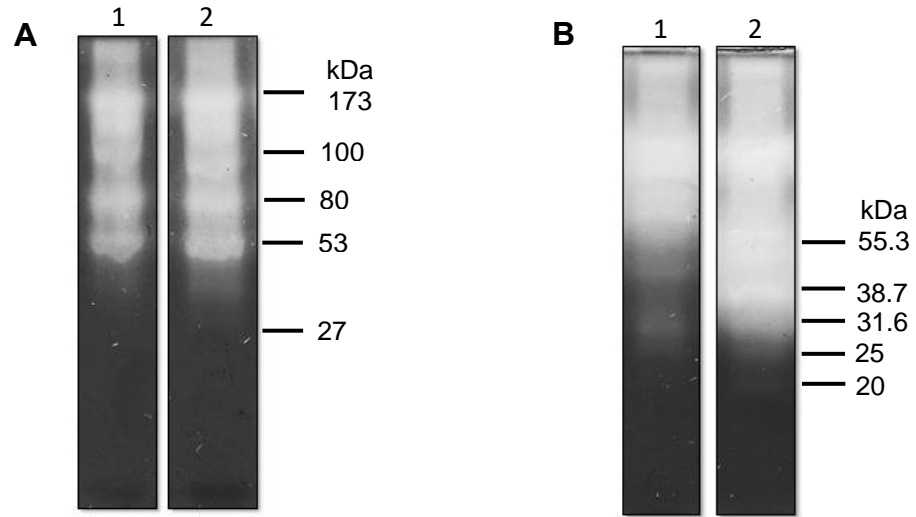


Figura 14. Zimogramas de geles SDS-PAGE al 12% copolimerizados con gelatina porcina al 0.1% e incubados a pH 7.0. A) 25°C, B) 37°C. Carril 1, extracto de *A. castellanii*; carril 2 extracto de *A. mauritaniensis*.

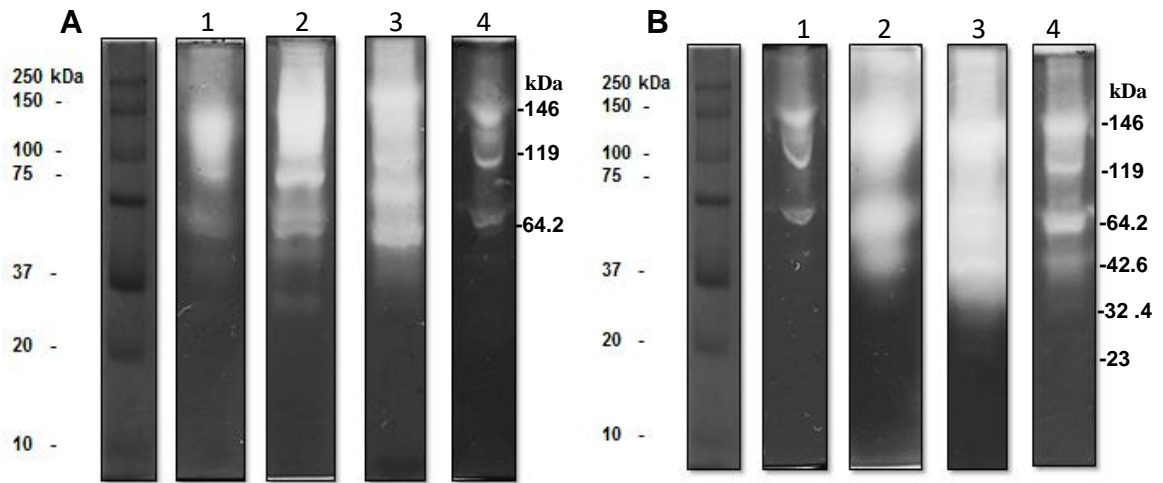


Figura 15. Efecto del pH y la temperatura en los patrones proteolíticos de extractos totales de *A. mauritaniensis*. Geles SDS-PAGE al 12% copolimerizados con gelatina porcina al 0.1%. A) 25°C, B) 37°C. Carril 1, pH 3.0; carril 2, pH 5.0; carril 3, pH 7.0; carril 4, pH 9.0.

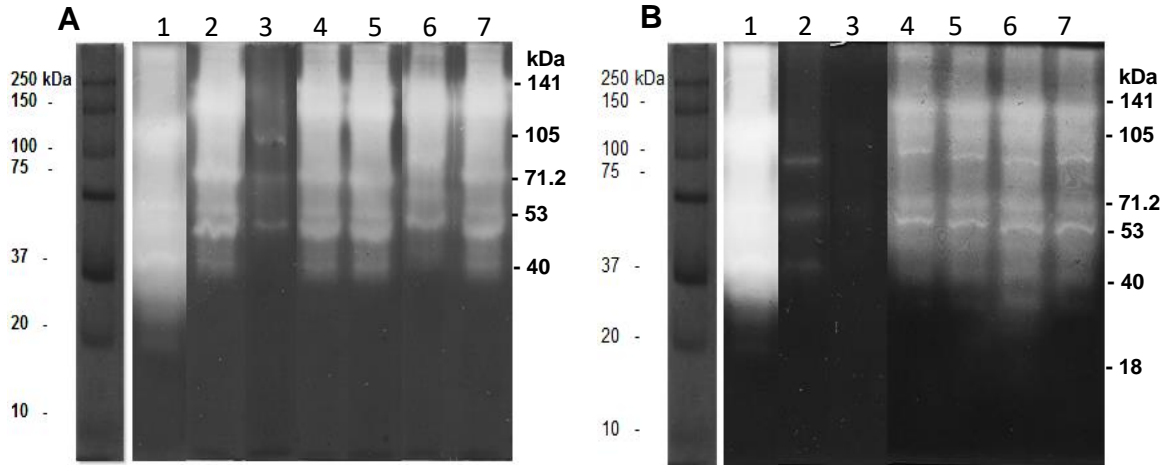


Figura 16. Efecto de los inhibidores en la actividad proteolítica de extractos totales de *A. mauritaniensis*. Geles SDS-PAGE al 12% copolimerizados con gelatina porcina al 0.1% e incubados a 37°C. A) pH 5.0, B) pH 7.0. Carril 1, sin inhibidores; carril 2, Aprotinina 6 μM; carril 3, PMSF 5 mM; carril 4, E-64 10 μM; carril 5, NEM 5 mM; carril 6, PHMB 10 mM; carril 7, EDTA 2 mM.

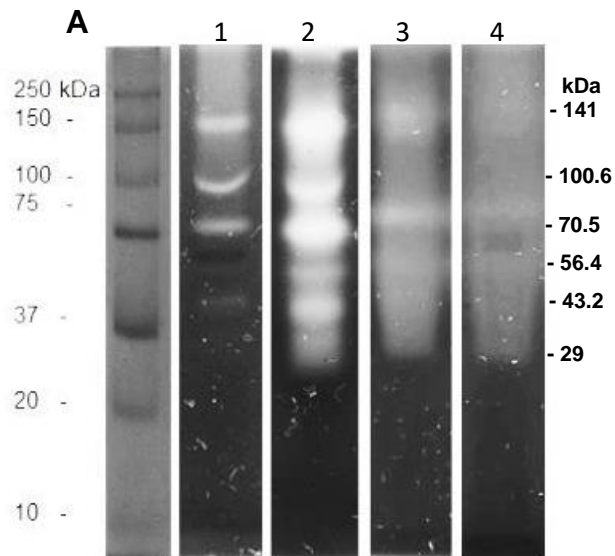


Figura 17. Efecto del pH en los patrones proteolíticos del medio condicionado de *A. mauritaniensis* e incubados a 37°C. Geles SDS-PAGE al 12% copolimerizados con gelatina porcina al 0.1%. A) 37°C. Carril 1, pH 3.0; carril 2, pH 5.0; carril 3, pH 7.0; carril 4, pH 9.0.

