



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

TESIS DE MAESTRÍA

**Identificación de una probable adhesina de
*Naegleria fowleri***

TESIS QUE PRESENTA:

Q.B.P. Nadia Guadalupe Flores Huerta

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

DIRECTORES DE LA TESIS:

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

Dr. José de Jesús Serrano Luna

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas y del Dr. José de Jesús Serrano Luna. Así mismo, bajo la asesoría de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui y del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez del mismo departamento.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 560536, y con el apoyo del fondo SEP-CONACYT 237523.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis mentores, Dra. Mineko Shibayama y Dr. Jesús Serrano Luna por la confianza brindada en mi persona y trabajo. Por el enorme apoyo, paciencia, por las brillantes aportaciones y ayuda en la elaboración y corrección de este proyecto. Su constante dedicación a lo que hacen forma parte de las valiosas enseñanzas que tomo de ustedes.

Gracias a los investigadores, Dra. Rossana Arroyo Verástegui y el Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez por el apoyo, las críticas, comentarios, el tiempo brindado y las valiosas aportaciones para la elaboración de este proyecto.

Gracias a todo el equipo de trabajo del laboratorio 4 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV por aceptarme en su grupo de trabajo, de manera particular a las auxiliares de investigación M. en C. Dora Angélica Silva Olivares y la Q.F.B. Silvia Galindo Gómez por el apoyo brindado en el manejo de los cultivos celulares y amebianos. Así mismo, agradezco a los técnicos los señores Víctor y Dagoberto por su colaboración por su apoyo técnico, así mismo, a las asistentes secretariales Irma Miranda, Martha Dueñas y Martha Aguilar por el apoyo en los aspectos administrativos y secretariales. Al M. en C. Jaime Escobar Herrera por el apoyo técnico en la microscopia confocal. A mis compañeros de laboratorio Daniel coronado, Roberto Cárdenas, Moisés Castillo por su apoyo y estímulo, enseñanzas y a mis queridos amigos Paula Guzmán, Verónica Aranda y Manuel Reyes por su gran apoyo, estímulo, pero sobre todo por su amistad y por soportarme.

Gracias al hombre que amo Heber Jevit Gómez Oliva por tu apoyo, estímulo, paciencia y amor. Te amaré por siempre amor.

Gracias madre por tu gran amor, porque como tu nadie. Eres el motor de mi vida y mi ejemplo a seguir por ser una guerrera, enseñarme a luchar y a ser mejor persona. A mi mamá Wina y a todo el clan Huerta-González por su amor y estímulo, los amo.

DEDICATORIAS

A mi familia, a mi pareja, a mis amigos y a mis mentores por su cariño, amor, apoyo constante, motivación y confianza. Porque sin ustedes estas palabras nunca se hubieran podido escribir. Por los momentos difíciles pero nunca imposibles, con amor, cariño, respeto y admiración.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	
ÍNDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I.1 Introducción.....	11
I.1.1 Antecedentes generales.....	11
I.1.2 Amibas de vida libre	12
I.1.2.1 <i>Naegleria fowleri</i>	13
I.1.2.2 Taxonomía	14
I.1.2.3 Morfología de <i>Naegleria fowleri</i>	14
I.1.3 Ciclo de vida.....	17
I.1.4 Ecología	18
I.1.5 Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) y su fisiopatología.....	19
I.1.6 Epidemiología de la MAP	20
I.1.6.1 Respuesta inmunológica en la MAP.....	20
I.1.6.2 Diagnóstico.....	22
I.1.6.3 Tratamiento	23
I.1.7 Patogenicidad y virulencia.....	23
I.1.8. Mecanismo de adherencia: adhesina-receptor.....	25
I.1.9 Antecedentes directos	29
II. Justificación.....	38
III. Hipótesis.....	39
IV. Objetivos	39
V. Estrategia experimental	40
VI. Materiales y métodos	42
VII. Resultados	48
VIII. Discusión	67
IX. Conclusiones	77
X. Perspectivas	78
XI. Referencias bibliográficas	79

ÍNDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS

		Página
Figura 1	Estadios de <i>Naegleria fowleri</i>	16
Figura 2	Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i>	17
Figura 3	Detección de proteínas de unión a laminina-1 de <i>Acanthamoeba astronyxis</i> y <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	31
Figura 4	<i>B. mandrillaris</i> expresa una proteína de unión a galactosa (GBP)	32
Figura 5	Extracción de las proteínas de membrana de <i>Naegleria fowleri</i> y <i>N. lovaniensis</i>	33
Figura 6	Identificación de dos proteínas similares a integrina en <i>N. fowleri</i>	34
Figura 7	Análisis de western blot de <i>N. fowleri</i> y <i>N. lovaniensis</i>	35
Figura 8	Detección de glicoconjugados de manosa y glucosa en trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	49
Figura 9	Detección de glicoconjugados de fucosa en trofozoítos en <i>N. fowleri</i>	50
Figura 10	Trofozoítos de <i>N. fowleri</i> marcados con biotina	52
Figura 11	Trofozoítos de las especies no patógenas de <i>Naegleria</i> marcados con biotina	54
Figura 12	Ensayos de viabilidad con azul tripano de los trofozoítos de <i>Naegleria</i>	55
Figura 13	Ensayos de microscopia de epifluorescencia y de microscopia confocal para la detección de la marca de biotina en células MDCK	57
Figura 14	SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie de las fracciones proteicas purificadas a partir de células MDCK	59
Figura 15	Análisis de western blot para actina y Claudina-1 de células MDCK	60
Figura 16	SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie de las fracciones proteicas purificadas a partir de trofozoítos de <i>N.fowleri</i>	61

Figura 17	Análisis de western blot para GAPDH de trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	61
Figura 18	SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie de las fracciones proteicas purificadas a partir de trofozoítos de las especies no patógenas de <i>Naegleria</i>	63
Figura 19	SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie de las fracciones proteicas de membrana purificadas a partir de trofozoítos de <i>Naegleria</i>	64
Figura 20	Blot de las proteínas de membrana biotiniladas de trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	65
Tabla 1	Comparación de las bandas proteicas presentes en la fracción de membrana entre los trofozoítos de <i>Naegleria</i>	62
Tabla 2	Proteínas de membrana identificadas en <i>N. fowleri</i>	66

RESUMEN

El género *Naegleria* comprende amibas de vida libre ampliamente distribuidas en la naturaleza, sólo *Naegleria fowleri* es capaz de producir meningoencefalitis amibana primaria (MAP). En las etapas iniciales de la infección se produce la secreción de moco que atrapa a los trofozoítos. Sin embargo, algunos trofozoítos son capaces de penetrar el neuroepitelio olfatorio y llegar al sistema nervioso central (SNC). Diversos factores de virulencia se han descrito en *N. fowleri*; sin embargo, poco se conoce de las moléculas involucradas en la adherencia de esta amiba. Se ha descrito la importancia de la membrana plasmática y el glicocalix en el proceso de reconocimiento y adhesión entre parásito-hospedero. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue purificar e identificar proteínas de membrana de *N. fowleri*; para ello se purificaron proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri*, así como de las especies no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*), con las proteínas obtenidas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE); al analizar los perfiles de proteínas de membrana entre las tres especies, se observó que las bandas de aproximadamente 23, 26, 49, 70, 100 y 250 kDa en *N. fowleri* son expresadas diferencialmente con respecto a las especies no patógenas. Por otro lado, se realizó el marcaje de la membrana de los trofozoítos de *N. fowleri* con biotina y lectinas específicas para los carbohidratos de manosa, glucosa y fucosa, se logró detectar por ensayos de citoquímica con peroxidasa y por microscopia de epifluorescencia y confocal la marca de biotina en la superficie. Al purificar las proteínas de membrana biotiniladas de los trofozoítos de *N. fowleri* y realizar ensayos tipo western blot se detectaron bandas de aproximadamente 70 y 100 kDa. Por otro lado, se realizaron ensayos de Overlay donde se interaccionaron las proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri* y las proteínas de membrana biotiniladas de células MCK; sin embargo, no se pudo detectar ninguna interacción. Con todos estos resultados podemos concluir que los trofozoítos de *N. fowleri* presentan en su superficie residuos de manosa, glucosa y fucosa, además, de presentar proteínas de membrana diferenciales con respecto a las especies no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*), probablemente estas proteínas de membrana puedan estar involucradas en el proceso de adherencia.

ABSTRACT

The genus *Naegleria* includes free-living amoebae widely distributed in nature, only *Naegleria fowleri* produces primary amoebic meningoencephalitis (PAM). In the initial stages of infection it is produced the mucus secretion that traps trophozoites. However, some trophozoites are capable to penetrate the olfactory neuroepithelium and to reach the central nervous system (CNS). Several virulence factors have been described in *N. fowleri*; however, little is known about the molecules involved in the adhesion process of this amoeba. It is described the importance of the plasma membrane and the glycocalyx in the process of recognition and adhesion between host-parasite. Therefore, the purpose of the preset study was to purify and identify membrane proteins of *N. fowleri*, for that membrane proteins of *N. fowleri* trophozoites were purified as well as non-pathogenic species (*N. gruberi* and *N. lovaniensis*), with the membrane proteins obtained were performed SDS-PAGE; analyzing the profiles of membrane proteins from the three species. It was noted that the bands of approximately 23, 26, 49, 70, 100 and 250 kDa are differentially expressed in *N. fowleri* with respect to non-pathogenic species. Furthermore, the biotin labeling of the membrane protein of *N. fowleri* trophozoites and incubation with specific lectins for mannose, glucose and fucose carbohydrates was performed, it was possible to detect by cytochemistry assay using peroxidase and by epifluorescence and confocal microscopy the biotin labeling on the membrane of trophozoites. By purifying the biotinylated membrane proteins of *N. fowleri* trophozoites and perform western blot assays two bands of approximately 70 and 100 kDa were detected. Furthermore, tests overlay were performed, with membrane proteins of *N. fowleri* trophozoites and biotinylated membrane proteins interacted cells MDCK were performed; however, no interaction was detected. With all these results we can conclude that *N. fowleri* trophozoites present in the surface waste of mannose, glucose and fucose. Also present differential membrane proteins compared to non-pathogenic species (*N. lovaniensis* and *N. gruberi*) probably these membrane proteins may be involved in the adhesion process.

I. MARCO TEÓRICO

I.1 Introducción

Las amibas de vida libre (AVL) comprenden un grupo de protozoarios con una amplia distribución en la naturaleza (Trabelsi *et al.*, 2012). Dentro de las AVL, solo cuatro géneros de importancia médica se han reportado como agentes etiológicos de infecciones oportunistas y no oportunistas en humanos y en animales (Schuster y Visvesvara, 2004). En comparación con otras enfermedades causadas por protozoos las infecciones causadas por las AVL destacan por su amplia distribución, virulencia extrema y falta de un tratamiento efectivo. Durante la primera mitad del siglo XX, las AVL eran conocidas como protozoos no patógenos, ubicuos en suelos y agua. Debido a las observaciones tan puntuales de Culbertson fue que se propuso el concepto del potencial patogénico de las AVL como agentes causales de infecciones humanas (Visvesvara *et al.*, 2007). De manera particular, dentro del género *Naegleria*, sólo *N. fowleri* produce MAP cuya tasa de mortalidad es superior al 95%, por lo que en los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar los mecanismos de patogenicidad, así como el desarrollo de la enfermedad en el ser humano, por este protozoario.

I.1.1 Antecedentes generales

En (1965) Fowler y Carter realizaron el primer reporte de cuatro casos de meningitis piogénica aguda en Australia atribuida al género *Acanthamoeba*. Con lo que se da inicio a la investigación de la etiopatología de la meningoencefalitis amibiana primaria; a finales de (1969) Carter publica por vez primera la descripción de las características morfológicas y ultraestructurales de *Naegleria spp.* y los cambios histopatológicos experimentales inducidos por esta amiba. Por otro lado, Julio Martínez y colaboradores (1971) realizaron un estudio sobre la meningoencefalitis experimental producida por *Naegleria* en el ratón, basado en un análisis de microscopía electrónica de transmisión (MET), dando a conocer las características más relevantes de la amiba y las del tejido cerebral afectado. El mismo grupo de trabajo en (1973) realizaron una descripción anatómica e histológica del neuroepitelio olfatorio, los nervios olfatorios y de las estructuras meníngeas en el modelo del ratón por MET y por microscopía de luz. Facilitando así la comprensión

y estudio de las vías de invasión de *N. fowleri*. Así mismo, propusieron que la invasión a la mucosa olfatoria puede ocurrir a través de las uniones estrechas de las células y por la vía neurotrópica. Así, Jarolim y colaboradores (2000) realizaron un análisis por microscopía de luz, donde observaron a los trofozoítos de *N. fowleri* entrando por la cavidad nasal, penetrando la mucosa olfatoria, el plexo nervioso de la submucosa, la fila olfatoria, la placa cribiforme, bulbos olfatorios y en última instancia el acceso al sistema nervioso central (SNC). Una vez en el SNC las amibas causan una inflamación aguda y fulminante, con necrosis hemorrágica de las meninges y del cerebro. Más recientemente, Rojas-Hernández y colaboradores (2004) realizaron la caracterización inmunohistoquímica de las fases iniciales de MAP en el ratón, desde las primeras 8 h hasta las 96 h después de la instilación intranasal; observaron que después de 8 h las amibas entran en contacto con la capa de moco del epitelio olfatorio, que posterior a las 30 h las amibas migraron a través de la lámina cribosa a lo largo de la fila olfatoria, a las 96 h se presentó una reacción inflamatoria severa en los bulbos olfatorios y en el cerebro acompañada de un gran daño tisular que conduce a la muerte.

I.1. 2 Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre son protozoarios cosmopolitas (Visvesvara *et al.*, 2007; Trabelsi *et al.*, 2012). Sólo cuatro géneros de AVL: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia* son responsables de infecciones oportunistas y no oportunistas en los seres humanos y otros animales (Schuster y Visvesvara, 2004). Se conoce que *Acanthamoeba spp.* produce encefalitis amibiana granulomatosa, lesiones cutáneas, pulmonares y renales; por su parte *Balamuthia mandrillaris* produce infecciones en la piel, pulmones y encefalitis amibiana hemorrágica y necrotizante, también se ha reportado a *Sappinia spp.* como agente causal de encefalitis. *Naegleria fowleri* es el agente etiológico de la MAP, enfermedad mortal no oportunista (Trabelsi *et al.*, 2012; Schuster y Visvesvara, 2004). Por otro lado, se ha reportado que las AVL pueden ser portadores de bacterias patógenas como *Legionella pneumophila*, *Vibrio spp.* y *Listeria spp.* (Cateau *et al.*, 2014; Newsome *et al.*, 1985; Ly y Muller, 1990; Thom *et al.*, 1992).

La clasificación taxonómica clásica divide a los protozoos en cuatro grupos: *Sarcodina* (amibas), *Mastigophora* (flagelados), *Esporozoa* (protozoos parásitos) e *Infusoria* (ciliados). Esta clasificación ha sido abandonada por una nueva clasificación basada en un enfoque moderno de acuerdo a la morfología, bioquímica y filogenia molecular (Sina *et al.*, 2005). De acuerdo con este nuevo esquema las cuatro AVL patógenas se clasificaron en dos súper grupos. Así, los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia* se clasificaron en el súper grupo *Amoebozoa*; mientras que *Naegleria* en el súper grupo *Excavata* (Sina *et al.*, 2005; Trabelsi *et al.*, 2012).