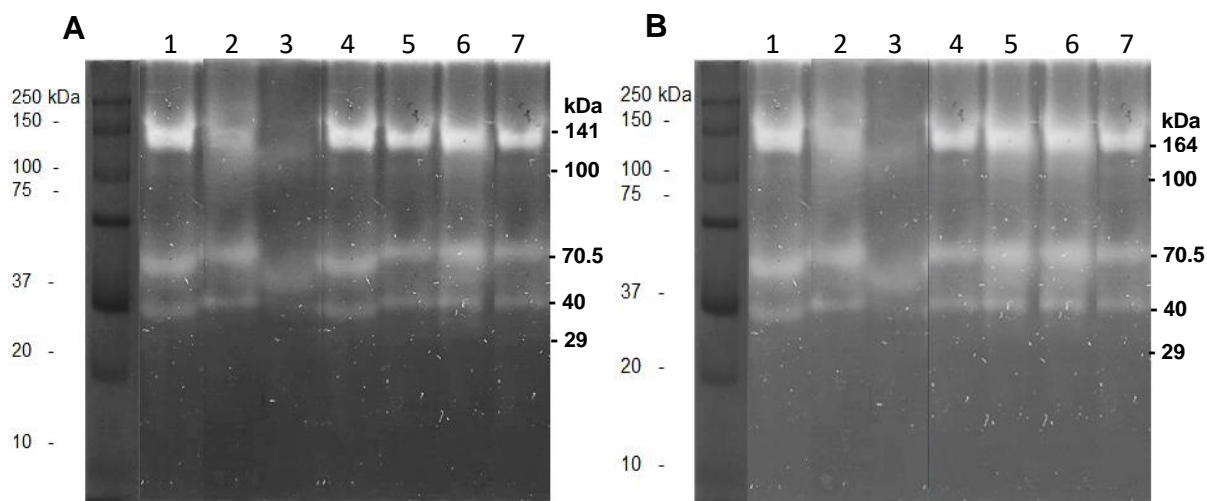


Figura 18. Efecto de los inhibidores de la actividad proteolítica de medio condicionado de *A. mauritaniensis*. Geles SDS-PAGE al 12% copolimerizados con gelatina porcina al 0.1% incubados a 37°C. A) pH 5.0, B) pH 7.0. Carril 1, sin inhibidores; carril 2, Aprotinina 6 μ M; carril 3, PMSF 5 mM; carril 4, E-64 10 μ M; carril 5, NEM 5 mM; carril 6, PHMB 10 mM; carril 7, EDTA 2mM.

Tabla 5. Clasificación de las bandas proteolíticas producidas por *A. mauritaniensis* obtenidas en los zimogramas a pH's de 5.0 y 7.0 y a una temperatura de 37°C.

| | Serina proteasas (kDa) | Cisteína proteasas (kDa) | Metallo- proteasas (kDa) |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| | 141 | | |
| | 105 | 100 | |
| Extractos totales | 71 | 70 | |
| | 40 | 40 | |
| | 18 | | |
| | 162 | 100 | 30 |
| Medio condicionado | 70.5 | 69 | |
| | 40 | 29 | |

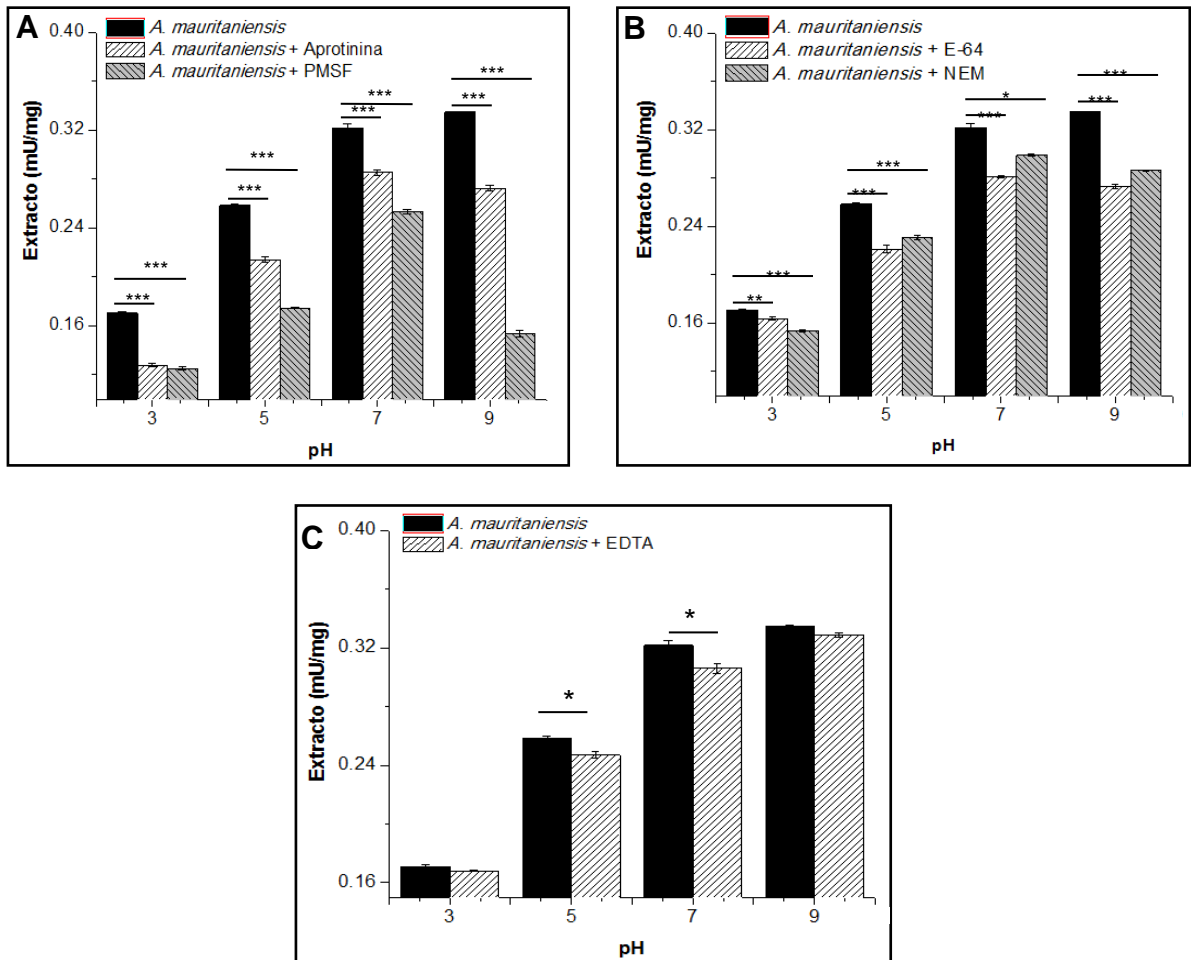


Figura 19. Actividad específica de proteasas en extracto total de *A. mauritaniensis* usando Azocoll como sustrato e incubado con inhibidores de proteasas específicos a pH de 3, 5, 7 y 9 por 16 h. A) extracto con Aprotinina 6 μ M y PMSF 5 mM. B) extracto con E-64 10 μ M y NEM 5 mM. C) extracto con EDTA 2 mM. Datos reportados en mU/mg para los extractos crudos. Los datos fueron el resultado de tres experimentos independientes. Las barras representan la media \pm el error estándar. La significancia estadística se obtuvo por medio del análisis ANOVA de una vía mediante la prueba de Dunnett (**P <0.01, *P <0.05).