I.1.2.1 *Naegleria fowleri*

Naegleria fue estudiada principalmente como modelo de transformación por su capacidad de flagelar. Sin embargo, la atención en *Naegleria* se centró cuando se descubrió que podía causar una infección cerebral fatal en seres humanos (De Jonckheere., 2002). El nombre de *N. fowleri*, surge después de que Malcolm Fowler, la reconoce por primera vez como agente causal de la MAP en Australia

(Carter, 1970). *N. fowleri* es un protozoario no oportunista ampliamente distribuido en la naturaleza a nivel mundial (Marciano-Cabral, 1988; Cateau *et al.*, 2014; Trabelsi *et al.*, 2012), con capacidad anfizoica, ya que pueden ser de vida libre o actuar como parásito (Visvesvara *et al.*, 2007). En la actualidad, más de 40 especies de *Naegleria* se han descrito (Visvesvara y Schuster, 2008), de las cuales sólo *Naegleria fowleri* es capaz de producir la MAP, una enfermedad aguda y fatal que afecta el SNC (Trabelsi *et al.*, 2012; Schuster y Visvesvara, 2004); otras especies como *N. australiensis*, *N. itálica* y *N. philipinensis* pueden ser patógenos para el modelo de ratón y producirles MAP, sin embargo, no han sido identificadas en casos humanos (Visvesvara *et al.*, 2007).

Como organismo termófilo, es capaz de crecer a temperaturas de hasta 45°C (Marciano-Cabral, 1988; Carter, 1970; Trabelsi *et al.*, 2012), y se alimenta de bacterias, algas, hongos y otras partículas orgánicas (Cateau *et al.*, 2014). Es un organismo altamente aerobio, y la glucosa es esencial para su crecimiento, puede soportar rangos de pH de 4.6 a 9.5 in vitro (Marciano-Cabral, 1988). Por otro lado,

el citoesqueleto de *Naegleria* ha sido examinado por diferentes investigadores, identificando la presencia de microfilamentos delgados y gruesos similares a actina y miosina, de hasta 256 nm de longitud (Marciano-Cabral, 1988; Carter, 1970).

Los trofozoítos de *N. fowleri* se reproducen por fisión binaria, la división nuclear es inusual, ya que la membrana nuclear permanece intacta y el nucléolo persiste, a lo que se conoce como criptomitosis o promitosis. En las primeras etapas de la mitosis, se producen la ampliación del núcleo y condensación del material cromosómico, el núcleo se alarga, los microtúbulos del huso aparecen en el núcleo y los cromosomas se orientan a lo largo de una placa ecuatorial y por último el nucléolo se divide (González-Robles *et al.*, 2009).

El número exacto de cromosomas en *Naegleria spp.* sigue siendo controversial, estudios realizados por De Jonckheere (1989) reportan que el número de cromosomas de *Naegleria* es estimado entre 15-23 y su tamaño en cientos de kilobases hasta 1.5 Mb. Fulton (1970) reporta 2-16 cromosomas; Clark (1990) reporta un aproximado de 23 cromosomas, González-Robles (2009) observa alrededor de 20 estructuras con apariencia de cromosomas al teñir el DNA nuclear con DAPI.

I.1.2.2 Taxonomía

La taxonomía de las AVL es inestable y sujeta a cambios, por las controversias que han surgido a lo largo de la historia del estudio de las AVL (Schuster y Visvesvara, 2004). Recientemente se ha clasificado a *N. fowleri* en el súper grupo *Excavata*, clase *Heterolobosea*, familia *Vahlkampfiidae* (Sina *et al.*, 2005; De Jonckheere, 2011).

I.1.2.3 Morfología de *Naegleria fowleri*

N. fowleri presenta tres estadios: el trofozoíto, el flagelado y el quiste (Visvesvara *et al.*, 2007). El trofozoíto o estado vegetativo tiene un diámetro de 10-25 μm es la fase móvil y está rodeado por una unidad de membrana de 10 nm de ancho, compuesta de dos capas densas separadas por un espacio claro; tiene una forma de limax (babosa), con su parte anterior ancha y la posterior estrecha. El extremo posterior,

presenta una estructura de 2 μm de largo llamada proceso uroide, que puede arrastrar una pequeña cantidad de desechos (Carter, 1970). Se mueve mediante la formación de protuberancias semiesféricas del extremo anterior llamadas pseudópodos formados de ectoplasma hialino (Marciano-Cabral, 1988). Se le observa claramente un gran núcleo redondeado, con un nucléolo de localización central electrondenso (Marciano-Cabral, 1988; González-Robles *et al.*, 2009). El citoplasma contiene numerosas mitocondrias con formas muy particulares denominadas forma de campana, de copa y oval; tiene ribosomas libres y unidos a la membrana del retículo endoplásmico, vacuolas digestivas, vacuolas contráctiles, un retículo endoplásmico liso, y un aparato primitivo similar al Golgi. También se han observado lisosomas primarios y secundarios, además presentan copas fagocíticas o amebostomas que son extensiones citoplasmáticas de la superficie utilizados para ingerir bacterias, levaduras y desechos celulares (Marciano-Cabral, 1988). El trofozoíto se transforma en un estadio de flagelado de 10-16 μm de diámetro cuando la concentración iónica del medio cambia, por lo general presenta dos flagelos aunque pueden ser más. Se le han observado numerosas vacuolas e inclusiones dentro del citoplasma y unidas a la membrana, así como gránulos densos, retículo endoplásmico rugoso, cuerpos basales, mitocondrias y ribosomas (Paterson *et al.*, 1981; Marciano-Cabral, 1988). El trofozoíto se transforma en el estadio de quiste resistente de 7-15 μm de diámetro cuando disminuyen los suministros de alimentos o las condiciones de crecimiento se vuelven adversas. Durante las primeras etapas del proceso de enquistamiento la morfología del trofozoíto cambia de una forma irregular a una forma globular típica del prequiste, se observan además un retículo endoplásmico rugoso con cisternas que contienen material fibrilar denso y vesículas de 50-500 nm de diámetro que están frecuentemente asociadas a la membrana plasmática y que son claramente diferentes de las gotas de lípidos y otras vacuolas que se encuentran en el citoplasma. El quiste es esférico y de doble pared con un endoquiste grueso y un ectoquiste delgado estrechamente unidos. Se ha demostrado al teñir la pared del quiste con Calcofluor blanco la presencia de polisacáridos β -glucano, sugiriendo que el quiste está compuesto de celulosa y quitina. La pared del quiste tiene poros

u ostiolos. Además, se han descrito tapas mucosas u opérculos que sellan cada ostiolo. También, se ha observado un espacio de espesor variable entre la pared del quiste, similar al espacio peritrófico visto en quistes de otros protozoarios (Chávez-Munguía *et al.*, 2009). Tanto el quiste como el flagelado poseen un solo núcleo con un nucléolo prominente, este último es menos pronunciado que en la fase de trofozoíto. En el quiste también se observan un primitivo retículo endoplásmico rugoso, gránulos electrondensos, y una variedad de vacuolas citoplasmáticas, incluyendo vacuolas digestivas y contráctiles (Fig. 1) (Carter, 1970; Martínez *et al.*, 1971; Marciano-Cabral, 1988). Cuando *N. fowleri* desenquista es porque las condiciones del ambiente son favorables, el agua entra en el quiste por osmosis y rehidrata el citoplasma permitiendo la reanudación del metabolismo y la síntesis de diferentes proteínas (Schuster y Visvesvara, 2004; Cateau *et al.*, 2014; Trabelsi *et al.*, 2012).

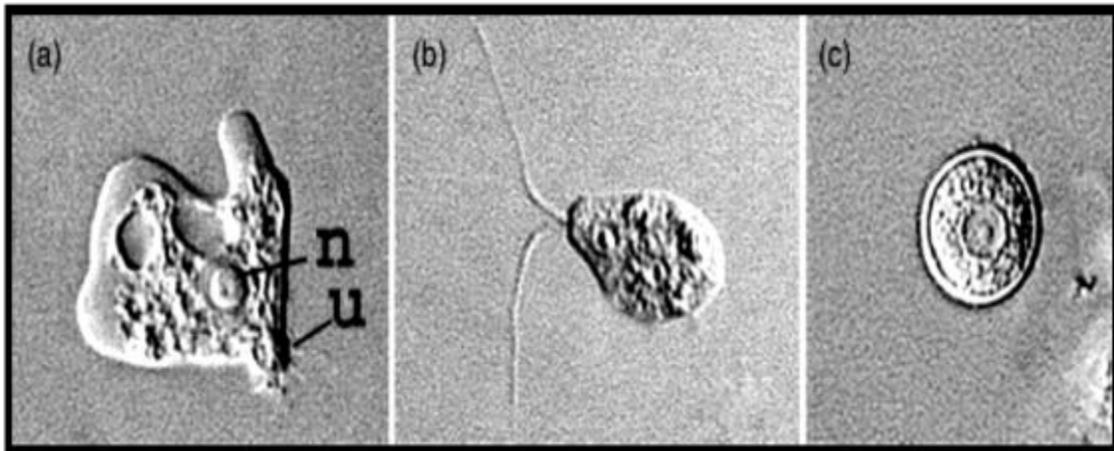
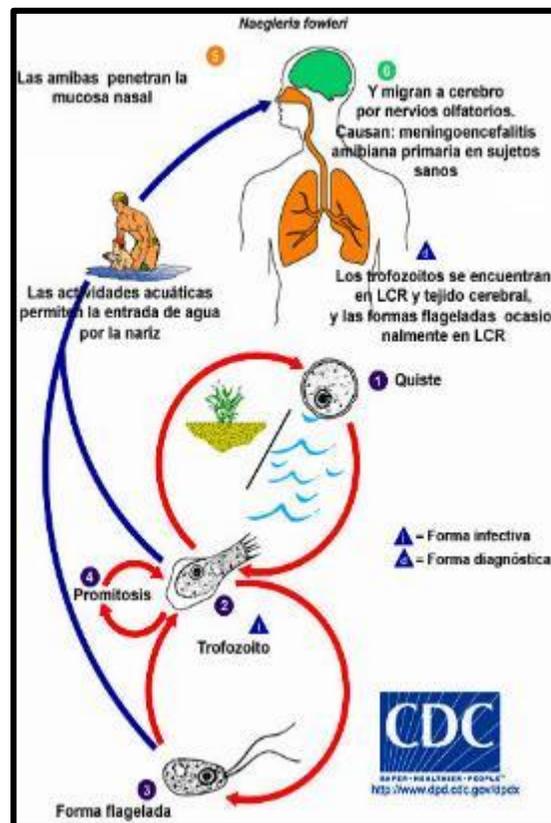


Fig. 1. Estadios de *Naegleria fowleri*: (a) trofozoíto, (b) flagelado (c) quiste. 1000x (Visvesvara *et al.*, 2007).

I.1.3 Ciclo de vida

Los trofozoítos son la única etapa infectante que se conoce con exactitud, ya que son los únicos que se han observado en las piezas post-mortem de cerebro humano, aunque se cree que la forma flagelada podría también infectar al humano, pues se ha reportado experimentalmente que al inocular el flagelado en ratones, se reproduce la enfermedad y llega a ser mortal. Cuando las personas están en contacto con agua contaminada con trofozoítos de *N. fowleri*, estos entran al humano por la mucosa nasal, penetran la mucosa olfatoria, llegan al plexo nervioso, lamina cribosa, penetran la fila olfatoria y a través de los nervios olfatorios llegan a bulbos olfatorios produciendo MAP (Fig. 2) (Martínez *et al.*, 1973; Jarolim *et al.*, 2000; Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a).



Fi. 2. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*. Tomado del CDC. Atlanta, EUA.

I.1.4 Ecología

Naegleria fowleri ha sido encontrada y aislada de diferentes ambientes como el suelo, agua dulce, lagos, cuerpos de agua para fines recreativos, agua de pozo, agua termales artificiales, aguas residuales, lodo, etc., (Wellings *et al.*, 1977; Blair *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 1977; De Jonckheere *et al.*, 1977; Szenasi *et al.*, 1988, Solhjo *et al.*, 2012; Lares-Hernández, 2010). La presencia de *N. fowleri* en ambientes acuáticos es un problema potencial de riesgo para la salud, por lo que se ha mostrado gran interés por conocer la ecología de *N. fowleri*, ya que la presencia de la amiba en las aguas de recreo es una amenaza, basándose en que muchas infecciones se han producido en los cuerpos artificiales de agua o en albercas mal tratadas. En Francia por ejemplo, las autoridades han considerado que las aguas que contienen ≥ 100 trofozoítos de *N. fowleri*/L no son aptas para nadar, debido a la mayor probabilidad de contraer la infección (Schuster y Visvesvara, 2004).

Se sugiere que la alteración del medio ambiente por la acción humana (contaminación térmica y calentamiento global) resulta en la disminución de otros protozoarios y fauna termosensible normal, eliminando así la competencia microbiana y favoreciendo la colonización por *N. fowleri* (Schuster y Visvesvara, 2004). Por otro lado, existe una creciente evidencia de que los ecosistemas microbianos complejos que desarrollan biopelículas en el agua contribuyen a la supervivencia y la protección de los microorganismos patógenos. Dentro de estas comunidades microbianas, las AVL podrían estar favoreciendo la multiplicación y diseminación de una gran variedad de familias de bacterias patógenas, ya que las AVL les permiten no solo sobrevivir, sino también proliferar en ambientes hostiles, al utilizar a las amibas como fuente de alimento y como un escudo protector contra agresiones externas. Así, las AVL constituyen una reserva potencial para estos agentes patógenos, lo que permite la supervivencia, multiplicación y difusión de las bacterias virulentas en los sistemas de agua, a pesar de la aplicación de la desinfección o tratamientos térmicos (Loret *et al.*, 2010).

I.1.5 Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) y su fisiopatología

La MAP es una enfermedad que afecta el SNC, poco conocida y rápidamente fatal (Trabelsi *et al.*, 2012). Produce en el cerebro y las meninges una inflamación aguda, hemorragia y una extensa necrosis (Martínez *et al.*, 1973; Jarolim *et al.*, 2000; Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a), la muerte regularmente ocurre en una semana a catorce días (Movahedi *et al.*, 2012; Schuster y Visvesvara, 2004). Dentro del cuadro clínico se presentan síntomas y signos que incluyen dolor de cabeza intenso, náusea, vómito en proyectil, fiebre (38.5-41°C), anomalías de comportamiento incluyendo letargo, convulsiones, confusión, diplopía, comportamiento extraño y rigidez de nuca con signos Kerning y Brudzinski positivos. Más tarde, la fotofobia y la parálisis de los nervios craneales pueden indicar edema cerebral. La presión intracraneal generalmente se eleva a 600 mm H₂O o superior, el aumento de la presión intracraneal y herniación cerebral suelen ser la causa de la muerte (Heggie, 2010). Alteraciones del ritmo cardíaco y necrosis miocárdica se han encontrado en algunos casos. El líquido cefalorraquídeo LCR puede variar de un color grisáceo a blanco amarillento, puede ser rojo en las etapas avanzadas, y el número de eritrocitos puede aumentar hasta 24.600 mm³ (Visvesvara *et al.*, 2007). La cuenta de glóbulos blancos, con predominio de polimorfonucleares (PMN) puede variar de 300 células/mm³ hasta 26.000/mm³. La concentración de proteína puede variar de 100 mg/100 ml a 1000 mg/100 ml (Trabelsi *et al.*, 2012). La mayoría de lesiones se encuentran en la base de los bulbos olfatorios y en etapas avanzadas de la MAP se encuentra prácticamente en todo el cerebro (Visvesvara y Schuster, 2008). Los bulbos olfatorios del paciente se caracterizan por tener una necrosis hemorrágica y generalmente están rodeadas por exudado purulento, los hemisferios cerebrales son generalmente suaves, edematosos y congestionados. Las leptomeninges (aracnoides y piamadre) están muy congestionadas y la corteza también muestra numerosas áreas hemorrágicas superficiales (Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara y Schuster, 2004).