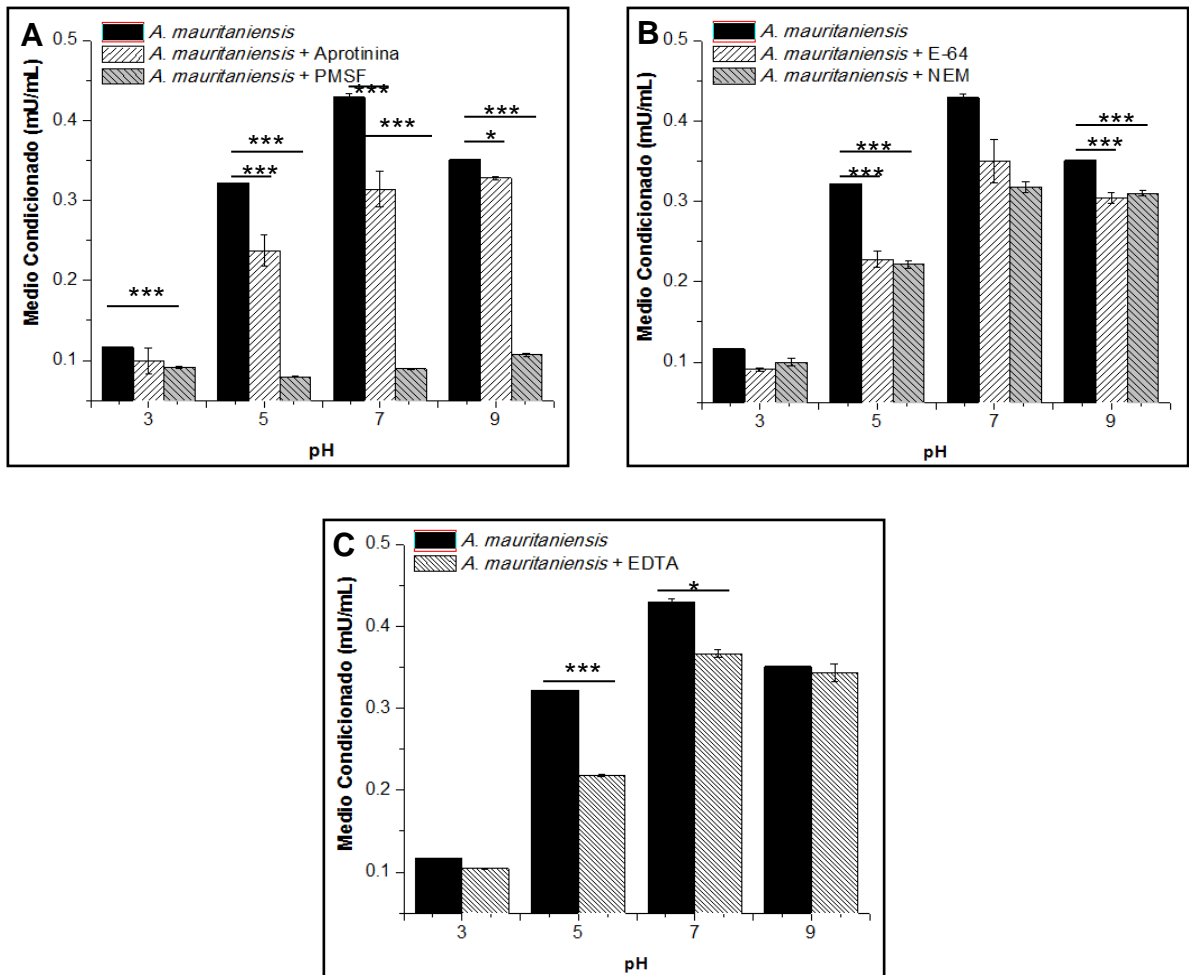


Figura 20. Actividad específica de proteasas en medio condicionado de *A. mauritaniensis* usando Azocoll como sustrato e incubado con inhibidores de proteasas específicos a pH de 3, 5, 7 y 9 por 24 h. A) medio condicionado con Aprotinina 6 μ M y PMSF 5 mM. B) medio condicionado con E-64 10 μ M y NEM 5 mM. C) medio condicionado con EDTA 2 mM. Datos reportados en mU/mL para el medio condicionado. Los datos fueron el resultado de tres experimentos independientes. Las barras representan la media \pm el error estándar. La significancia estadística se obtuvo por medio del análisis ANOVA de una vía mediante la prueba de Dunnett (**P <0.001, *P <0.05).

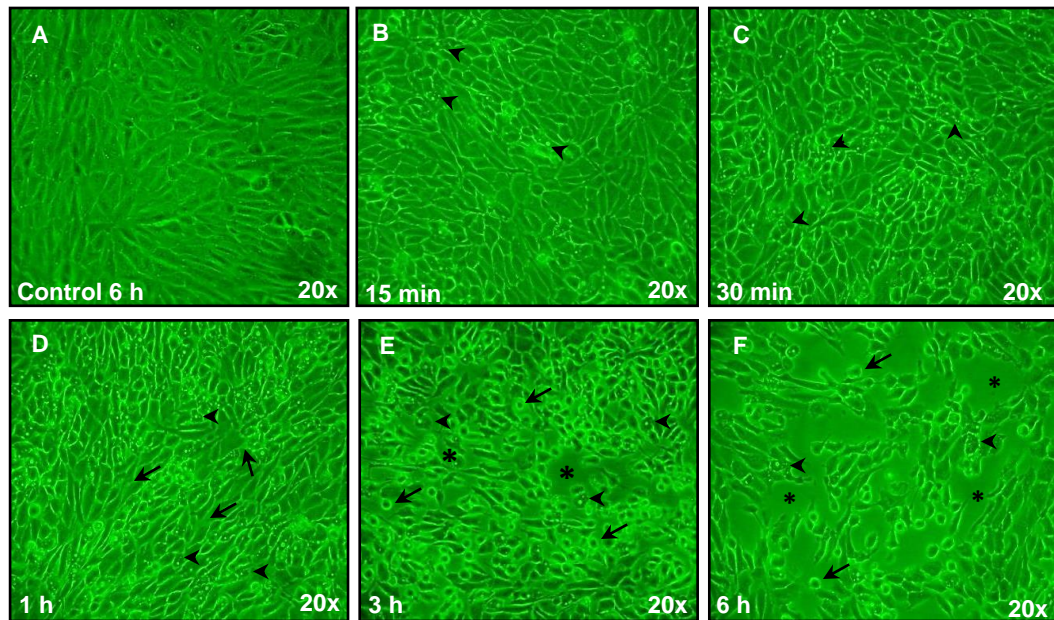


Figura 21. Efecto citopático sobre células MDCK en interacción con trofozoítos de *A. mauritaniensis* en relación 1:2 durante 15, 30 min, 1, 3 y 6 h. A) Control sin amibas, 6 h. B) Interacción 15 min. Se observan trofozoítos adheridos (cabezas de flecha). C) Interacción 30 min. Las amibas se observan entre las uniones (cabezas de flecha). D) Interacción 1 h. Comienza a observarse la separación entre las células (flechas), amibas (cabezas de flecha). E) Interacción 3 h. Se observan zonas líticas (asteriscos), así como la pérdida de la morfología celular (flechas), amibas (cabezas de flecha). F) Interacción 6 h. Se observan grandes zonas de lisis celular (asteriscos), células redondeadas (flechas), amibas (cabezas de flecha).

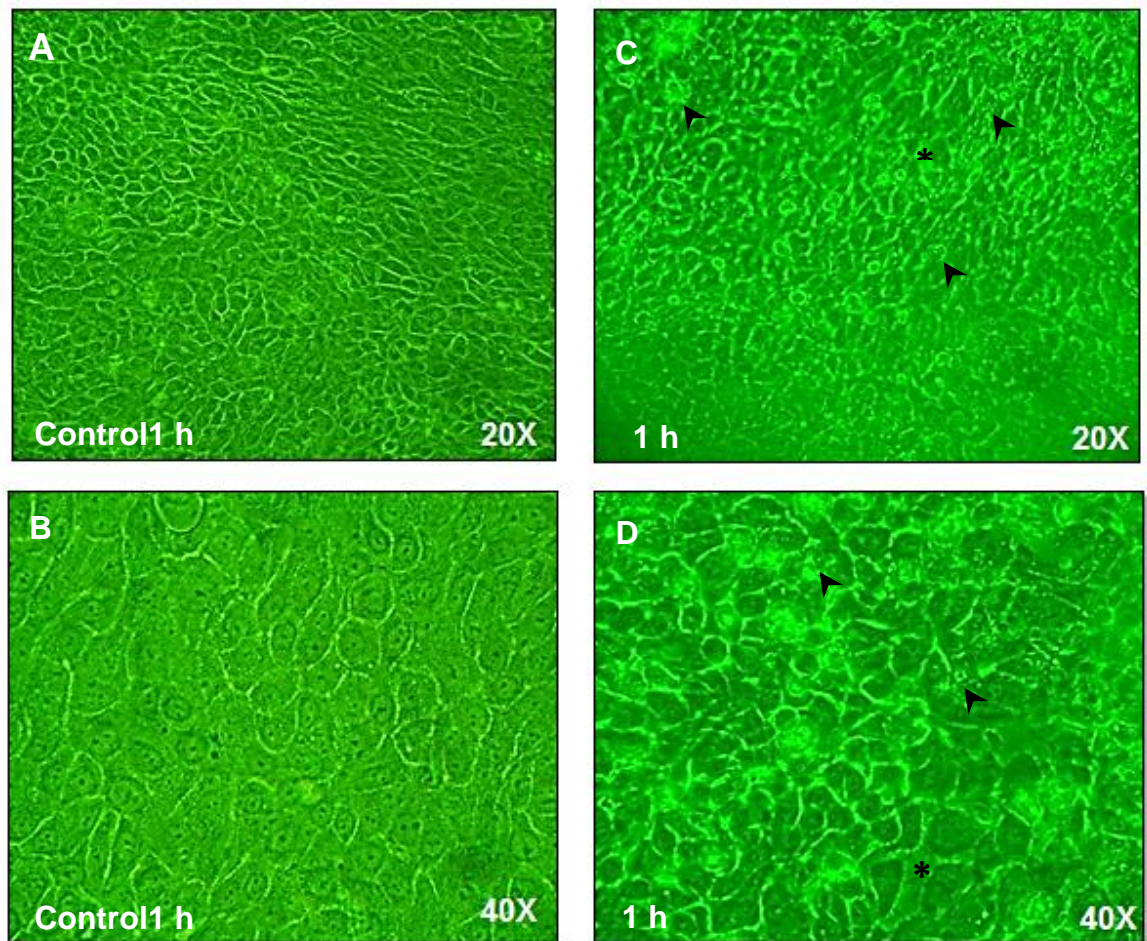


Figura 22. Efecto citopático sobre células RCE1 en interacción con trofozoítos de *A. mauritaniensis* en relación 1:1 durante 1 h. A) Control 1 h, aumento 20x. B) Control 1 hora aumento 40x. C) Interacción 1 hora aumento 20x. D) Interacción 1 hora 40x. Cabezas de flecha: amibas. Asteriscos: zona de daño celular.

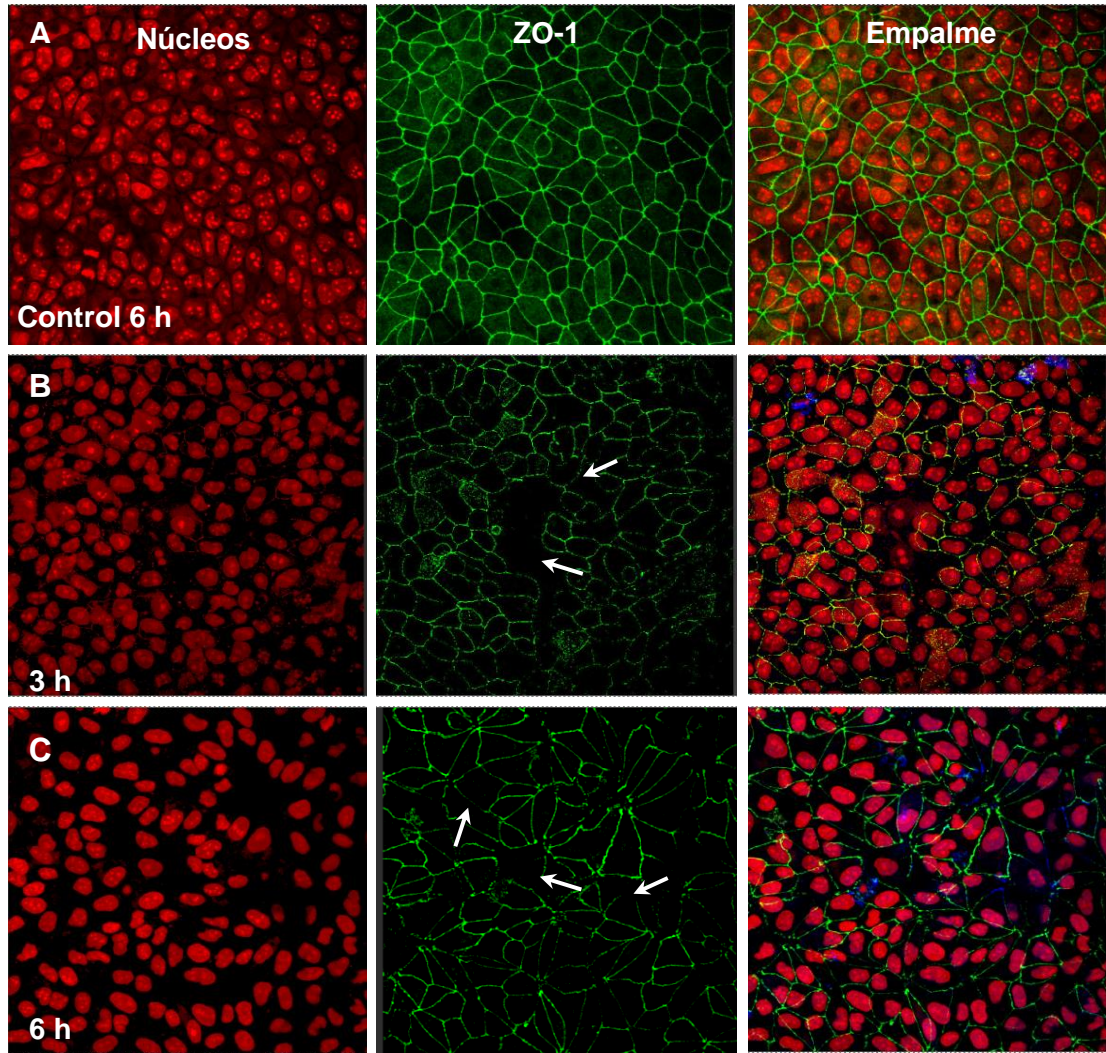


Figura 23. Análisis de la localización de la proteína de unión estrecha ZO-1 en células MDCK interaccionadas con trofozoítos de *A. mauritaniensis*, en relación 1:1 durante 3 y 6 h. A) Control sin amibas, 6 h. B) Interacción 3 h. C) Interacción 6 h. Núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo). Proteína ZO-1 marcada con FITC (verde). Amibas marcadas con CY5 (azul). Flechas: ausencia de marca. Aumento de 63x.

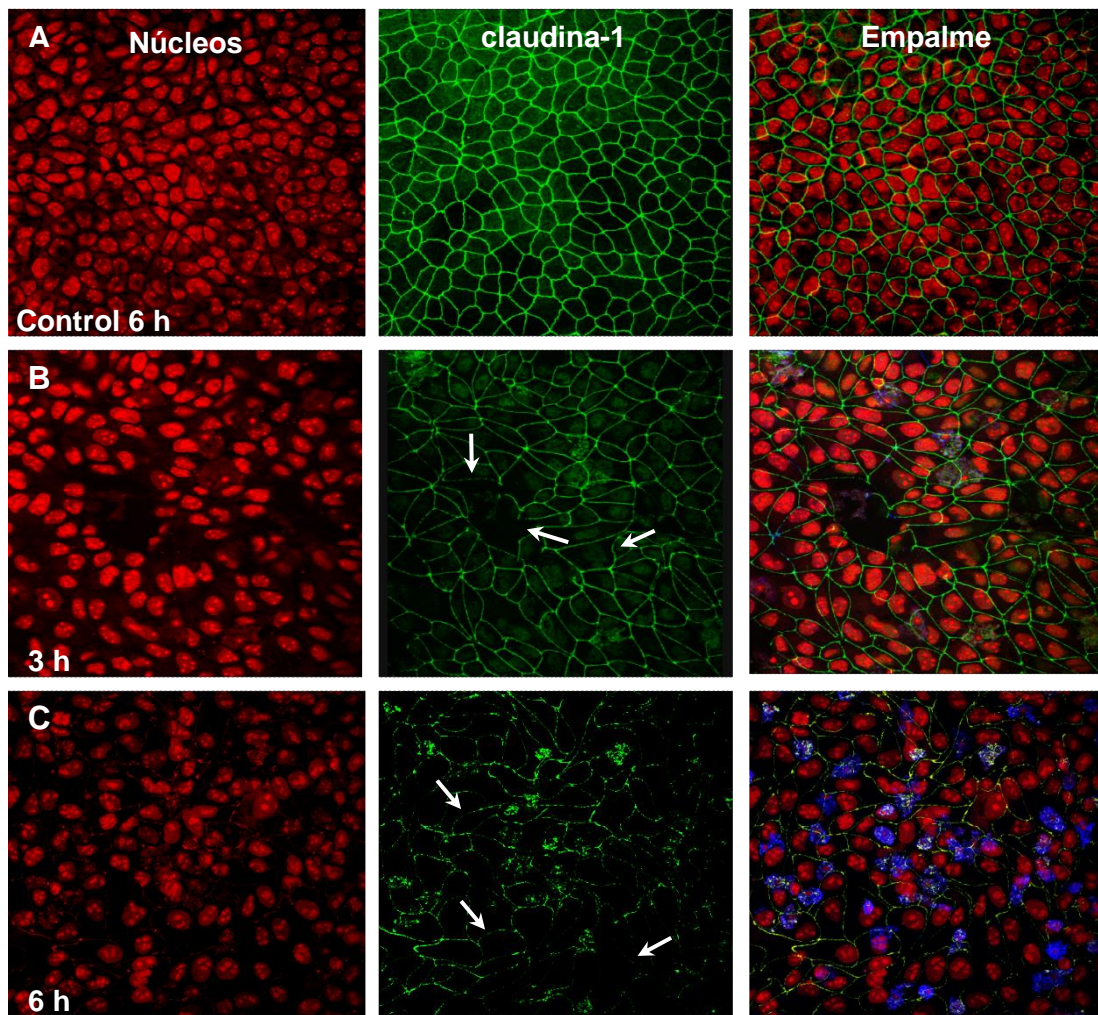


Figura 24. Análisis de la localización de la proteína claudina-1 (cldn-1) en células MDCK interaccionadas con trofozoítos de *A. mauritaniensis* en relación 1:1 durante 3 y 6 h. A) Control sin amibas, 6 h. B) Interacción 3 h. C) Interacción 6 h. Núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo). Proteína claudina-1 marcada con FITC (verde). Amibas marcadas con CY5 (azul). Flechas: ausencia de marca. Aumento de 63x.