I.1.6 Epidemiología de la MAP

La mayoría de los casos de MAP causados por *N. fowleri* se adquieren generalmente por las actividades recreativas en las aguas frescas o calentadas artificialmente durante la temporada de verano (Cateau *et al.*, 2014). Los más afectados son niños y adultos jóvenes con buena salud. Aunque las infecciones de MAP pueden ocurrir con mayor frecuencia en las regiones tropicales, la mayoría de los casos que se han reportado son en zonas subtropicales o templadas. El hecho de que la infección no se reporte en las zonas tropicales se debe probablemente a mejores servicios de salud pública en zonas templadas, además de que en zonas tropicales las infecciones de MAP podrían pasar desapercibidas entre las millones de otras infecciones presentes (De Jonckheere, 2011). Aunque la MAP todavía se considera un trastorno poco común, los reportes se incrementan cada año, el número va de 250 (De Jonckheere, 2015) a más de 300 (Trabelsi *et al.*, 2012) con casos en Australia, Estados Unidos, Gran Bretaña, Nueva Zelanda, Irán, Pakistán, India, Taiwán, México, Cuba, Japón, Tailandia, Hong Kong, etc. En México, se han reportado más de 25 casos confirmados, la mayoría en la región noroeste del país con sólo un caso tratado con éxito (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005). Como prácticamente es una enfermedad mortal, y sólo alrededor del 5% de los pacientes sobreviven, se considera un problema serio de salud pública (Schuster y Visvesvara, 2004). Hasta el 2008, se reportaron 111 casos de MAP en Estados Unidos de Norteamérica (Yoder *et al.*, 2010). Por otro lado, secuencias de ocho tipos diferentes de *N. fowleri* se han detectado en todos los continentes, con una distribución desigual. Siete tipos (2-7) se detectan en Europa, y un único tipo (5) se encuentra en el Pacífico oeste (Oceanía y Japón) y tres tipos (1, 2, 3) en el continente americano (De Jonckheere, 2011).

I.1.6.1 Respuesta inmunológica en la MAP

Previamente se ha descrito que *N. fowleri* activa la vía alterna del complemento (Holbrook *et al.*, 1980). Por estudios inmunohistoquímicos de los acontecimientos tempranos de la infección realizados en el modelo murino, se ha podido observar que los parásitos quedan embebidos en la capa de moco, lo que indica que la capa

adherente de moco que recubre el epitelio de la mucosa actúa como primera línea de defensa del hospedero (Rojas-Hernández *et al.*, 2004). Sin embargo, esta barrera es insuficiente, ya que las amibas invaden el neuroepitelio olfatorio y llegan a la lámina propia. La respuesta inmune innata se ha evaluado, donde se demostró que las mucinas tienen la capacidad de inhibir la adhesión de los trofozoítos a las células epiteliales (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b). En otros estudios del mismo grupo, se realizó la descripción de la inflamación que ocurre a nivel cerebral durante la MAP en el modelo murino; se observó que los eosinófilos, neutrófilos y los macrófagos son los principales tipos celulares presentes en la infección; al utilizar ratones knockout CD-38 se comprobó que la respuesta inflamatoria orquestada por las células es un evento clave en el daño que se produce en el tejido del SNC que está caracterizado por una extensa lisis, áreas necróticas y hemorrágicas (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a). El mismo grupo, basados en los estudios previos donde se reporta la producción de moco como una respuesta inmune innata, demostraron que *N. fowleri* induce la expresión y secreción de MUC5AC y de especies reactivas de oxígeno (ROS) *in vitro* en células epiteliales de las vías respiratorias (NCI-H292), corroborando con esto el papel de las mucinas como factores de resistencia a la infección al impedir la adhesión de la amiba al epitelio olfatorio; las citosinas IL-8 y IL-1 β son también expresadas en células epiteliales de las vías respiratorias, teniendo un papel importante en los mecanismos de inmunidad innata que probablemente previenen la mayoría de las infecciones de MAP, también demostraron que ROS está involucrado en la vía de señalización de la producción de IL-8 y MUC5AC, por activación del EGFR (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2009). En resumen, los componentes del sistema inmune innato que responden a la infección contra *N. fowleri* incluyen el complemento, los neutrófilos, los macrófagos y la capa de moco que recubre el epitelio respiratorio. Por lo tanto, se dice que los datos disponibles en la actualidad sugieren que la inmunidad innata puede jugar un papel más importante que la inmunidad adquirida en la resistencia a la infección por *N. fowleri* (Marciano-Cabral y Cabral, 2007). Por otro lado, las AVL como *N. fowleri* se encuentran entre los protozoos con quien los seres humanos están expuestos a lo largo de sus vidas, ya sea a través del contacto directo con el

suelo o el agua, o por quistes que por el viento se pudieran albergar en la mucosa nasal (De Jonckheere, 2011), por lo que probablemente se desarrollen respuestas humorales contra éste patógeno. Es así que, la respuesta inmune humoral contra *N. fowleri* ha sido estudiada tanto en animales como en humanos, reportando títulos de anticuerpos (IgA, IgM) específicos para *N. fowleri* en calostro de mujeres aparentemente sanas, en muestras de suero y saliva de pacientes hospitalizados, así como, en muestras de suero de mamíferos silvestres y roedores, probablemente debido a contactos previos con la amiba (Shibayama *et al.*, 2003; Seidel *et al.*, 1982; Visvesvara y Moura, 2007; De Jonckheere, 2011).

I.1.6.2 Diagnóstico

Debido a que no hay características clínicas distintivas que diferencian la MAP con meningoencefalitis piógenas, es imperativo que la comunidad médica tratante obtenga información sobre el contacto del paciente con el agua dulce, incluyendo aguas termales, y un diagnóstico diferencial se lleve a cabo rápidamente. El diagnóstico rápido se obtiene mediante un examen microscópico del LCR recién extraído, para visualizar las amibas móviles (Visvesvara y Schuster, 2008) y mediante la prueba de enflagelación, que consiste en incubar los trofozoítos obtenidos por centrifugación del LCR en agua destilada durante aproximadamente 2 h hasta diferenciarse en flagelado (Heggie, 2010). Los trofozoítos se pueden identificar también mediante tinciones como Giemsa o Wright a partir de muestras de LCR (Trabelsi *et al.*, 2012). Un ensayo de PCR en tiempo real multiplex recientemente desarrollado puede identificar en LCR el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los tres genotipos de *N. fowleri* que se sabe están presentes en el continente americano (Qvarnstrom *et al.*, 2008). La confirmación de la especie se logra mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos anti-*N. fowleri*. La genotipificación se basa en el análisis de los espaciadores transcritos internos (ITS), incluyendo el ADNr 5.8s mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005).

I.1.6.3 Tratamiento

Ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que *N. fowleri* es sensible al antifúngico anfotericina B (AMB), por lo que es el fármaco de elección en el tratamiento de MAP solo o en combinación con otros fármacos (Schuster y Visvesvara, 2004). Combinaciones de anfotericina B con miconazol por vía intravenosa e intratecal y rifampicina oral han tenido buenos resultados (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005). Se han realizado estudios *in vitro* con fenotiazina (clorpromazina y trifluoperazina), encontrando que tienen efectos inhibidores sobre *N. fowleri* (Schuster y Visvesvara, 2004). La azitromicina, un antimicrobiano del tipo de los macrólido, ha demostrado ser eficaz contra *Naegleria* tanto *in vitro* como *in vivo* (Goswick y Brenner, 2003). Así mismo, se ha demostrado que *N. fowleri* es sensible al voriconazol (Schuster *et al.*, 2006). Otros antibióticos que se han probado *in vitro*, son clotrimazol, itraconazol, fluconazol y ketoconazol, con diversos grados de eficacia (De Jonckheere, 2011). Recientemente, se probó Corifungin en el modelo murino de MAP, su eficacia se confirmó por la ausencia de amibas detectable en el cerebro y 100% de supervivencia de los ratones (Debnath *et al.*, 2012).

I.1.7 Patogenicidad y virulencia

La patogenicidad amibiana puede consistir en procesos complejos que incluyen mecanismos de contacto dependiente e independiente que promueven la muerte celular. Entre los factores dependientes de contacto se han identificado las proteínas Nfa1, HSP70, etc., dentro de los factores independientes de contacto se encuentran las fosfolipasas con actividad citolítica, capaz de producir destrucción de la membrana celular; las elastasas que facilita la destrucción del tejido (Ferrante y Bates, 1988); proteínas formadoras de poros (naeglerioporos A y B) que lisan las células diana (Herbst *et al.*, 2002) y la presencia de diversas proteasas con capacidad de degradar tejidos y proteínas (Shibayama *et al.*, 2013; Lowrey y McLaughlin, 1984; Aldape *et al.*, 1994; Barbour y Marciano-Cabral, 2001; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b; Serrano-Luna *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014). A pesar de las investigaciones realizadas, el mecanismo citolítico de *N. fowleri* es aún poco conocido, se ha reportado que *N. fowleri* induce la producción

intracelular de especies reactivas del oxígeno, matando a las células blanco, por un mecanismo conocido como necroptosis (Song *et al.*, 2011). Además, se ha descrito la presencia de sistemas tripanotión y glutatión reductasa en *N. fowleri* pudiendo resistir los mecanismos de estrés oxidativos y la toxicidad del oxígeno intracelular (Ondarza *et al.*, 2006). Por otro lado, debido a que se ha reportado que *N. fowleri* resiste el daño por complemento, se ha investigado este fenómeno, observando la formación de vesículas en la membrana que atrapaban el complejo de ataque a la membrana impidiendo de esta manera su eliminación (Toney *et al.*, 1994). Además, recientemente se ha identificado una proteína de membrana similar a CD-59 que posiblemente tenga la capacidad de inhibir la formación del complejo de ataque a la membrana y así resistir la lisis por complemento (Fritzinger *et al.*, 2006). Por otro lado, por estudios ultraestructurales mediante MET se han observado gránulos electrondensos (GED) en *N. fowleri*, que se encuentran en abundancia en trofozoítos recuperados de lesiones cerebrales de ratones, por lo que se sugirió que los GED pueden participar en los mecanismos citopático y citolítico de *N. fowleri* (Chávez-Munguía *et al.*, 2014). En otros estudios, se identificó y caracterizó la proteína citosólica de choque térmico 70 en *N. fowleri* (Nf-cHSP70) (Kyoung-Ju *et al.*, 2007). Se ha sugerido que estas proteínas juegan un papel esencial en respuestas de adaptación de los parásitos, pudiendo participar en una variedad de procesos esenciales, incluyendo plegado y replegado de proteínas y la regulación de mecanismos inmunes del hospedero, o debido a que *N. fowleri* es termófila, esta proteína puede ser muy importante en la regulación de los cambios de temperatura y ser un factor importante de virulencia del parásito. *N. fowleri* tiene una gran capacidad de producir efecto citopático y fagocitosis (Marciano-Cabral, 1988), por lo que se ha observado que la proteína Nfa1 al co-cultivarse *N. fowleri* con células CHO se localiza en pseudópodos y en las copas fagocíticas, por lo que se sugiere que desempeña un papel importante en la actividad fagocítica como un mecanismo de contacto con las células (Su-Yeon *et al.*, 2005; Hae-Jin *et al.*, 2010).

I.1.8. Mecanismo de adherencia: adhesina-receptor

La adherencia es un evento importante en la colonización de sitios específicos en plantas y animales, y en particular, un evento temprano e importante en la patogénesis de las infecciones en animales y en humanos. Además de ser, un campo de estudio de mucha importancia por el impacto que tiene sobre la ecología microbiana y las enfermedades infecciosas (Beachey, 1981).

En el proceso de adhesión, las bacterias a menudo utilizan proteínas de su superficie, adhesinas, que se unen a componentes específicos del tejido células o de la matriz extracelular. En muchos de estos casos, éstos se unen a estructuras ricas en carbohidratos en la superficie células que forman parte de glicoproteínas o lípidos. Ya que este reconocimiento específico es requerido para el desarrollo de infecciones bacterianas, virales y por protozoarios. El reconocimiento es también una de las causas de preferencia de ciertos patógenos por determinados tejidos, fenómeno denominado como tropismo celular. Por lo que se han diseñado y sintetizado inhibidores de la adhesión de microorganismos, como herramienta potencial para la creación de nuevas terapias para la prevención y posible tratamiento de las infecciones (Pieters, 2011; Kato, 2014). En resumen, los estudios de las adhesinas y sus receptores en diversos microorganismos, nos permiten examinar un gran número de preguntas, tales como la adherencia de los microorganismos a las células del hospedero, ya que se establece específicamente vía moléculas de superficie que las reconocen, es decir, no es un fenómeno inespecífico. Además, se sabe que la adherencia es un prerrequisito para el desarrollo de la infección, he ahí el interés en el estudios de este campo (Beachey, 1981).

Las adhesinas son estructuras adhesivas encontradas en las superficies de los microorganismos, que deben tener sus receptores en la superficie de las células del hospedero, cuya estructura varía en composición, tamaño y naturaleza química; sin embargo, la mayoría contiene grupos carbohidratos en su estructura química. El término adhesina fue acuñado por vez primera por Duguid en 1980, ya que este término hace mejor referencia que el de ligando, puesto que, este último refiere

principalmente a moléculas pequeñas. Sin embargo, con respecto a las adhesinas bacterianas, estas estructuras a menudo están compuestas de grandes estructuras polipeptídicas, por ejemplo, las fimbrias, pili, y apéndices filamentosos de muchas enterobacterias, que cumplen el papel de adhesinas y que no poseen una forma ni tamaño regular (Beachey, 1981).

Las adhesinas bacterianas que han sido estudiadas especialmente son aquellas asociadas con las infecciones del tracto urinario, respiratorio y entérico. Estas son las que típicamente se conocen como pili o fimbrias, que son similares a pelos que se encuentran en la superficie bacteriana, e incluyen las de tipo 1, 4, P, S y fimbria F1C, estas contienen proteínas de adhesión que exhiben afinidad por α -manosidos, Gal α 1-4Gal, sialil galatosa, GalNAc β 1-4Gal respectivamente (Pieters, 2011).

Existen diversos factores que median e influyen en el proceso de adherencia, entre estos se encuentra: tropismo celular, especificidad de especie a infectar, especificidad de unión, genética, factores no específicos que influyen en la adherencia, tales como secreción de moco, de péptidos y enzimas antimicrobianos que impiden la colonización de patógenos (Beachey, 1981).

Por lo tanto no cualquier molécula o proteína es una adhesina, entonces, para que una adhesina sea considerada como tal, debe cumplir la mayoría de los postulados de Beachey (1989), donde se menciona que:

- Toda adhesina debe ser molécula de superficie.
- Ser capaz de unirse a moléculas de superficie de la célula blanco (receptores).
- La adhesina purificada y anticuerpos dirigidos en contra de ésta, deberán inhibir la adhesión del parásito a las células blanco.
- Mutantes deficientes en adhesión deberán presentar alteraciones en la adhesión.
- Al revertir la alteración en la adhesión se debe restablecer la función.

A lo largo del estudio de diversos protozoarios de importancia médica se han descrito diferentes adhesinas, por ejemplo, en estudios previos en *E. histolytica*, se ha demostrado la expresión de una adhesina de tipo lectina, purificada por cromatografía de afinidad a galactosa, esta lectina está constituida por una galactosa terminal (Gal) y una N-acetilgalactosamina (GalNAc). Por análisis de electroforesis en dos dimensiones, se identificó que la lectina Gal/GalNAc es una proteína heterodimérica de 260 kDa que consiste en una subunidad pesada de 170 kDa y dos ligeras de 35 y 31 kDa (Petri *et al.*, 1995).

Por otro lado, el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales que inhiben el proceso de adhesión por unión a moléculas en la superficie que están relacionadas con este proceso constituye una herramienta muy útil para identificar los componentes de membrana que están involucrados en la adhesión de microorganismos patógenos. De manera particular, se ha identificado una adhesina en *E. histolytica*, mediante la producción de anticuerpos (MAb Adh 1 y 2) contra *E. histolytica*, mismos que por análisis de inmunofluorescencia indirecta reaccionaron en la superficie de los trofozoítos, además, se comprobó la capacidad de ambos anticuerpos de inhibir la adherencia, eritrofagocitosis y el efecto citopático de los trofozoítos de *E. histolytica* (Arroyo y Orozco, 1987). En otro grupo de trabajo, se realizó la purificación de una proteína de 220 kDa con propiedades de lectina en *E. histolytica*, empleando una columna de sefarosa, además, se elaboraron anticuerpos contra dicha proteína y por ensayos de inhibición de la adhesión de trofozoitos a células MDCK se evaluó el efecto de la proteína en la adherencia observando un claro efecto de inhibición de la adhesión (Rosales-Encina *et al.*, 1987).

I.1.9 ANTECEDENTES DIRECTOS

I.1.9 Antecedentes directos

A lo largo de la historia se han realizado diversos estudios encaminados a conocer y comprender los mecanismos que utilizan los microorganismos patógenos para producir daño. La superficie celular de los protozoarios patógenos juega un papel importante al interactuar con la célula hospedera mediante el glicocalix, componente de la membrana celular rico en carbohidratos; que les permite realizar diversos procesos como transporte, adhesión y reconocimiento celular. La unión de los parásitos a la superficie de la célula blanco es un paso importante para la invasión. Por lo que, se ha analizado la composición de carbohidratos en la superficie de algunos parásitos como *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. castellanii* y *N. fowleri*; observando diferencias significativas en la composición de carbohidratos entre especies patógenas y no patógenas.

Mediante el uso de lectinas biotiniladas y ensayos de citometría de flujo diferencias en los carbohidratos entre *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que los glicoconjugados de α -D-manosa, α -D-glucosa y N-acetil- α -D-galactosamina son más abundantes en *E. histolytica* que en *E. dispar*. Por ensayos de western blot se identificaron proteínas de 170, 150, 61, 57, 32 y 27 kDa posiblemente involucradas en el proceso de adhesión (Pacheco-Yépez *et al.*, 2009). En *A. castellanii*, se ha observado que la adhesión de los trofozoítos a las células de origen neuronal y epitelial involucra elementos del citoesqueleto. Además, por ensayos de biotinilación de proteínas de superficie de los trofozoítos con estreptavidina-peroxidasa se identificaron al menos 8 glicoproteínas con residuos N-acetil-glucosamina (GlcNAc) de 112, 106, 77, 54, 46, 31, 19 y 18 kDa y 8 glicoproteínas con residuos de manosa de 129, 106, 84, 77, 67, 31, 19 y 17 kDa (Soto-Arredondo *et al.*, 2014).

La naturaleza bioquímica de las diferentes adhesinas que presentan la gran diversidad de los protozoarios patógenos ha sido estudiada ampliamente, identificando a los carbohidratos como uno de los compuestos principalmente involucrados en la adhesión. En la superficie de trofozoítos de *A. castellanii* se ha identificado la presencia de glicoproteínas con residuos de manosa, los autores

describieron la purificación por cromatografía de afinidad a manosa y la clonación molecular de una proteína de membrana de unión a manosa (MBP); se detectó que en condiciones nativas su peso molecular es de ~400 kDa, y que está constituida por múltiples subunidades de 130 kDa (Garate *et al.*, 2004). Los mismos autores en el 2005, realizaron estudios bioquímicos y pruebas funcionales de la MBP en trofozoitos de *A. castellanii*, con los anticuerpos anti-MBP observaron inhibición de la adhesión a células de epitelio corneal, y se corroboró su localización en membrana plasmática por análisis inmunocitoquímicos (Garate *et al.*, 2005). También demostraron que existe mayor expresión de la MBP en trofozoítos de *A. castellanii* y una marcada reducción de su expresión en los quistes, por lo que estudiaron el potencial patogénico en diferentes aislados, mientras que, por ensayos de adhesión y de efecto citopático observaron una mayor expresión en aquellas cepas que producían mayor daño. Por lo que se sugiere que la proteína MBP de *A. castellanii* es central en los mecanismos de patogenicidad del parásito, regulando el efecto citopático *in vitro*, y la habilidad de adhesión a las células del epitelio corneal, además, de que el enquistamiento de *A. castellanii* está asociado con una desregulación de MBP lo que conlleva a una disminución en la habilidad para unirse a las células hospedero y producirles daño (Garate *et al.*, 2006).

La adherencia a las células blanco es un proceso complejo que puede involucrar más de una proteína en la interacción huésped-patógeno, por tal motivo, diversos grupos de investigación estudian los mecanismos involucrados en la adhesión que permitan establecer la unión, invasión e infección de los patógenos a los tejidos y células del hospedero y así comprender mejor dichos mecanismos en búsqueda de alternativas terapéuticas racionales que impidan o disminuyan los efectos citopáticos producidos por los patógenos invasores.

A pesar de que la interacción entre las amibas y su célula blanco es el paso inicial en el proceso de infección, la interacción de éstas a componentes de la matriz extracelular (MEC) del huésped, parece ser esencial para la invasión. La MEC desempeña un papel fisiológico importante en el mantenimiento de las células y los tejidos, además, de establecer mecanismos de señalización río abajo. Por lo que en

trabajos recientes se ha analizado la capacidad de *Acanthamoeba astronyxis* y *A. culbertsoni*, de unirse a glicoproteínas de la MEC (laminina, fibronectina y colágeno), por ensayos de adhesión, se observó que laminina es el principal sustrato de unión en ambas especies de *Acanthamoeba*. Se purificaron proteínas de la membrana plasmática de trofozoítos utilizando el kit (Mem-PER eukaryotic) y también se obtuvieron extractos totales de las amibas para realizar ensayos SDS-PAGE. Los autores identificaron en ambas especies una banda de aproximadamente 40 kDa y una de 55 kDa solo en *A. culbertsoni*, con lo que se demostró la presencia de una proteína de unión a laminina (Fig. 3) (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

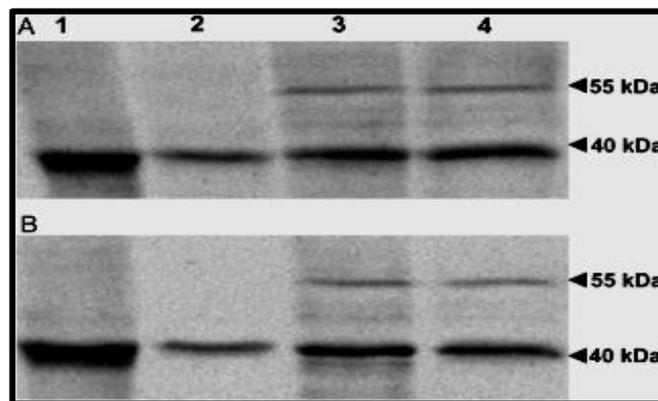


Figura 3. Detección de proteínas de unión a laminina-1 de *Acanthamoeba astronyxis* y *Acanthamoeba culbertsoni*. (A) laminina-1 de ratón o (B) laminina humana. Carril 1, extracto total de trofozoítos de *A. astronyxis*; carril 2, extracto de membrana de trofozoítos de *A. astronyxis*; carril 3, extracto total de trofozoítos de *A. culbertsoni*; carril 4, extracto de membrana de trofozoítos de *A. culbertsoni* (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Posteriormente, el mismo grupo analizó el proceso de adhesión e invasión, evaluaron el efecto que provoca la tripsina en la adhesión a colágeno y laminina, observaron una disminución del 28% en la adhesión a colágeno y se inhibió completamente la adhesión a laminina. También se estudió el efecto de los carbohidratos en la adhesión y observaron una clara disminución de la adhesión al ser tratados con metil- α -D-manopiranosido y con D-manosa. Además, se corroboró que el citoesqueleto de actina juega un papel importante en la unión e invasión a la MEC al observar una disminución de la adhesión cuando se trató con latrunculina A, ya que ésta secuestra monómeros de actina. Además, se comprobó la

participación de serina proteasas y metaloproteasas, ya que al usar sus respectivos inhibidores se produjo la inhibición de la adhesión (Rocha-Azevedo *et al.*, 2010).

Uno de los pasos importantes en la patogénesis de la encefalitis amibiana por *Balamuthia* es la invasión al SNC, dicho evento posiblemente ocurre a nivel de la barrera hematoencefálica, probablemente la adhesión es el primer mecanismo que se produce. En un estudio reportan la interacción de *B. mandrillaris* con células endoteliales de la microvasculatura de cerebro humano (HBMECs). Por ensayos de inhibición de la adhesión a células HBMECs con diferentes carbohidratos demostraron que los trofozoitos de *B. mandrillaris* se unen principalmente a residuos de galactosa y por biotilación de proteínas de membrana plasmática de trofozoitos de *B. mandrillaris* el kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin, seguido de la lisis de las amibas y elución en cromatografía de afinidad a galactosa, mediante ensayos de electroforesis y western blot, se identificó una proteína de unión a galactosa (GBP) de aproximadamente 100 kDa (Fig. 4) (Matin *et al.*, 2007).

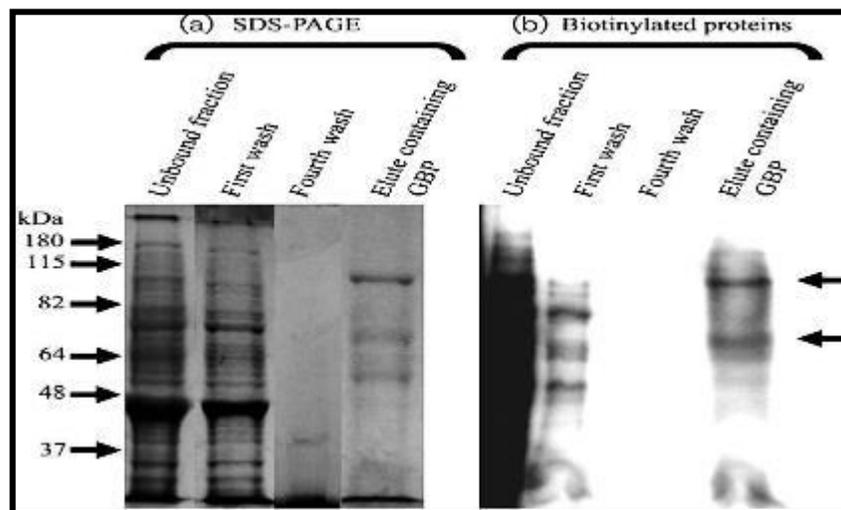


Figura 4. *B. mandrillaris* expresa una proteína de unión a galactosa (GBP).

a) Lisados totales de *B. mandrillaris*, analizados por SDS-PAGE, b) proteínas de membrana plasmática biotiladas, ambos extractos se eluyeron en una cromatografía de sefrosa-galactosa (Matin *et al.*, 2007).

Es de gran relevancia conocer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la adhesión de *N. fowleri* al neuroepitelio olfatorio. Como se ha descrito, los carbohidratos juegan un papel importante en el proceso de adhesión. Probablemente existan diferencias en el contenido, naturaleza y distribución de

carbohidratos entre diferentes especies de un mismo género. Por lo que estas diferencias pudieran estar relacionados con los mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* y otros protozoarios parásitos. Recientemente, se analizaron las diferencias de la superficie celular entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. Por análisis de MET, utilizando rojo de rutenio y azul alciano se marcaron las superficies de ambas especies de amibas, los autores observaron diferencias notables entre ambas especies. *N. fowleri* posee una superficie más gruesa en comparación con *N. lovaniensis* cuya superficie es más compacta y de apariencia granular. Por microscopía de fluorescencia con concanavalina A conjugada a rodamina, se observó que a diferencia de *N. lovaniensis*, *N. fowleri* exhibe una reacción irregular con parches de diferente tamaño e intensidad. Para confirmar las diferencias entre las dos especies de *Naegleria* a nivel de membrana plasmática, los trofozoítos de ambas especies se biotinilaron y se obtuvieron proteínas de membrana que fueron corridas en SDS-PAGE, se mostró un patrón similar entre las dos especies al ser teñidas con plata; sin embargo, al detectar las proteínas biotiniladas se pudieron observar bandas diferentes, para *N. fowleri* se encontraron bandas de aproximadamente 220, 25 y 20 kDa, mientras que *N. lovaniensis* presentó bandas de 120 y 96 kDa, demostrando que existen diferencias a nivel de membrana entre ambas especies, posiblemente esté relacionado con la patogenicidad de *N. fowleri* (Fig. 5) (González-Robles *et al.*, 2007).

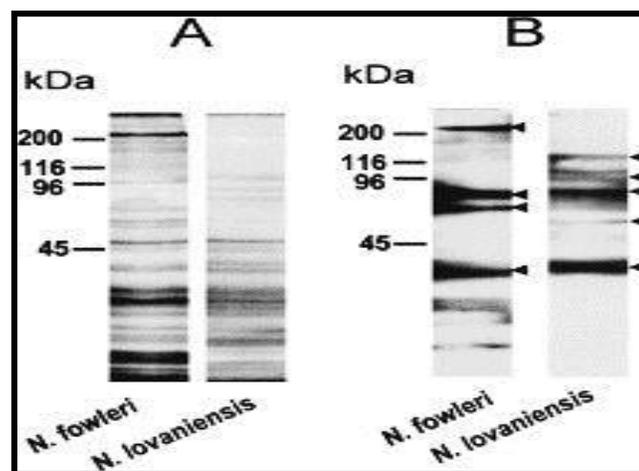


Figura 5. Extracción de las proteínas de membrana de *Naegleria fowleri* y *N. lovaniensis*. (A) Patrón de proteínas de membrana teñidas con plata de *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. (B) Patrón de proteínas de membrana biotiniladas de *N. fowleri* y *N. lovaniensis* (González-Robles *et al.*, 2007).