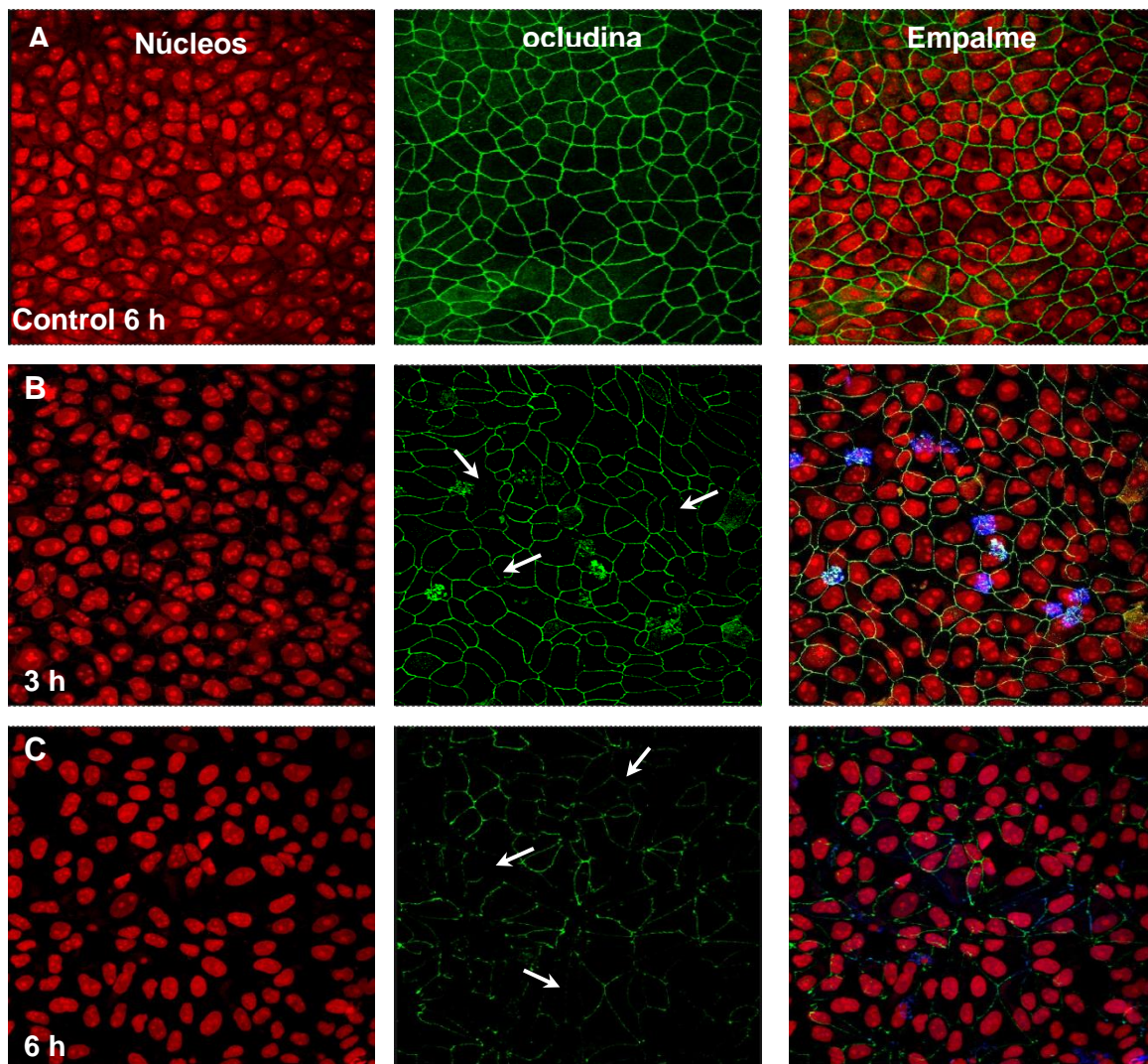


Figura 25. Análisis de la localización de la proteína ocludina (ocldn) en células MDCK interaccionadas con trofozoítos de *A. mauritaniensis* en relación 1:1 durante 3 y 6 h. A) Control sin amibas, 6 h. B) Interacción 3 h. C) Interacción 6 h. Núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo). Proteína ocludina marcada con FITC (verde). Amibas marcadas con CY5 (azul). Flechas: ausencia de marca. Aumento de 63x.

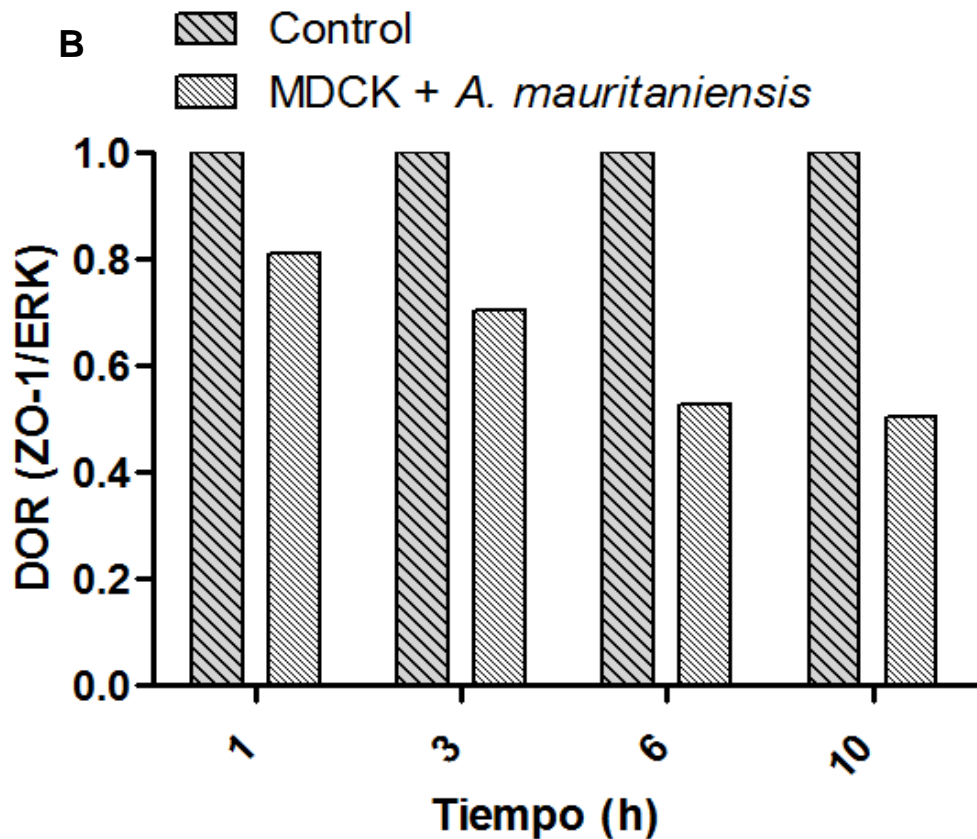
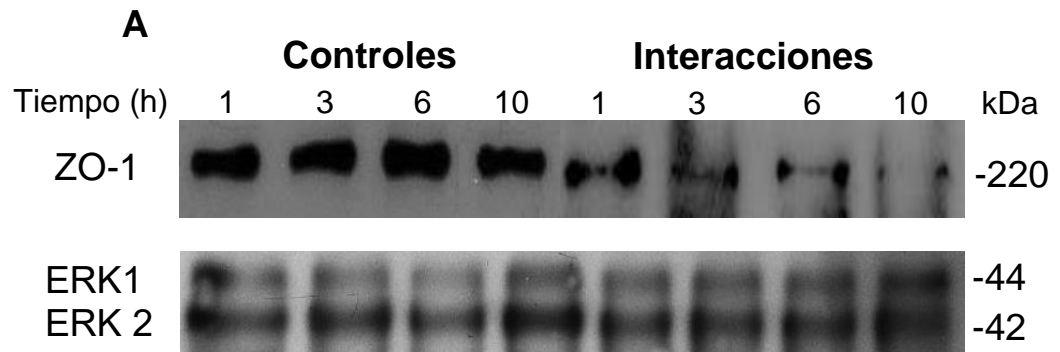


Figura 26. Degradación de la proteína ZO-1. A) Inmunodetección de las proteínas ZO-1 y ERK en células MDCK a diferentes tiempos de interacción con *A. mauritaniensis* mediante western blot. B) Análisis densitométrico de ZO-1 y ERK mostrado como densidad óptica relativa (DOR), contra el tiempo de interacción.