N. fowleri produce la infección al adherirse al neuroepitelio olfatorio e invadir el SNC, este proceso implica interaccionar con componentes de la MEC; se conoce que la fibronectina es considerada como el mayor componente de ésta, y se encuentra involucrada en la adherencia a células epiteliales por diversos microorganismos. En otros estudios realizados con trofozoítos de *N. fowleri*, por ensayos de adhesión a fibronectina y análisis por microscopía de fluorescencia se reportó la formación de placas de actina y de adhesiones focales, observando que esta proteína puede estar implicada en la adhesión de los trofozoítos a la MEC. La formación de placas de actina generalmente involucra integrinas y por ende vías de señalización río abajo, los autores investigaron las proteínas que podrían unirse a la fibronectina, para ello, marcaron fibronectina con HRP con lo que se detectó una banda proteica de 60 kDa como una proteína de unión a fibronectina y por análisis de western blot usando tres anticuerpos anti-integrinas humana ($\alpha 5/\text{FnR}$, αV y $\alpha 2$), se detectó una proteína de 60 kDa que reaccionó con el anticuerpo anti- $\alpha 5/\text{FnR}$ y otra proteína de 75 kDa que fue reconocida con el anticuerpo anti- αV (Fig. 6) (Han *et al.*, 2004).

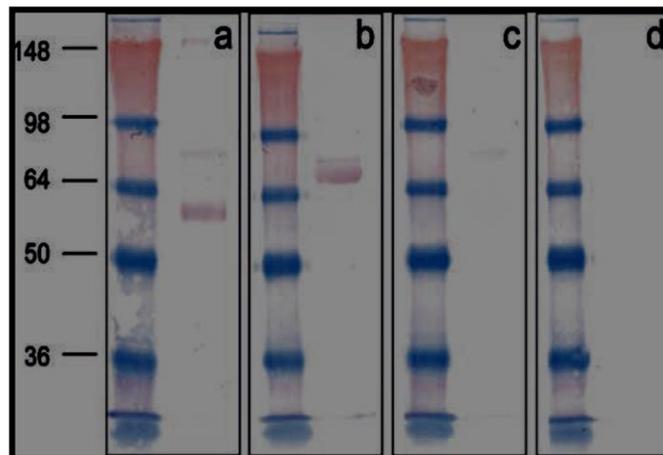


Figura 6. Identificación de dos proteínas similares a integrina en *N. fowleri*. (a) Se detectó anti-integrina $5\alpha/\text{FnR}$, (b) anti-integrina αV , y (c) anti-integrina $\alpha 2$, (d) IgG de ratón como control (Han *et al.*, 2004).

Con estos resultados se comprobó que la proteína de 60 kDa es similar a una integrina y que ésta se relaciona con la citotoxicidad a células CHO. Además se investigó el papel de la proteína cinasa C (PKC) en *N. fowleri*, observando un incremento en la actividad de fosforilación de PKC. Al tratarla con inhibidores de PKC, su actividad se disminuyó notablemente y por el contrario al tratarla con un activador de PKC se notó un incremento de la actividad. Estos resultados sugieren la presencia de una vía de transducción de señales en *N. fowleri* que puede operar en respuesta a fibronectina dependiente de un receptor similar a integrina (Han *et al.*, 2004). Más recientemente, otro grupo de investigación demostró que *N. fowleri* y *N. lovaniensis* presentan una capacidad diferente de adhesión a proteínas de la MEC, observando por ensayos de adhesión que *N. fowleri* presenta un mayor nivel de adhesión a laminina 1, fibronectina y colágeno I en comparación con *N. lovaniensis*. Además, se observó por microscopía electrónica de barrido que las amibas al exponerse a proteínas de la MEC exhiben lamelopodios y estructuras similares a complejos de adhesión focal. Por análisis de western blot de lisados totales de proteínas y de fracciones de proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri* obtenidas por el kit (Mem-PER eukaryotic) se reveló la presencia de dos proteínas similares a integrinas, una de 53 kDa y la otra de 70 kDa que tuvo una mayor expresión en *N. fowleri* (Fig. 7). La localización de estas integrinas en la superficie de los trofozoítos se comprobó por microscopía confocal y por ensayos de inhibición de la adhesión a ésta con un anticuerpo anti-integrina- β 1 (Jamerson *et al.*, 2012).

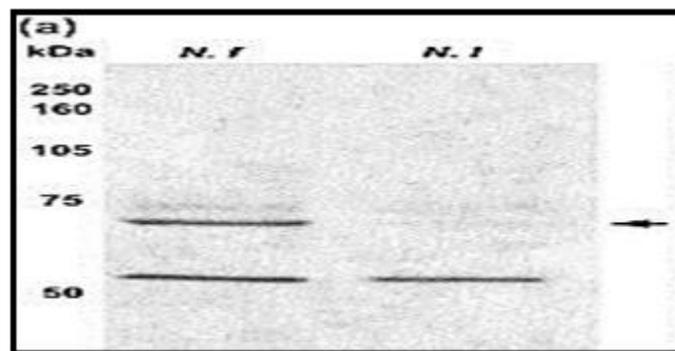


Figura 7. Análisis de western blot de *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. (a) Lisados totales de trofozoítos de *N. fowleri* (*N. f*) y *N. lovaniensis* (*N. l*) para la detección de proteínas similares a integrina (Jamerson *et al.*, 2012).

Poco se conoce sobre las moléculas implicadas en el proceso de adhesión en *N. fowleri*; sin embargo, se han realizado estudios encaminados en conocer más detalladamente este proceso. Por lo que se han realizado estudios sobre las diferencias entre *N. fowleri* y *N. gruberi* en la expresión de glicoconjugados presentes en la superficie de las amibas utilizando ensayos bioquímicos y funcionales. Los autores observaron por análisis de citometría de flujo que *N. fowleri* presenta mayores niveles en su superficie de α -D-manosa, α -D-glucosa y α -L-fucosa en comparación con *N. gruberi*. Por análisis de western blot utilizando lectinas biotiniladas, se encontraron diferencias significativas en la expresión de glicoproteínas de aproximadamente 63, 51, 40, 38, 14, 10 y 5 kDa reconocidas por concanavalina A y que presentaron una marca intensa en *N. fowleri* y no así en *N. gruberi*. Sin embargo, para *N. gruberi* se reconocieron glicoproteínas de 130, 85, 70, 55, 29 y 24 kDa. Mientras que al utilizar *Tetragonolobus purpurea* que reconoce residuos de fucosa se observaron glicoproteínas de 63, 55, 50, 40, 38, 32, 29, 26 y 10 kDa para *N. fowleri*, en contraste con *N. gruberi* que expresó glicoproteínas de 85, 55, 48, 36, 34, 29, 26 y 24 kDa. Por otro lado, al realizar ensayos de inhibición de la adhesión y de citotoxicidad a células MDCK se observó que los glicoconjugados que contienen manosa y fucosa probablemente participan en la adhesión y el daño producido por esta amiba (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010). Recientemente, se corroboró *in vivo* que los glicoconjugados con residuos de α -D-manosa de *Naegleria fowleri* están implicados en la adhesión de los trofozoítos a la mucosa nasal, esto se determinó al realizar ensayos de mortalidad en ratones Balb-c a los que se les inocularon trofozoítos previamente incubados con lectinas específicas para manosa, esto debido a que se bloquearon los residuos de carbohidratos inhibiendo la adhesión por parte de los trofozoítos, por lo que los autores reportan un aumento de la sobrevivencia de los ratones hasta en un 40%. Los autores concluyeron que efectivamente los residuos de manosa están involucrados en el proceso de adhesión (Carrasco-Yépez *et al.*, 2013). Para diferenciar las glicoproteínas que contienen manosa de las que contienen residuos de glucosa de los extractos totales de *N. fowleri*, los glicoconjugados con residuos de manosa se purificaron por cromatografía de afinidad usando una columna de

sefarosa-manosa. El análisis de western blot de las moléculas eluidas mostró 11 glicoproteínas reconocidas por *C. ensiformis* y 12 por *G. nivalis* y *P. sativum*. Los glicoconjugados reconocidos por *C. ensiformis* en *N. fowleri* por cromatografía de afinidad se dividieron en dos categorías: los que anteriormente ya se habían encontrado (210, 108, 68, 60 y 41 kDa) y los que aparentemente se encontraron por vez primera (98, 96, 56, 55 y 44 kDa). Los que fueron reconocidos por *G. nivalis* en *N. fowleri* fueron divididos de igual forma (288, 210, 60, 58 y 44 kDa) y (108, 98, 68 y 55 kDa) (Carrasco-Yépez *et al.*, 2013). En resumen, todos estos estudios nos muestran que hasta el momento poco se conoce sobre las moléculas involucradas en el proceso de adhesión que *N. fowleri* establece con su célula blanco y hasta el momento no existe una proteína o proteínas que ejerzan el papel de adhesinas permitiendo el contacto con las células del neuroepitelio olfatorio, por lo que en futuros trabajos se pretende trabajar en resolver dicha interrogante y realizar estudios funcionales que nos permitan conocer a ciencia cierta que proteínas están involucradas en la adhesión de *N. fowleri* a su célula blanco.

II. Justificación

La amiba de vida libre *Naegleria fowleri* es el agente etiológico de la MAP, una enfermedad mortal que afecta el sistema nervioso central. Se sabe que durante un proceso infeccioso ocurren diferentes mecanismos de patogenicidad, la adhesión a las células del huésped es un evento temprano importante para el desarrollo de la enfermedad. A la fecha no existen trabajos que demuestren proteínas de membrana de *N. fowleri* involucradas en el proceso de adhesión al neuroepitelio olfatorio. Debido a lo anterior es de nuestro interés identificar proteínas que cumplan con el papel de adhesinas.

III. Hipótesis

Naegleria fowleri expresa glicoproteínas de membrana que participan en los mecanismos de adherencia.

IV. Objetivos

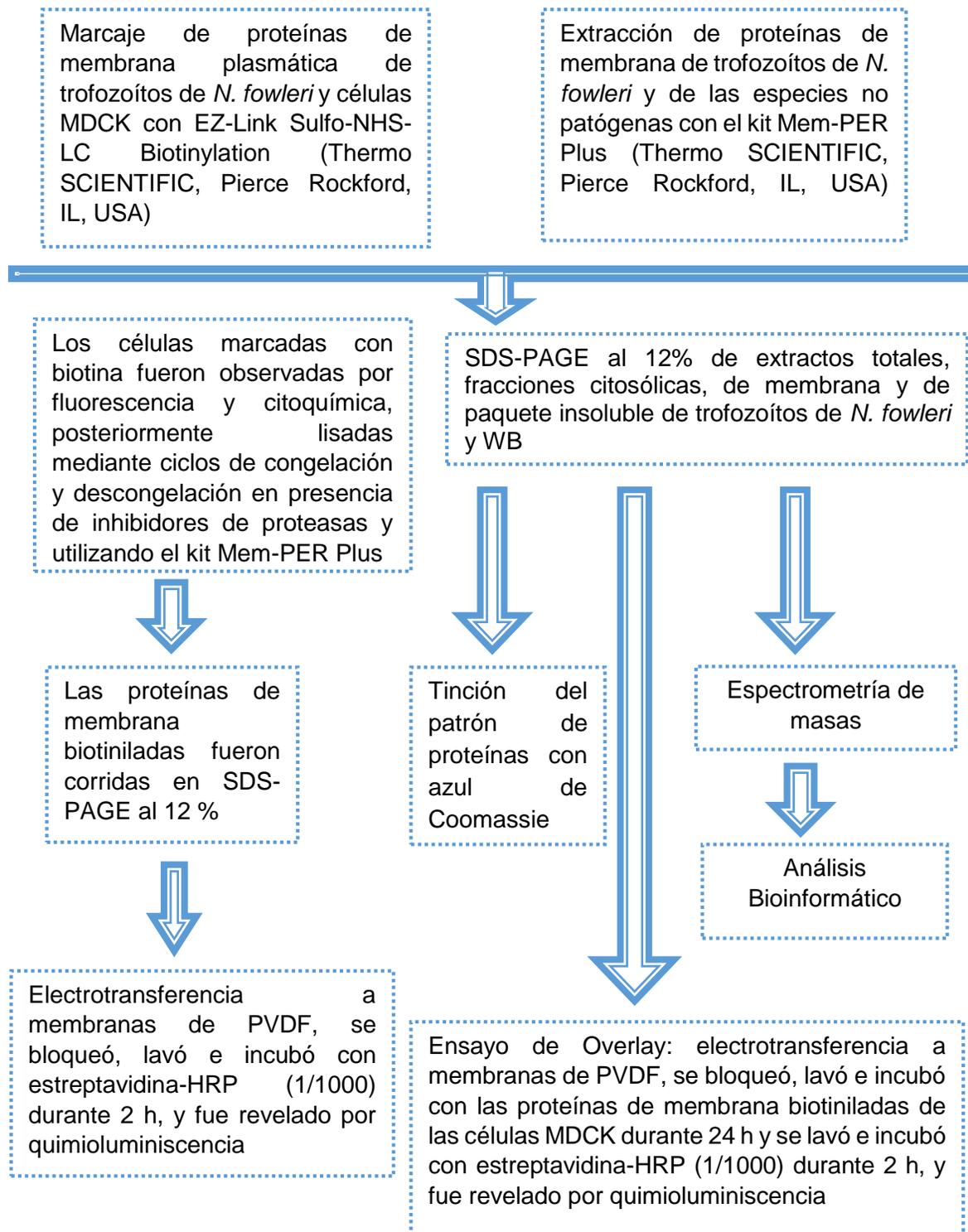
Objetivo general:

- Identificar proteínas de membrana plasmática de *N. fowleri*.

Objetivos específicos:

- Purificar proteínas de membrana plasmáticas de trofozoítos de *N. fowleri*.
- Identificar a algunas proteínas de membrana de *N. fowleri* y de las especies no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*).

V. Estrategia experimental



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI. Materiales y métodos

6.1. Cultivos amibianos

Los trofozoítos de la cepa de *Naegleria fowleri* ATCC 30808 y las cepas no patógenas *N. gruberi* y *N. lovaniensis* cultivadas en condiciones axénicas en medio líquido de bactocasitona al 2% (Becto Dickinson Detroit, Michigan, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Microlab SU440), a 37°C para *N. fowleri* y *N. lovaniensis* y a temperatura ambiente para *N. gruberi*. Los trofozoítos fueron utilizados en la fase logarítmica de crecimiento (48 h), el mantenimiento de la virulencia se realizó a través de la instilación de trofozoítos de *N. fowleri* en ratones de la cepa Balb-c.

6.2. Línea celular

Para realizar los ensayos overlay se utilizó la línea celular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), la cual se cultivó en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% a 37°C, en una atmosfera de CO₂ al 5%.

6.3. Marcaje de proteínas de membrana con biotina

Para realizar el marcaje específico de proteínas de membrana para los trofozoítos de *Naegleria* como para las células MDCK, se lavaron 3 veces con PBS y se cosecharon aproximadamente 2×10^7 trofozoítos y 1×10^7 células MDCK en PBS y en medio MEM, respectivamente. Los trofozoítos se despegaron de la caja de cultivo por incubación en hielo durante 30 min y las células MDCK por adición de tripsina-EDTA durante 15 min. Posteriormente, los trofozoítos y las células se incubaron por 1 hora con 2 mM de biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotinylation Kit; PIERCE, Rockford, IL, USA) disuelto en PBS con inhibidores de proteasas (0.1mM de inhibidor de proteasa cocktail Minicomplete, Roche) a temperatura ambiente con agitación constante. Posterior al marcaje las células se lavaron 3 veces con una solución de glicina 100 mM y PBS pH 8.0 en relación 1:2 para remover el exceso de reactivo de biotina y sus subproductos.