10. DISCUSIÓN

Las infecciones por parásitos protozoarios son un problema de salud en el humano ya que provocan altas tasas de morbilidad y mortalidad principalmente en países subdesarrollados, contribuyendo a la inestabilidad económica y social. Las amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba* son microorganismos anfitrónicos capaces de completar su ciclo de vida sin la necesidad de invadir a un hospedero lo que les confiere la capacidad de habitar ampliamente en la naturaleza (Serrano-Luna et al., 2006). Cuando estas amibas infectan a un hospedero producen la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) en individuos con algún compromiso inmunológico como es el caso del VIH o bajo tratamientos inmunosupresores (Marciano-Cabral et al., 2009). Este tipo de encefalitis se caracteriza por ser de tipo crónica, caracterizada por la formación de granulomas así como la presencia de hemorragia severa y necrosis del tejido cerebral (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). En estudios realizados por Khan y colaboradores (2009) demostraron que *A. castellanii* tiene la capacidad de penetrar por las uniones intercelulares de cultivos celulares de la microvasculatura cerebral humana, mediante la degradación de la proteína de unión estrecha ZO-1, provocando así el rearrreglo del citoesqueleto de actina. Los autores sugieren que estas amibas podrían invadir de forma directa al SNC a través de las UE del endotelio microvascular, que conforma a la barrera hematoencefálica.

Este protozoo también es capaz de causar una infección ocular en individuos completamente sanos llamada queratitis amibiana (QA), la cual está relacionada con los malos hábitos de higiene en el cuidado de los lentes de contacto (Siddiqui y Khan, 2012). La QA se caracteriza en las etapas tempranas por la aparición de lesiones corneales y cuando la infección alcanza el estroma corneal (constituido principalmente por colágena tipo I) se forma un absceso en forma de anillo (Lorenzo-Morales et al., 2013). En estas dos patologías provocadas por amibas del género *Acanthamoeba* se ha determinado la participación importante de proteasas y que pueden propiciar

la invasión al hospedero (Ferrante y Bates, 1988; He et al., 1990; Hadaz y Mazur, 1993; Mitro et al., 1994; Cao et al., 1998; Serrano-Luna et al., 2006).

En el presente trabajo se caracterizó la actividad proteolítica de la especie *Acanthamoeba mauritaniensis* la cual está reportada como un aislado “no patógeno” proveniente del ambiente (suelo) (De Jonckheere, 1980), así como el daño que pueda causar a las proteínas de unión estrecha en la línea celular MDCK, así también como en células RCE1 derivadas de queratinocitos de conejo (Castro-MuñozLedo, 1994).

Como no se cuentan con modelos animales para la determinación de la capacidad de daño producido por *Acanthamoeba*, procedimos a realizar interacciones con la línea celular MDCK y comparamos con la especie *Acanthamoeba castellanii* la cual fue aislada de un caso de queratitis amibiana. Se observó que el aislado ambiental “no patógeno” *A. mauritaniensis* provocó un daño citolítico importante a la monocapa de células MDCK de manera similar a lo que se ha reportado para *A. castellanii*. Estos resultados nos indicaron que la especie *A. mauritaniensis* pudiera estar implicada en las infecciones en humanos. En el análisis ultraestructural que se realizó a los trofozoítos de *A. mauritaniensis*, reveló una morfología muy interesante, ya que posee una gran cantidad de acantópodos anchos y largos, lo que probablemente pueda explicar el tiempo que se tarda para despegar a las amibas de las cajas de cultivo en baño de hielo (1 h). La capacidad de adhesión en estas amibas se ha relacionado con la cantidad de proteínas de unión a manosa (MBP) con la superficie de contacto de los trofozoítos. La cantidad de MBP también se ha relacionado a la patogenicidad de *Acanthamoeba*, lo que también podría explicar el por qué esta amiba es capaz de producir un fuerte daño citopático a los cultivos celulares (Garate et al., 2006).

En el presente estudio determinamos por medio de zimogramas que *A. mauritaniensis* tiene elevada actividad proteolítica, además de presentar actividades de proteasas diferentes a lo reportado en el aislado clínico de

queratitis amibiana producida por *A. castellanii*, ya que se observó que cuando los extractos totales fueron incubados a 37°C presentó una fuerte actividad proteolítica en los pesos moleculares de 146, 119, 64.2, 42 y 32 kDa, a diferencia de *A. castellanii*, que presenta actividad proteolítica en los pesos de 38.7, 31.6, 25 y 20 kDa a 37°C y a pH de 7.0. Estos resultados nos demuestran que *A. mauritaniensis* es capaz de activar enzimas proteolíticas que puedan participar de manera importante en su potencial patogénico como lo reportado en los aislados provenientes de casos clínicos de QA. Posteriormente, se determinó el patrón proteolítico de los extractos totales y del medio condicionado (productos de secreción) de la especie *A. mauritaniensis* a temperatura ambiente (25°C) y a temperatura fisiológica de 37°C. Encontramos que esta amiba presentó una actividad diferencial de proteasas en ambas temperaturas en los extractos totales, el patrón proteolítico a 25°C puede relacionarse con las proteasas que puede expresar en la vida libre y que pueden ser utilizadas en la degradación de materia orgánica o bien cuando se alimentan con microorganismos. De manera interesante observamos que a 37°C y a un pH de 7.0, que son las condiciones fisiológicas del cuerpo humano, la actividad proteolítica es muy fuerte. Esta actividad óptima de proteasas a 37°C y a pH de 7.0 ya había sido reportada previamente por Serrano-Luna y colaboradores (2006), en extractos totales de la especie patógena *A. castellanii* el cual proviene de un aislado de queratitis amibiana.

Al igual que en los extractos totales, el medio condicionado presentó actividad proteolítica a diferentes pH's (3.0, 5.0, 7.0 y 9.0) y a 37°C. De manera interesante los pH's óptimos fueron el de 5.0 y 7.0, presentándose bandas de 141, 100.6, 70.5, 56.4, 43.2 y 29 kDa. Con estos resultados podemos concluir que esta amiba tiene la capacidad de secretar enzimas proteolíticas que pueden estar participando en el daño celular en la monocapa de células MDCK.

Encontramos que las proteasas de extractos totales de los pesos de 141, 100, 69, 40 y 29 son similares a las proteasas que se presentaron en el medio condicionado. Esta secreción de proteasas ya había sido previamente reportada por el grupo de Alfieri (2000), Cho (2000), Khan (2000) y Serrano-Luna (2006), en donde caracterizaron los productos de secreción de *A. healyi*, *A. castellanii* y *A. polyphaga* (aislados de queratitis amibiana).

Por otra parte, encontramos que el patrón proteolítico de esta especie, es en parte diferente a los pesos moleculares previamente reportados como la proteasa de 30 kDa que reportaron Kong y colaboradores en *A. castellanii* que corresponde con la de 32.4 kDa. Mientras que las de 40 kDa en *A. healyi* (Cho y colaboradores, 2000) y la de 43 kDa reportada en *A. polyphaga* (Alfieri y colaboradores, 2000) corresponden a las de 40 y 42.3 que encontramos en los extractos totales de *A. mauritaniensis*. Por otro lado, las proteasas de 119, 105 y 53 kDa podrían corresponder a las colagenasas de 114, 95 y 50 kDa de casos de queratitis reportadas por Souza-Carvalho y colaboradores en el año 2010. Dentro de los pesos moleculares que no corresponden a los ya reportados en *A. castellanii* y *A. polyphaga* (Serrano-Luna et al., 2006; Souza-Carvalho et al., 2010; Alfieri et al., 2000; Cho et al., 2000), corresponden a los pesos de 162, 146, 71 y 18 kDa que son proteasas del tipo serina y en los pesos de 69 y 29 kDa podrían tratarse de proteasas del tipo cisteína.

Diferentes autores han reportado al menos 5 tipos de proteasas en las especies *A. healyi*, *A. polyphaga* y *A. castellanii*, encontrándose del tipo serina (Mitro et al., 1994; Cho et al., 2000; Kong et al., 2000; Khan et al., 2000; Serrano-Luna et al., 2006), tipo cisteína (Hadaz and Mazur, 1993; Serrano-Luna et al., 2006) y del tipo metalo (Cao et al., 1998; Serrano-Luna et al., 2006) así como colagenasas (He et al., 1990) y elastasas (Ferrante and Bates, 1988). Encontrándose en mayor cantidad las del tipo serina y en menor cantidad del tipo cisteína y metalo proteasas (Serrano-Luna et al., 2006). En este estudio también se determinó el tipo de proteasas presentes

en el aislado ambiental *A. mauritaniensis* mediante el uso de los inhibidores específicos para proteasas del tipo serina (aprotinina y PMSF); con estos inhibidores se observó la inhibición completa de la actividad proteolítica tanto en los extractos totales como en el medio condicionado. Cuando se incubaron con los inhibidores para proteasas del tipo cisteína (E-64, NEM Y PHMB) se observó una inhibición parcial de la actividad proteolítica, fenómeno que se repitió cuando se utilizó al inhibidor de metalo-proteasas, EDTA. Con todos estos datos podemos concluir que *A. mauritaniensis* presenta principalmente proteasas del tipo serina, y en menor cantidad proteasas del tipo cisteína y metalo lo cual se corroboró utilizando azocoll como sustrato y los mismos inhibidores, al igual que lo reportado por Serrano-Luna y colaboradores en el año 2006 en las especies de *A. castellanii* y *A. polyphaga*.