6.4. Ensayos de viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* biotinilados

Los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri* Se realizaron antes y después de ser biotinilados, para lo cual se utilizó el colorante vital azul tripano a partir de una solución stock al 2% (m/v) en PBS pH 7.2. Los trofozoítos se centrifugaron a 350 x g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante; del paquete celular se tomaron 12 µl que se colocaron en un portaobjetos y se añadieron 4 µl de la solución de azul tripano al 2%. Finalmente, se observaron las muestras en un microscopio de campo claro.

6.5. Detección citoquímica por peroxidasa y fluorescencia del marcaje de membrana de las células biotiniladas

Una pequeña cantidad de células biotiniladas se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS pH 7.2 durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave y constante, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.2 y en cada lavado se centrifugó a 350 x g durante 10 min. Posteriormente, se inhibió la peroxidasa endógena de las células (trofozoítos y células MDCK) utilizando metanol-H₂O₂ (460 µl-40 µl) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2 y las células se incubaron con avidina-HRP 1:100 por 1 h a temperatura ambiente. La reacción se reveló con diaminobenzidina-H₂O₂, (20 µl + 180 µl). Por último se lavó con PBS pH 7.2, 4 veces durante 5 min cada lavado y se tomó una alícuota de 12 µl para observar al microscopio óptico de campo claro a diferentes aumentos. Alternativamente, para detectar el marcaje de biotina por fluorescencia en las células se realizó la incubación con estreptavidina-FITC 1:100 en PBS pH 7.2 durante 1 h a temperatura ambiente y se observó por epifluorescencia y microscopia confocal (Leica 3TCSSP8).

6.6 Marcadores de superficie celular de trofozoítos de *N. fowleri*

La monocapa de trofozoítos de *N. fowleri* se lavó 3 veces con PBS pH 7.2, se despegaron en PBS por incubación en hielo durante 30 min, se centrifugó a 350 x g por 10 min. Los trofozoítos se fijaron durante 30 min con paraformaldehído al 2% a temperatura ambiente y con agitación suave, se lavó 3 veces con PBS pH 7.2, en cada lavado se centrifugó a 350 x g durante 10 min y se incubaron los trofozoítos

con las lectinas biotinizadas Concanavalina A (Con A) y *Tetragonolobus purpurea* (TPA) durante 1 h a 4°C. Las cuales previamente se biotinizaron (100 µg de lectinas con 1 mg de biotina) durante 1 h. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS pH 7.2 y fueron incubadas con estreptavidina-FITC 1-100 (fluorescencia) y con avidina-HRP 1:100 (citoquímica) por 1 h a temperatura ambiente, esta última reacción se reveló con diaminobenzidina-H₂O₂, (20 µl + 180 µl). Por último se lavó con PBS pH 7.2, dos veces durante 5 min cada lavado y se tomó una alícuota de 10 µl para observar al microscopio de epifluorescencia y campo claro a diferentes aumentos.

6.7 Extracción de proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri* y células MDCK utilizando el kit Mem-PER Plus

El medio de cultivo se eliminó por aspiración y se lavó la monocapa de células 3 veces con PBS pH 7.2. Posteriormente se cosecharon 2×10^7 trofozoítos y 1×10^7 células MDCK en presencia de PBS y medio MEM respectivamente; los trofozoítos se despegaron de la caja de cultivo por incubación en hielo durante 30 min y las células MDCK por adición de tripsina-EDTA durante 15 min. Las células en suspensión se centrifugaron a $350 \times g$ durante 10 min. Posteriormente al paquete celular se le adicionó 3 ml de la solución de lavado del kit Mem-PER Plus, y se centrifugó a $350 \times g$ durante 10 min, se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1.5 ml de la solución de lavado nuevamente, se centrifugó a $350 \times g$ durante 10 min, y se descartó el sobrenadante. Al paquete celular se le añadió 0.75 ml de amortiguador de permeabilización por cada 5×10^6 células, se homogenizó suavemente y se incubó durante 15 min a 4°C mezclándose constantemente. Las células permeabilizadas se centrifugaron durante 15 min a $16000 \times g$, se colectó el sobrenadante conteniendo proteínas citosólicas y se almacenaron a -86°C en presencia de inhibidores de proteasas para su posterior utilización. Al paquete celular se le adicionó 0.50 ml del amortiguador de solubilización por cada 5×10^6 células, y se resuspendió por pipeteo, se incubó durante 30 min a 4°C mezclándose constantemente y se centrifugó a $16000 \times g$ durante 15 min. Se colectó el sobrenadante con proteínas de membrana y se almacenaron a -86°C en presencia de inhibidores de proteasas. La cuantificación de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) (Jamerson et al, 2012).

6.8. SDS-PAGE al 12%

De las fracciones obtenidas de la extracción de proteínas de membrana, se utilizaron 40 µg de proteína, se añadió amortiguador Laemmli 5x y β-mercaptoetanol al 5%, las muestras se calentaron durante 5 min y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (8 ml de acrilamida al 30%, 5 ml amortiguador de pH 8.8, 7 ml H₂O desionizada, 100 µl de TEMED 8.4% y 200 µl de persulfato de amonio al 10%), con un tiempo de desarrollo electroforético de 15 min a 70 voltios para el gel concentrador y 3 h a 90 voltios para el gel separador, en presencia de amortiguador de corrida 1x (Trisma base 3.03 g, glicina 14.4 g, SDS 1 g y agua desionizada 1 L). Al término de la corrida electroforética el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 (Pierce, Rockford, IL, USA) toda la noche a temperatura ambiente.

6.9. Blot para proteínas biotiniladas y western blot de proteínas no biotiniladas

Los trofozoítos y las células MDCK marcados con y sin biotina se lisaron por 8 ciclos de congelación y descongelación; además, se obtuvieron las proteínas biotiniladas utilizando el kit Mem-PER Plus, en presencia de inhibidores de proteasas (cocktail inhibidores de proteasas Mini complete 0.1 mM: Roche). La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford. Posteriormente, las proteínas (40 µg de proteína por carril) se separaron por SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras, con un tiempo de desarrollo electroforético de 15 min a 70 voltios para el gel concentrador y 3 h a 90 voltios para el gel separador. Después, se realizó una electrotransferencia de las proteínas a membranas de PVDF durante 2 h a 400 mA. Una vez terminada la electrotransferencia las membranas se bloquearon durante toda la noche con leche Svelty al 7% disuelta en PBS a 4°C. Las proteínas biotiniladas de trofozoítos y células MDCK se detectaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, EUA.) a una dilución 1:1000 en PBS y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Las membranas se lavaron 6 con PBS-Tween (PBS-T) y las bandas reactivas se revelaron por quimioluminiscencia (Soto-Arredondo et al, 2014). Con las proteínas no biotiniladas de los trofozoítos y células MDCK se realizó la detección de actina, claudina 1 y GAPDH por WB con los anticuerpos correspondientes, las membranas

se lavaron 3 veces con PBS-T, y las bandas reactivas se revelaron por quimioluminiscencia.

6.10. Ensayos de overlay

Para los ensayos de Overlay primero se realizó SDS-PAGE al 12% utilizando 40 µg de proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri* sin biotinar, posteriormente se realizó una electrotransferencia de las proteínas a membrana de PVDF durante 2 h a 400 mA, al término se procedió a bloquear la membrana durante toda la noche con leche svelty al 7% en TBS-T a 4°C, y se realizaron 3 lavados con PBS-T. Posteriormente se incubó la membrana con las proteínas de la fracción membranal y extractos totales de células MDCK biotiniladas durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la membrana con TBS-T 3 veces durante 5 min cada lavado. Posteriormente, se incubó con estreptavidina-HRP a una dilución 1:1000 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó con PBS-T 6 veces durante 10 min cada lavado. Las bandas reactivas se revelaron por quimioluminiscencia.

VII. RESULTADOS

VII. Resultados

En el presente trabajo se utilizaron trofozoítos de la especie *Naegleria*, la especie patógena (*N. fowleri*) y las no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*), los cuales se cultivaron en condiciones axénicas y se cosecharon en fase log de crecimiento. El propósito de este estudio fue el de identificar proteínas de membrana que pudieran participar en el proceso de adhesión, debido a que este proceso es fundamental para el inicio de la infección y el desarrollo de la enfermedad.

Primeramente se procedió a realizar un marcaje que nos permitiera comprobar la esencia de glicoproteínas de membrana y así poder observar y tener como referencia la marca de proteínas a nivel de membrana plasmática. Para ello se utilizaron lectinas biotiniladas, ya que el empleo de éstas nos permite conocer que tipos de carbohidratos están presentes en las superficies de determinadas células y por lo tanto estar involucrados en las interacciones celulares.

7.1 Marcadores de superficie celular de trofozoítos de *N. fowleri*

Dado que *N. fowleri* presenta principalmente glicoconjugados de manosa, glucosa y fucosa en la superficie celular, se realizó un marcaje con lectinas que reconocen estos residuos; Con A (Fig. 8B) y TPA (Fig. 9B). La detección de las glicoproteínas al ser reconocidas por estas lectinas se presentó en la región cortical de la membrana plasmática, ya que se pudo observar en esta área una fuerte reacción al incubar con el fluorocromo FITC. Sin embargo, también se observó la marca fluorescente en parte del citoplasma de las amibas, a pesar de que al realizar el marcaje de los trofozoítos con lectinas y con la biotina nunca se permeabilizaron las células. De acuerdo a estos resultados, posiblemente *N. fowleri* presente en su citoplasma glicoproteínas y que la membrana plasmática sea semipermeable permitiendo el paso de las lectinas que las están reconociendo. Por otra parte, se observó la presencia de parches y agregados fluorescentes en la membrana de los trofozoítos lo que nos indica que existe una distribución heterogénea de las glicoproteínas en la membrana de este protozoario. Estos parches pueden deberse a la formación de casquetes en la membrana plasmática de los trofozoítos.

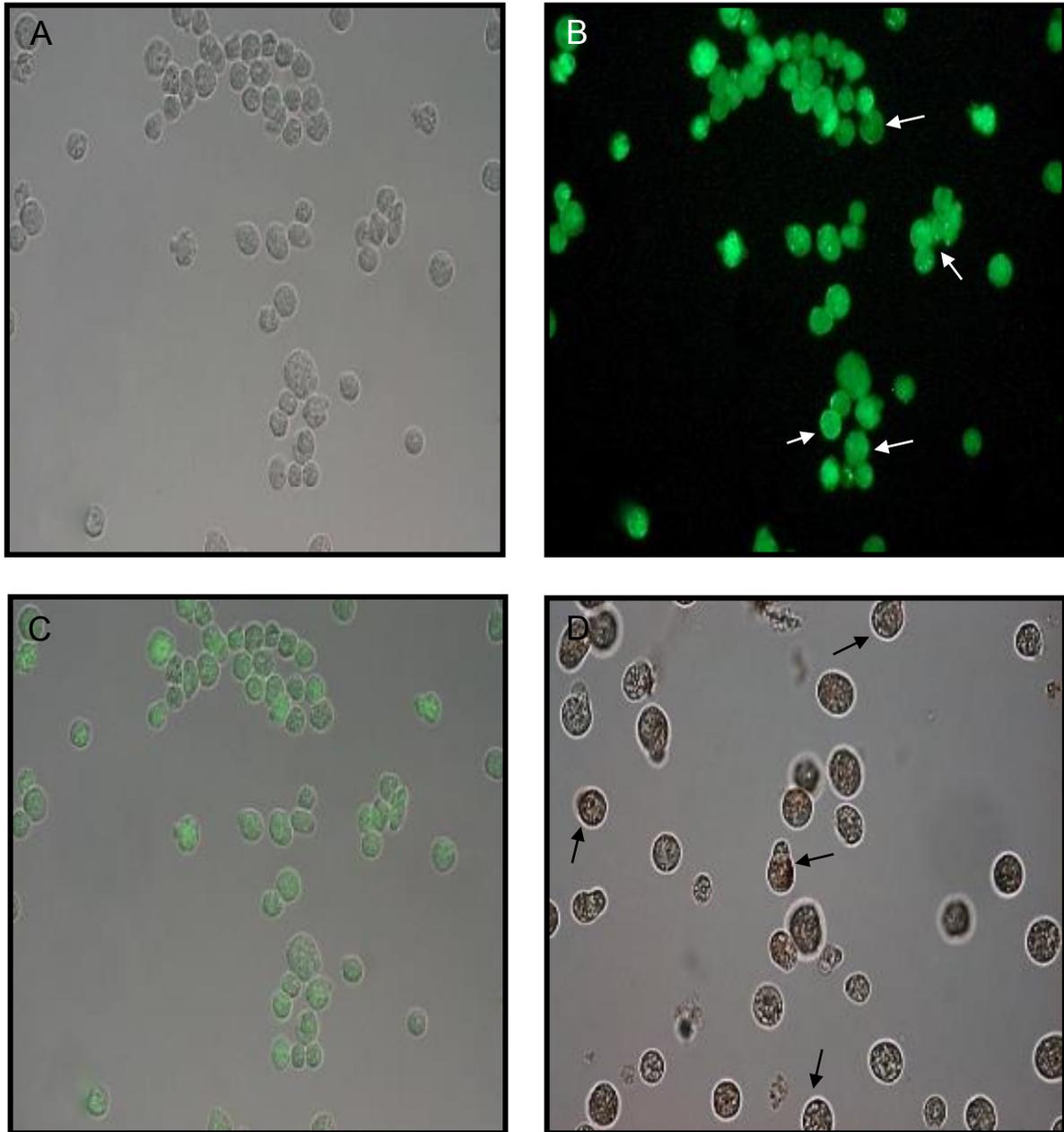


Fig. 8. Detección de glicoconjugados de manosa y glucosa en trofozoítos de *N. fowleri*. (A) trofozoítos en campo claro, (B) fluorescencia de trofozoítos marcados con Con A acoplada a FITC, donde se puede observar el marcaje en la membrana (flechas blancas). (C) merge del campo claro y fluorescencia, (D) citoquímica revelada con peroxidasa (flechas negras) 40x.