Cuando se determinó la capacidad de daño de *A. mauritaniensis* sobre células MDCK a una relación 1:1 se observó que el efecto citopático provocado por esta amiba fue muy fuerte a los tiempos de 3, 6 y 10 h, por lo que se trabajó con una relación 1:2 y a tiempos más cortos de 15 y 30 min, 1, 3 y 6 h. Los resultados que se obtuvieron fue que desde los 15 min de interacción las amibas comenzaron a adherirse al cultivo, principalmente en las uniones intercelulares, evolucionando a la separación y a lisis de las células MDCK. Estos resultados sugieren fuertemente que este aislado puede ser capaz de invadir tejidos del huésped al igual que *A. castellanii* y *A. polyphaga* (Omaña-Molina et al., 2004). Para poder ser más contundentes en estos resultados se procedió a realizar co-interacciones con células provenientes del epitelio corneal de conejo y así poder tener una línea más específica del posible daño en la QA. Los resultados mostraron que *A. mauritaniensis* es capaz de producir daño en las uniones intercelulares del cultivo de células corneales provocando su separación y lisis más temprana que cuando fueron co-incubadas con células MDCK.

LA interacción de esta amiba con las células epiteliales afecta a la UE, como fue evidenciado en la alteración de la localización de las proteínas ZO-1, claudina-1 y ocludina; observándose patrones discontinuos e incluso la pérdida completa de la marca en la monocapa de células MDCK desde las 3 h de interacción con los trofozoítos de *A. mauritaniensis*. Para tratar de probar que esta amiba es capaz de degradar a las proteínas de las uniones estrechas, realizamos western-blot para observar el comportamiento de la proteína ZO-1 en interacciones con células MDCK, y observamos que desde la hora ocurre la degradación de ZO-1 se está presentando, y de igual manera a las 3, 6 y 10 h siendo a este último tiempo donde ocurrió la mayor degradación. Estos resultados sugieren que las proteínas podrían estar siendo alteradas e incluso degradadas por el producto de los trofozoítos de *A. mauritaniensis* (Khan et al., 2009; Shibayama et al., 2013). Estos datos sugieren fuertemente que el daño que se observa en los cultivos celulares, se debe principalmente a la actividad de las proteasas, aunque no puede descartarse la actividad de otras enzimas que estén produciendo la lisis celular.

Omaña-Molina y colaboradores (2004) mostraron que el daño por parte de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a la córnea de hámster puede también presentarse sin necesidad de contacto, es decir a distancia. En trabajos de Souza-Carvalho y colaboradores (2010), se encontró una fuerte actividad colagenolítica en extractos de *Acanthamoeba* de diferentes aislados de queratitis. Nuestros resultados apoyan estos antecedentes, ya que los productos secretados también poseen actividad proteolítica.

En conclusión nuestros hallazgos sugieren que las proteasas de esta amiba podrían participar en la invasión al organismo hospedero, mediante la degradación de la colágena de la córnea y, la separación de las células que funcionan como barreras en los tejidos que conforman al organismo, por la alteración de las proteínas que las mantienen unidas. Con esto también podemos romper con la idea que reportó Khan y colaboradores en el año

2000, que afirmaba que solo las especies patógenas de *Acanthamoeba* tienen la capacidad de producir proteasas. Nosotros encontramos que esto no es estrictamente cierto ya que el aislado ambiental “no patógeno” estudiado previamente tiene la capacidad de producir proteasas que además están participando en la producción de daño a las células MDCK y a las células del epitelio corneal de conejo. Aún queda mucho por estudiar sobre *Acanthamoeba mauritaniensis*, como la purificación de proteasas que tengan actividad colagenolítica y además, probar su efecto sobre el modelo de córnea de hámster. También se pueden producir anticuerpos contra la proteasa purificada y determinar su localización en las interacciones celulares como son las uniones estrechas y que puedan promover su alteración o degradación.

11. CONCLUSIONES

1. La especie no patógena *A. mauritaniensis* causa un importante efecto citopático sobre células epiteliales (MDCK) al igual que *A. castellanii*.
2. *A. mauritaniensis* tiene actividad proteolítica diferencial de proteasas a diferentes pH's y temperaturas.
3. *A. mauritaniensis* mostró alta actividad de proteasas en pH's de 5.0 a 9.0 en los extractos totales y el medio condicionado en los ensayos de zimogramas y azocoll.
4. La especie *A. mauritaniensis* causó daño importante en los cultivos de células de epitelio corneal de conejo (RCE1).
5. *A. mauritaniensis* provoca la pérdida del patrón membranal de las proteínas ZO-1, claudina-1 y ocludina de las células MDCK de manera tiempo dependiente.
6. La especie *A. mauritaniensis* es capaz de degradar a la proteína ZO-1.

12. PERSPECTIVAS

1. Analizar la integridad de las proteínas claudina-1 y ocludina mediante ensayos de western-blot, en interacciones de MDCK y *A. mauritaniensis* durante 1, 3, 6 y 10 h.
2. Pre-incubar a los trofozoítos con inhibidores de proteasas de tipo serina, cisteína y metalo e interaccionarlos con el cultivo de células MDCK para determinar si el daño citopático es bloqueado.
3. Analizar el estado funcional de la UE durante interacciones de MDCK o RCE1 y *A. mauritaniensis* durante 15 y 30 min, 1, 3 y 6 h, mediante ensayos de RET.
4. Realizar interacciones de células RCE1 y trofozoítos de *A. mauritaniensis* en una relación más baja hasta las 3 h.
5. Analizar la localización y la integridad de las proteínas de UE en los cultivos de células RCE1 mediante inmunomarcaje y western blot.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H. (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. *J of Parasitol.* 88: 621-623.
- Alfieri, S.C., Correia, C., Motegi, S., Prel, E. (2000). Proteinase activities in total extracts and in conditioned medium by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *J of Parasitol.* 87: 220-227.
- Badenoch, P.R., Johnson, A.M., Christy, P.E., Coster, D.J. (1990). Pathogenicity of *Acanthamoeba* and *Corynebacterium* in the cornea. *International J of Parasitol.* 25: 535-539.
- Balda, M.S., Matter, K. (2000). Stress and Rho-activated ZO-1 associated nucleic acid binding protein binding to p21 mRNA mediates stabilization, translation, and cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 50: 1123-1229.
- Barete, S., Combes, A., De Jonckheere, J.F., Datry, A., Varnous, S., Martinez, V., García-Ptacek, S., Caumes, E., Capron, F., Francés, C., Gibert, C., Chosidow, O. (2007). Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. *Emerg Infect Dis.* 13: 736-738.
- Bontempi, E.B.M., Franke de Cazzulo, A.M., Ruiz, J.J. (1984). Purification and some properties of an acidic protease from epimastigote of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 77: 599-604.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Cao, Z., Jefferson, D.M., Panjwani, N. (1998). Role of carbohydrate-mediated in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *The J of Biolo Chem.* 273: 15838-15845.

- Castro-Muñozledo, F. (1994). Development of a spontaneous permanent cell line of rabbit corneal epithelial cells that undergoes sequential of differentiation in cell culture. *J of Cell Sc.* 107: 2343-2351.
- Cereijido, M. (1992). Tight Junctions. *CRC Press.* 78-79.
- Cereijido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L. (2004). Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev.* 84: 1229-1262.
- Cereijido, M., Shoshani, L., Contreras, G. (2000). Molecular physiology of tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279: 477-482.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., González-Robles, A., Bonilla, P., Martínez-Palomo, A. (2005). Ultrastructural study of encystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52(2): 153-158.
- Chimelli, L. (2011). A morphological approach to the diagnosis of protozoan infections of the central nervous system. *Pathol Res International.* 10: 1-15.
- Cho, J.H., Na, B.K., Kim, T.S., Song, C.Y. (2000). Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *IUBMB Life.* 50: 209-214.
- Clarke, D.W., Niederkorn, J.Y. (2006). The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *TRENDS in Parasitol.* 22(4): 175-180.
- Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V. (2010). Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J of Clin Microbiol.* 48: 2689-2697.
- Cursons, R.T., Brown, J., Keys, E. (1978). Virulence of pathogenic free-living amebae. *J. Clin. Pathol.* 29: 1-11.