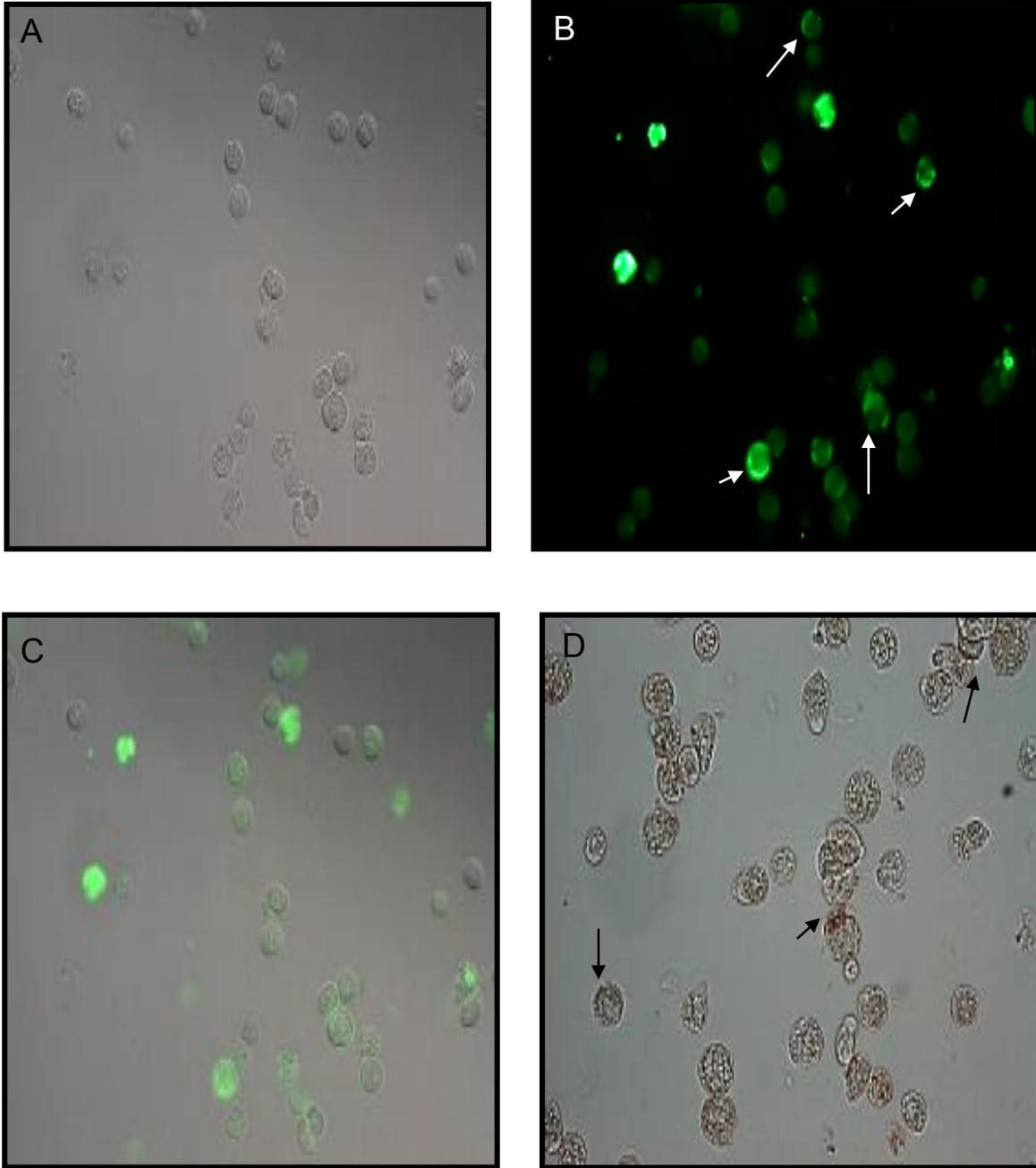


Fig. 9. Detección de glicoconjugados de fucosa en trofozoítos en *N. fowleri*. (A) trofozoítos en campo claro, (B) fluorescencia de trofozoítos marcados con TPA, se puede observar la marca en la membrana (flechas blancas). (C) merge del campo claro y fluorescencia, (D) citoquímica revelada con peroxidasa (flechas negras) 40x.

Como se puede observar en las imágenes, la fluorescencia en presencia de Con A es mayor que con TPA, lo que nos indica que *N. fowleri* presenta una mayor cantidad de manosas y glucosad en su superficie, en contraste a lo observado con TPA, lo que concuerda con lo reportado previamente (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010). Es importante mencionar, que basándonos en el conocimiento de la membrana plasmática de toda célula eucariota, se pensó en un principio que la marca sería visible solo en la periferia de los trofozoítos, sin embargo, dicha marca se observó también en el citoplasma celular. Lo que nos sugiere que posiblemente la composición lipídica y la estructura de la membrana plasmática de *N. fowleri* no sea del todo similar a una membrana plasmática de una célula eucarionte típica.

7.2 Biotinilación de las proteínas de membrana plasmática de los trofozoítos de *N. fowleri* y de las cepas no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*)

Con la finalidad de identificar proteínas y glicoproteínas de membrana de la especie patógena (*Naegleria fowleri*) se realizó el marcaje de los trofozoítos con biotina. Adicionalmente, se realizó el mismo marcaje en las especies no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*) en búsqueda de diferencias, posiblemente relacionadas con su patogenicidad y virulencia. Los trofozoítos biotinilados se fijaron con paraformaldehído al 2% y se incubaron con estreptavidina-FITC. Las amibas biotiniladas morfológicamente presentan el patrón ameboideo característico con emisión de pseudópodos que al momento de fijarse quedaron expuestos y se encontraban en movimiento, incluso en estos hay ausencia de fluorescencia y/o coloración café en la reacción de peroxidasa. Por otro lado, se pudo observar una clara reacción de fluorescencia en toda la membrana y pequeños agregados que en muchas células se relocalizan en un solo lado de las amibas, indicando una heterogeneidad en la distribución de la proteínas o incluso relocalización de éstas, sugiriéndose la formación de “capping” (Fig. 10B). Al analizar estos resultados, se procedió a confirmar lo observado, por peroxidasa los resultados fueron similares (Fig. 10D). Es importante mencionar que el 97% de los trofozoítos fueron positivos al marcaje en la superficie. Para confirmar estos resultados se realizaron estudios por microscopia confocal y mediante cortes ópticos se observó la marca de

fluorescencia a nivel de la superficie de los trofozoítos. Donde de manera similar a lo observado por microscopia de epifluorescencia se observan regiones de la membrana más fuerte marcadas, sugiriendo la relocalización de proteínas y formación de “capping” y probablemente endocitosis (Fig. 10C). Es importante mencionar que al realizar los controles negativos sin exposición a biotina, como se había esperado no se observó ninguna marca fluorescente o café en ninguno de trofozoítos de las tres especies a nivel de microscopía (datos no mostrados), estos resultados avalan la especificidad del marcaje realizado con biotina en la superficie de las amibas.

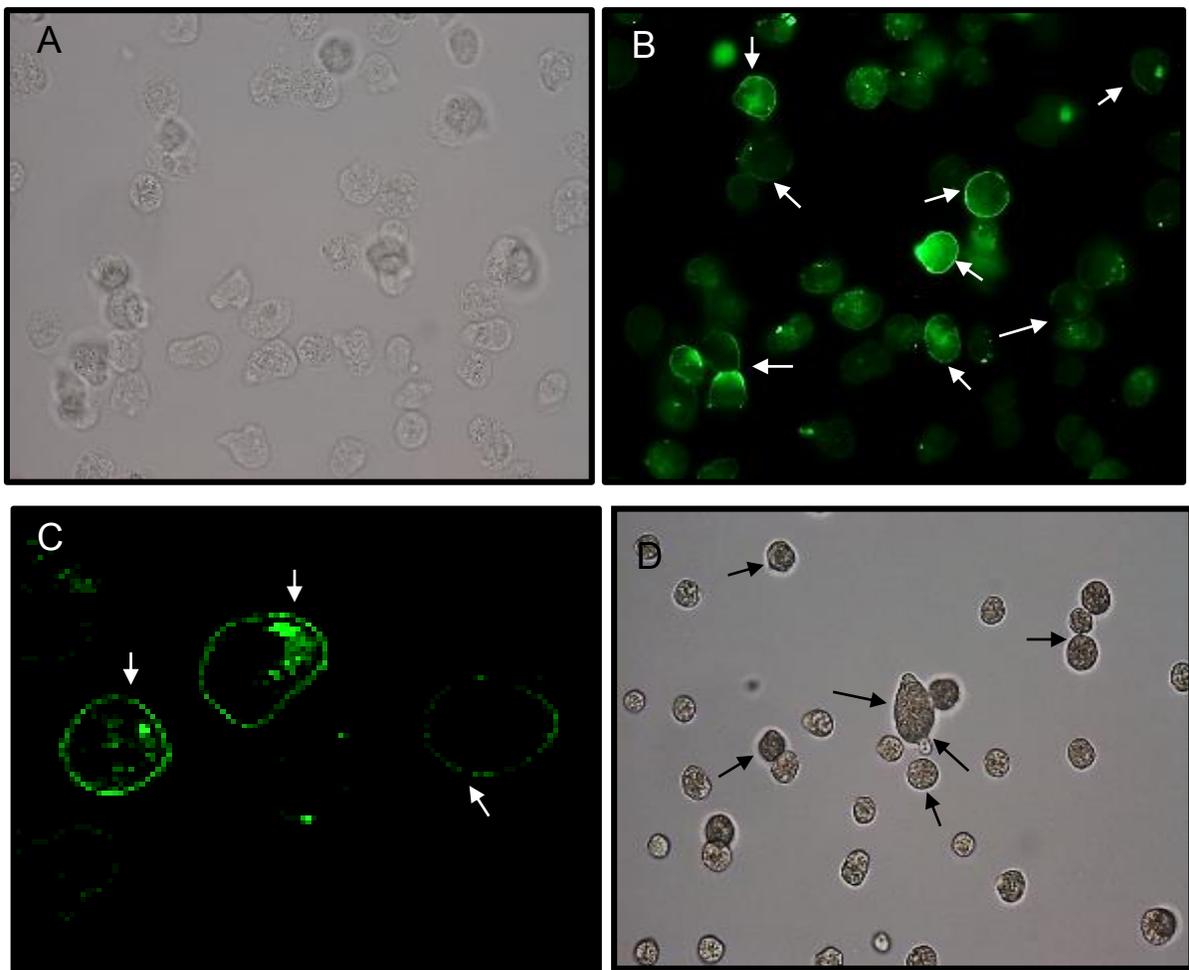
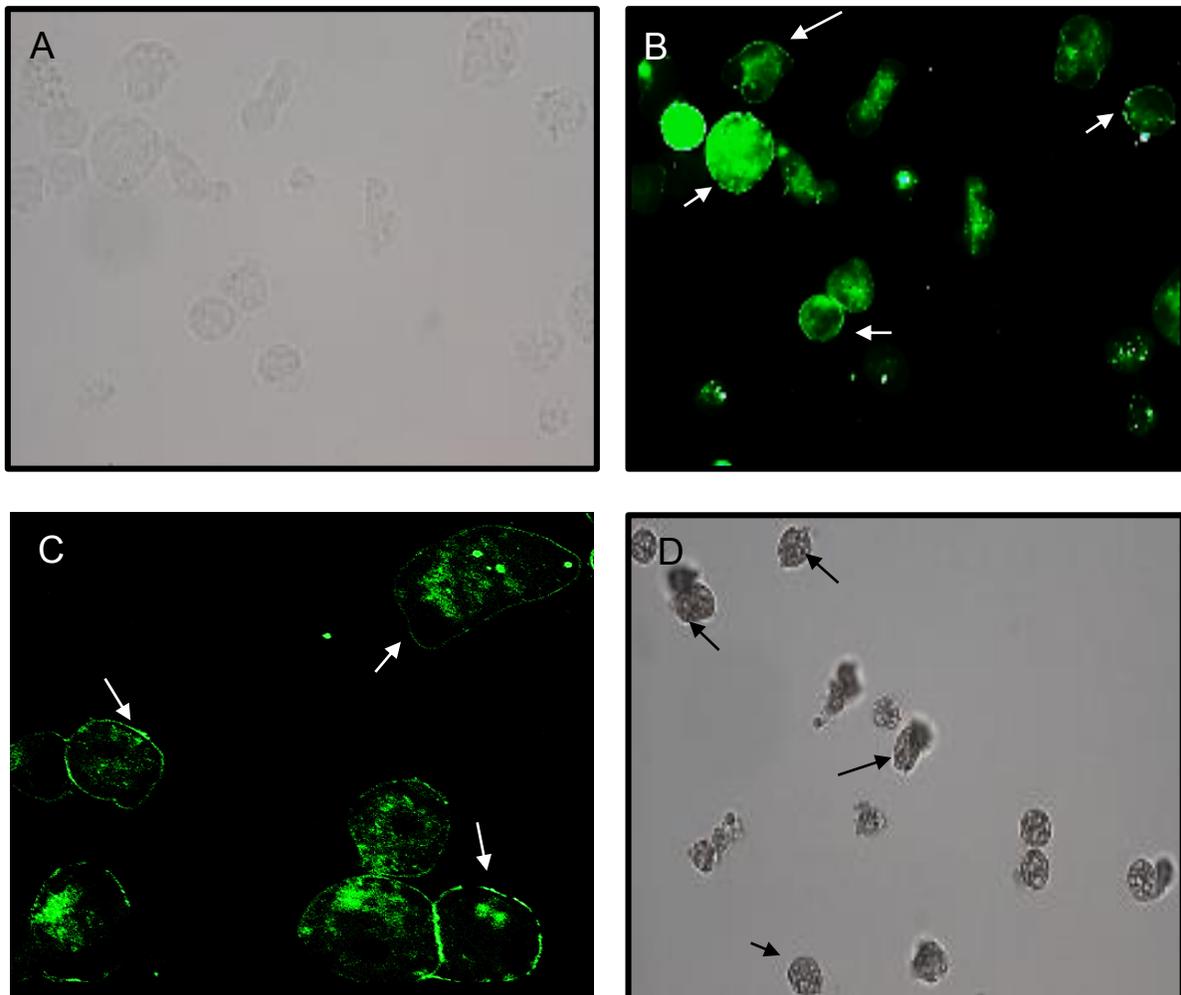


Fig. 10. Trofozoítos de *N. fowleri* marcados con biotina. (A) trofozoítos en campo claro, (B) fluorescencia de los trofozoítos marcados con biotina y revelados con estreptavidina-FITC, donde se observa la fluorescencia en la membrana de los trofozoítos (flechas blancas). (C) microscopía confocal de los trofozoítos marcados en la superficie con biotina (flechas blancas. 63x zoom 1).

Al analizar lo que se observó al marcar con biotina las proteínas de membrana de los trofozoítos de *N. fowleri*, también nos interesó conocer el mismo procedimiento en trofozoítos de las especies no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*). Estos experimentos se realizaron para conocer si existen diferencias en la membrana plasmática y poder observarlas a nivel de microscopía. Al analizar estos resultados se pudo observar la presencia de marca fluorescente en la membrana y fue más evidente en los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* que para *N. lovaniensis*, en la que se observó una fluorescencia menor a nivel de la superficie y una mayor marca a nivel de citoplasma (Fig. 11). Sin embargo, al compararla con la de las células eucariontes superiores, en éstas se observa claramente la marca fluorescente en la superficie de las células, estas diferencias posiblemente se deban a la estructura y naturaleza química de la membrana plasmática en estas amibas, y posiblemente se deba a que *N. lovaniensis* este fagocitando o endocitando la biotina (Fig. 11C).