- De Jonckheere, Johan, F. (1980). Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *App and Environ Microbiol.* 39: 681-685.
- Dudley, R., Alsam, S., Khan, N.A. (2008). The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 286: 9-15.
- Ferrante, A., Bates, E.J. (1988). Elastase in the pathogenic free-Living amoeba *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infec and Immunol.* 56: 3320-3321.
- Ferreira, G.A., Magliano, A.C., M., Pral, E.M., Alfieri, S.C. (2009). Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. *Acta Tropica.* 112(2): 156-163.
- Fouque, E., Trouilhé, M.C., Thomas, V., Hartermann, P., Rodier, M.H., Héchard, Y. (2012). Cellular biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Euk Cell.* 11: 382-387.
- Galarza, C., Ramos, W., Gutierrez, E., Ronceros, G., Teran, M., Uribe, M., Navincopa, M., Ortega-Loayza, A. (2009). Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *Trop med rounds.* 48: 1324.1329.
- Garate, M., Marchant, J., Cubillos, I., Cao, Z., Khan, N.A., Panjwani N. (2006). *In vitro* pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose binding protein. *Invest Ophtha & Vis Sc.* 47: 1056-1062.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Progress in bioph & molecular biol.* 81: 1-44.
- Gunzel, D. and Yu, A.S. (2009). Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle. *Pflugger Arch.* 458: 77-88.

- Hadas, E., Mazur, T. (1993). Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Trop Med Parasitol.* 44: 197-200.
- He, Y., Niederkorn, J.Y., McCulley, J.P., Stewart, G.L., Meyer, D.R., Silvany, R, Dougherty, J. (1990). *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest Ophthal & Vis Sci.* 31: 2235-2240.
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L., Gonzáles-Mariscal, L. (2002). Nuclear localization of the Tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res.* 10: 138-148.
- Khan, N.A & Siddiqui, R. (2009). *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *International J of parasitol.* 39: 1611-1616.
- Khan, N.A. (2003). Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis.* 34: 277-285.
- Khan, N.A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. 30: *FEMS Immunol Med Microbiol.* 564-595.
- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Panjwani, N., Cao, Z., Paget, T. (2000). Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J of Clin Microbiol.* 38: 2858-2861.
- Kim, H.Y., Ha, Y.R., Yu, H.S., Kong, H.H., Chung, D.I. (2003). Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a korean keratitis patient. *Korean J of Parasitol.* 40: 189-196.
- Kim, W.T., Kong, H.H., Ha, Y.R., Hong, Y.C., Jeong, H.J., Yu H.S., Chung, D.I. (2006). Comparisson of specific activity and citophatic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. *Korean J of Parasitol.* 45: 321-330.

- Kong, H.H, Kim, T.H, Chung, D.I. (2000). Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. *J of Parasitol.* 86: 12-17.
- Krauze, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., Blasing, I.E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 56: 631-645.
- Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Piñero, J.E. and Valladares, B. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?. *Trends in Parasitol.* 29: 181-187.
- Lu, S., Gough, A.W., Bobrowski, W.F., Stewart, B.H. (1996). Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of Pharmaceutical Sc.* 21: 270-273.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. Agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews.* 16: 273-307.
- Marciano-Cabral, F. (2009). Free-living amoeba as agents of human infection. *The J of Infec Dis.* 20: 1104-1106.
- McKerrow, J. (1991). New insights into the structure of a *Trypanosoma cruzi* protease. *Parasitol Today.* 35: 132-133.
- McKerrow, J., Sun, E., Rosenthal, P., Bouvier, J., (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Reviews of Microbiology.* 47: 821-853.
- Mitro, K., Bhagavathiammai, A., Zhou, O.M., Bobbet, G., McKerrow, J.H., Chokshi, R., Chokshi, B., James, E.R. (1994). Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Exp Parasitol.* 78: 377-385.

- Nieder Korn, J.Y., Alizadeh, H., Leher, H., McCulley, J.P. (1999). The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infec.* 34: 437-443.
- Niessen, C.M.(2007). Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *J of Invest Dermatol.* 127: 2525-2532.
- Omaña-Molina, M., Navarro-García, F., Gonzales-Robles, A., Serrano-Luna, J de J., Campos-Rodríguez, R., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2004). Induction of morphological and electrophysiological changes hamster cornea after *In vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect and Immu.* 72: 3245-3251.
- Overgaard, C.E., Daugherty, L.B., Mitchell, L.A., Koval, M. (2011). Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxidant and Redox Sign.* 15: 1179-1193.
- Pettit, D.A., Williamson, J., Cabral, G.A., Marciano-Cabral, F. (1996). *In vitro* destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. *J of Parasitol* 52: 769-777.
- Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., de la Garza, M., Serrano-Luna, J. (2012). Host-parasite interaction: parasite-derived and induced proteases that degrade human extracellular matrix. *Journal of Parasitol Res.* 2012: 1-24.
- Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S.M., Oelrich, B., Sculzke, J.D., Amasheh, S., Gunzel, D., Fromm, M. (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J cell Sci.* 166: 1913-1921.
- Schuster, F., L. (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebas. *Clin Microbiol Rev.* 15: 342-354.

- Serrano-Luna, J de J., Cervantes-Sandoval, I., Calderón, J., Navarro-García, F., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Can J of Microbiol.* 52: 16-23.
- Shen, L., Weber, C.R., Raleigh, D.R., Yu, D., Turner, J.R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu. Rev. Physiol.* 73: 283-309.
- Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Navarro-García, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi, V., Serrano-Luna, J. (2013). Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology.* 159: 392-401.
- Siddiqui, R., Khan, N.A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors.* 130: 1-13.
- Sissons, J., Alsam, S., Goldsworthy, G., Lightfoot, M., Jarroll, E.L., Khan, N.A. (2006). Identification and properties of protease from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous amebic encephalitis. *BMC Microbiol.* 42: 1-8.
- Souza-Carvalho. F.R., Carrijo-Carvalho, L.C., Chudzinki-Tavassi, A.M., Foronda, A.S., and De Freitas, D. (2010). Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. *Journ of Clin Microbiol and Infect.* 17: 603-609.
- Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., Visvesvara, G., S. (2008). Survival of *Acanthamoeba* cyst after desiccation for more than 20 years. *Jour of Clin Microbiology.* 60: 4045-4048.
- Torno, M., Babapour, R., Dickinson, G., Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., Cleary, T.J. (2000). Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J Am Acad Dermatol.* 42: 351-354.

- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A. (2012). Pathogenic free-living amoeba: epidemiology and clinical review. *Patho Biol.* 60: 399-405.
- Ueno, M. (2009). Mechanisms of the penetration of blood-borne substances into the brain. *Curr Neuropharmacol.* 40: 142-149.
- Vam Itallie, C.M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L.S., Holmes, J., Anderson, J.M. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol.* 60: 1288-1299.
- Van Klink, F., Alizadeh, H., He, Y., Mellon, J. A., Silvany, R.R., McKulley, J.P., Niederkorn, J.Y. (1993). The role of contact lenses trauma and Langerhans cells in a chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 1937-1944.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50: 1-26.
- Yu, D., Turner, J.R. (2008). Stimulus-induced reorganization of tight junctions structure: the role of membrane traffic. *Biochim Biophys Acta.* 54: 709-716.

14. APÉNDICE

Amortiguador de corrida 1X

| | |
|------------------------------|---------|
| Trizma base | 3.03 g |
| Glicina | 14.4 g |
| SDS | 1 g |
| H ₂ O desionizada | 1 Litro |

Amortiguador de Lamelli 2X

| | |
|------------------------------|---------------|
| Trizma base | 1.51 g |
| SDS | 4 g |
| Glicerol (100%) | 4.5 mL |
| Azul de bromofenol | 0.002 g |
| H ₂ O desionizada | c.b.p. 100 mL |

Amortiguador de transferencia 1X

| | |
|------------------------------|----------------|
| Trizma base | 6.06 mL |
| Glicina | 28.8 g |
| Metanol | 400 mL |
| H ₂ O desionizada | c.b.p. 2000 mL |

Solución desteñidora

| | |
|------------------------------|--------|
| Metanol | 250 mL |
| Ac. Acético | 50 mL |
| H ₂ O desionizada | 200 mL |

Amortiguadores de activación

Para pH 3.0

| | |
|----------------------------|---------------|
| Ac. Acético | 5 mL |
| CaCl ₂ | 0.1109 g |
| H ₂ O destilada | c.b.p. 500 mL |

Para pH 5.0

| | |
|----------------------------|---------------|
| Acetato de sodio | 4.102 g |
| CaCl ₂ | 0.1109 g |
| H ₂ O destilada | c.b.p. 500 mL |

Para pH 7.0

| | |
|----------------------------|---------------|
| Trizma base | 6.05 g |
| CaCl ₂ | 0.1109 g |
| H ₂ O destilada | c.b.p. 500 mL |

Para pH 9.0

| | |
|----------------------------|---------------|
| Glicina | 3.7535 g |
| CaCl ₂ | 0.1109 g |
| H ₂ O destilada | c.b.p. 500 mL |