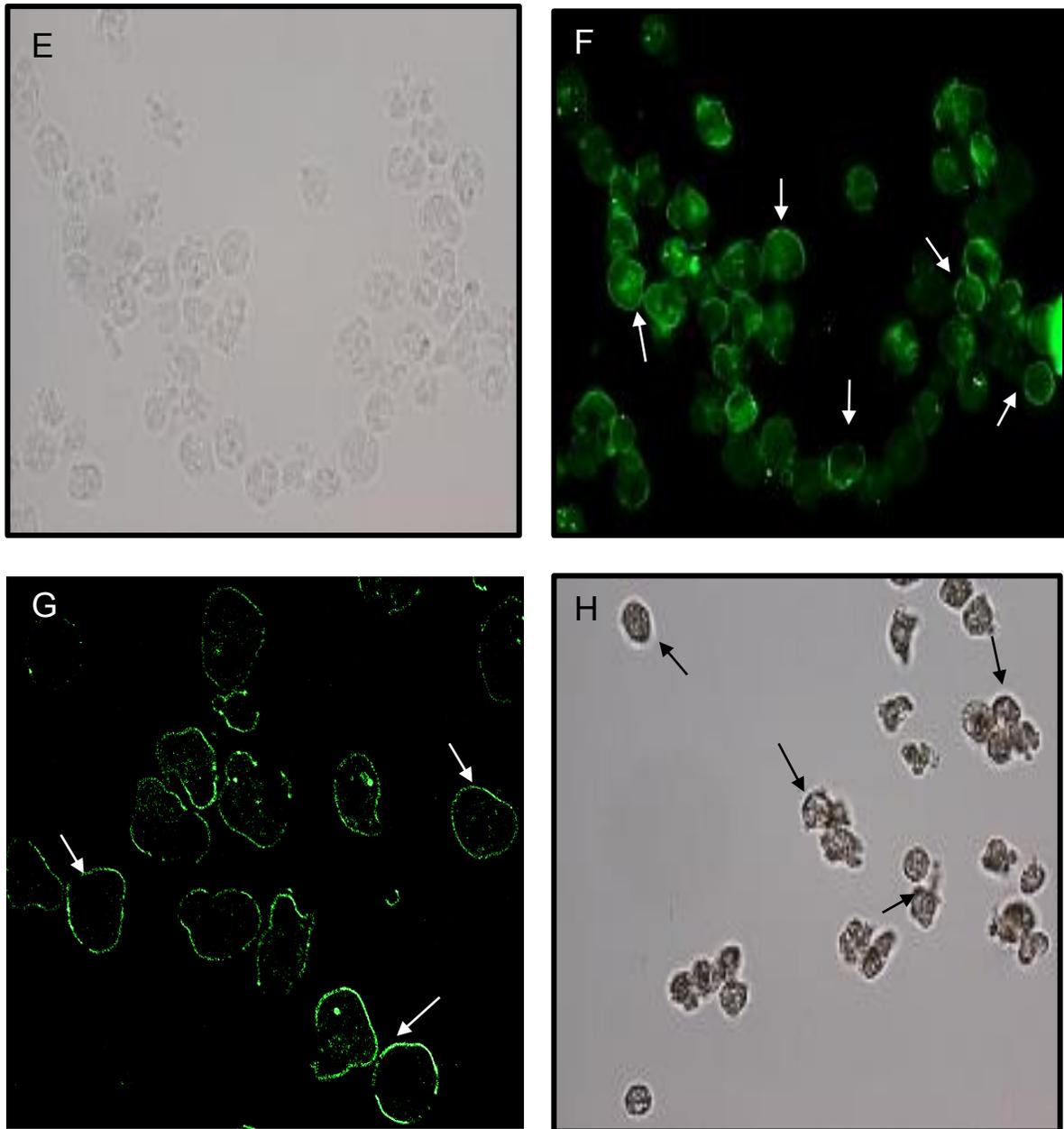


Fig. 11. Trofozoítos de las especies no patógenas de *Naegleria* marcados con biotina. (A) trofozoítos de *N. lovaniensis* en campo claro, (B) fluorescencia de trofozoítos de *N. lovaniensis* marcados con biotina y revelados con estreptavidina-FITC, donde se observa la fluorescencia en la membrana de los amibas (flechas blancas). (C) microscopía confocal de trofozoítos marcados con biotina, (D) citoquímica por peroxidasa de trofozoítos de *N. lovaniensis* marcados con biotina (flechas negras). (E) trofozoítos en campo claro de *N. gruberi*, (F) fluorescencia de los trofozoítos de *N. gruberi* revelados con estreptavidina-FITC, donde se observa marca en la membrana (flechas blancas), (G) microscopía confocal de los trofozoítos marcados con biotina (flechas blancas, 63x zoom 1). (H) citoquímica con peroxidasa de trofozoítos marcados con biotina (flechas negras) 60x.

7.3 Ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri*

Para verificar que la incubación con biotina no afecta la viabilidad celular antes y después del tiempo de incubación con la biotina (1 h) se realizaron ensayos de viabilidad por exclusión del colorante vital azul tripano, observando que las amibas sin biotinar presentaron un porcentaje de viabilidad por arriba del 97%. Posterior a la incubación con la biotina la viabilidad disminuyó a un 87% (Fig. 12 A, B). A nivel microscópico se observó una morfología irregular con emisión de pseudópodos y un aumento en la formación de pequeños gránulos en el citoplasma de la célula.

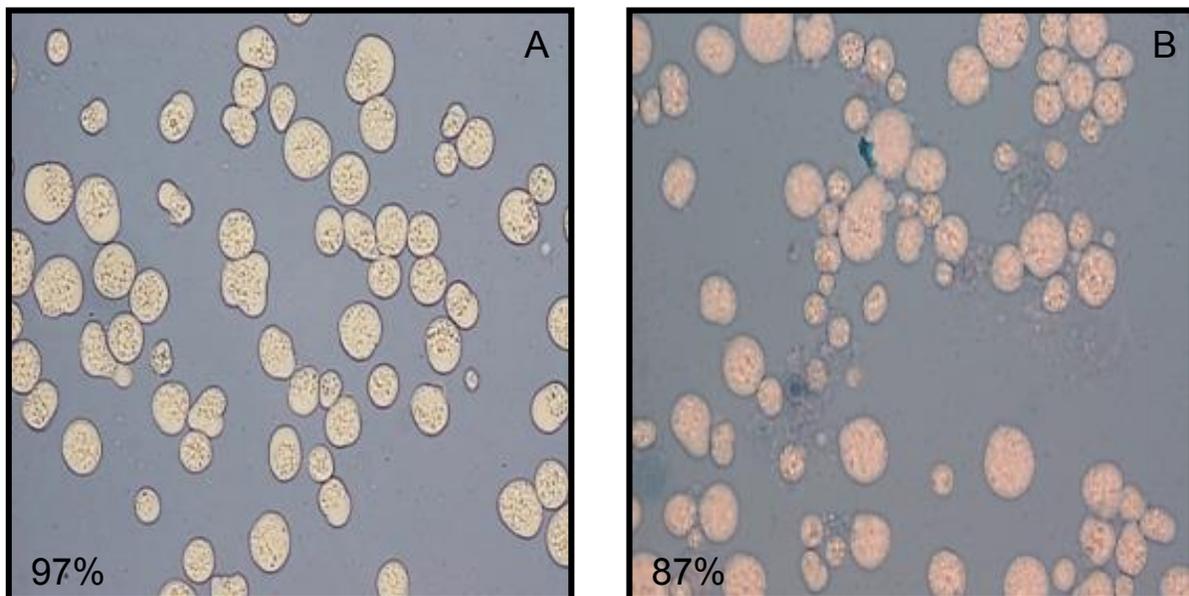


Fig. 12. Ensayos de viabilidad con azul tripano de los trofozoítos de *Naegleria*. (A) Trofozoítos de *N. fowleri* no biotinilados, 97%, (B) trofozoítos de *N. fowleri* biotinilados, se observa una viabilidad del 87%, 60x.

7.4 Biotinilación de las proteínas de membrana de células MDCK

Las proteínas de membrana de las células MDCK se biotinilaron, se determinó la viabilidad celular con azul tripano obteniéndose un 98% de viabilidad. La morfología de las células MDCK en suspensión se observó de manera circular y de forma irregular con pequeñas prolongaciones en la superficie, posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y la marca se detectó por incubación con estreptavidina-FITC (Fig. 13B). Se observó la fluorescencia en la membrana de las células. Adicionalmente, para confirmar la marca de superficie se realizó microscopia confocal, y se corroboró que el marcaje se presenta de manera específica a nivel de la membrana plasmática en las células MDCK (Fig. 13 C D, E, F); Además, al analizar la morfología celular por microscopia confocal se observan microvellosidades presentes en estas células. Por otro lado, cabe mencionar que se aprecian zonas de mayor fluorescencia localizada a una parte de la célula, este patrón es similar al observado en las amibas, por lo que se puede tratar de proteínas con distribución heterogénea en la superficie celular. Con estos resultados podemos comprobar que el marcaje con biotina se realizó de forma adecuada, ya que el 100% de las células fueron positivas al detectarlas con el sistema estreptavidina-FITC.

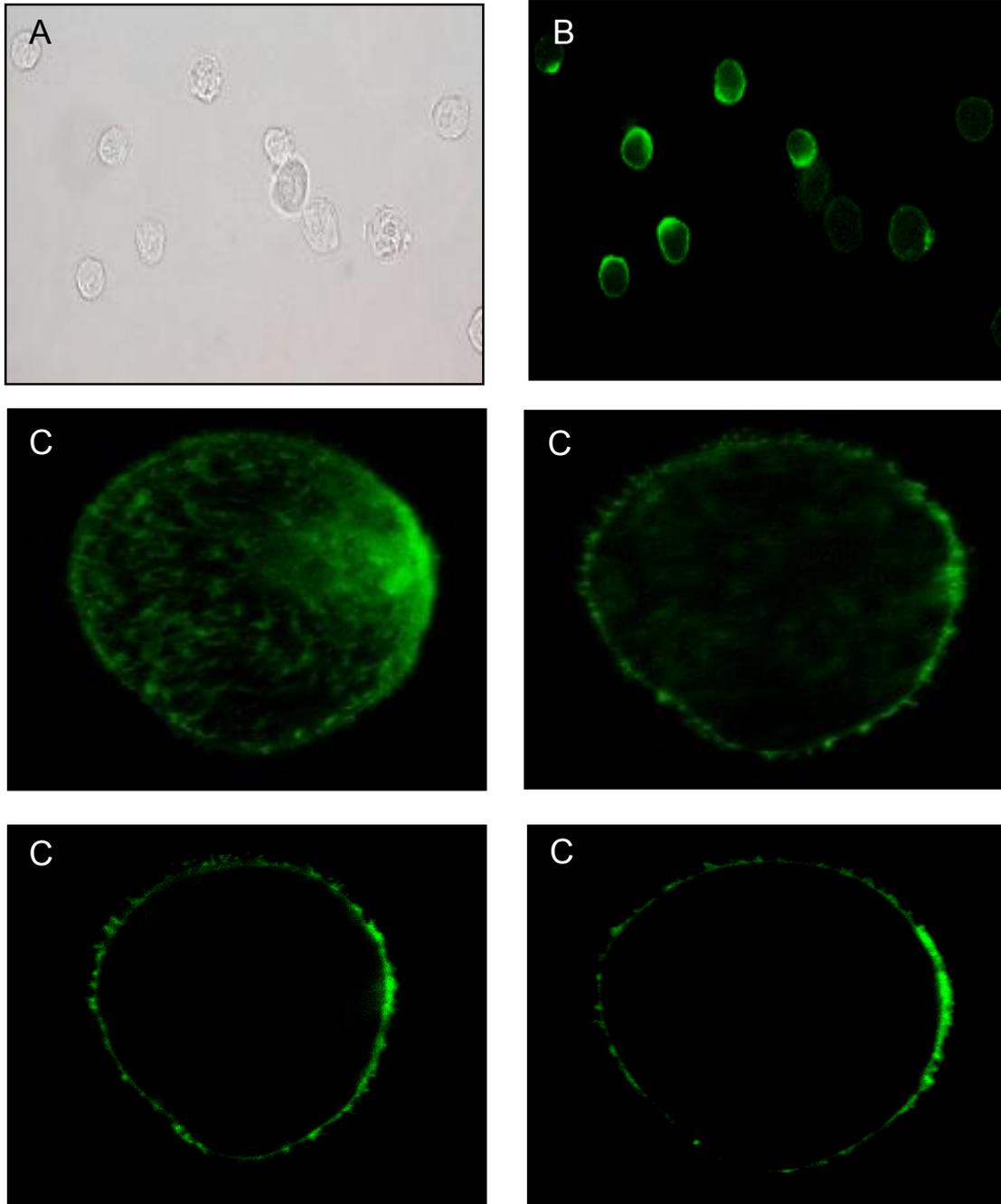


Fig. 13. Ensayos de microscopia de epifluorescencia y de microscopia confocal para la detección de la marca de biotina en células MDCK. (A) Células MDCK biotiniladas en campo claro, (B) fluorescencia de células MDCK reveladas por estreptavidina-FITC, 60x. (C, D, E y F) cortes ópticos por microscopia confocal de células MDCK biotiniladas (63x Zoom 3).

7.5 Purificación de proteínas de membrana de células MDCK

Con el objetivo de probar la efectividad y pureza del kit, se realizó la purificación y enriquecimiento de las proteínas de membrana de células MDCK utilizando el kit de purificación Mem-PER Plus, que separa las fracciones proteicas de citoplasma y de membrana de las células. Además, se realizaron extractos totales de las células MDCK que permitió observar las diferencias entre cada una de las fracciones proteicas. Al final se obtuvo un paquete celular insoluble al detergente el cual se homogenizó manualmente. Todas estas fracciones, se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras el cual se tiñó con azul de Coomassie (Fig. 14). El patrón proteico de interés para este trabajo se centró en las proteínas de la membrana plasmática, que son éstas con las que *N. fowleri* podría establecer contacto y en las cuales se obtuvo una pureza de aproximadamente 90% como lo marca el productor del mismo. Además, en ésta fracción proteica se observaron principalmente bandas de 30-150 kDa. Por otro lado, al realizar este fraccionamiento proteico se corroboró la eficiencia del kit. Dichos resultados nos sirvieron para proceder a realizar la purificación de las proteínas de membrana de los trofozoítos de las diferentes especies de *Naegleria*.

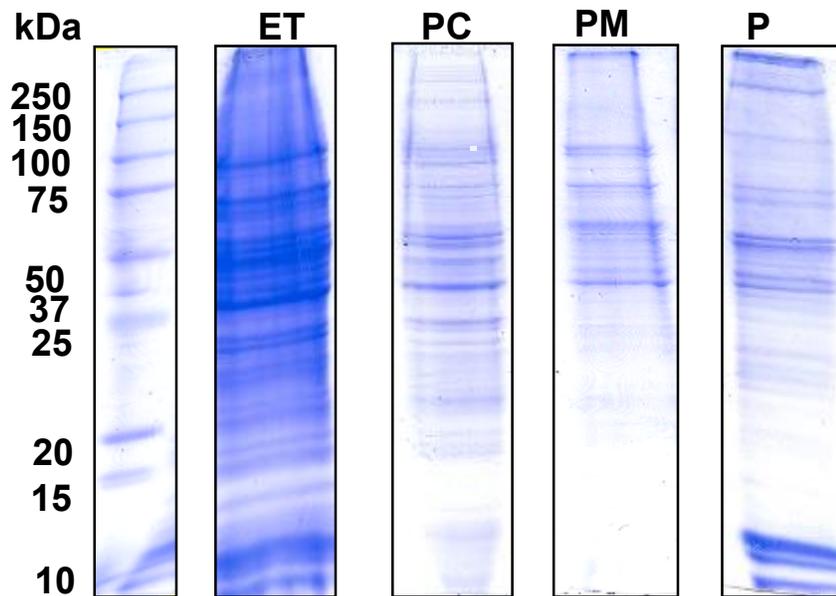


Fig 14. SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie de las fracciones proteicas purificadas a partir de células MDCK. ET: Extracto total de proteínas, PC: Proteínas de citosol, PM: Proteínas de membrana y pastilla final.

Para corroborar la pureza de cada fracción proteica y que el enriquecimiento fue el correcto, se realizaron ensayos de western blot para proteínas específicas de citoplasma y membrana plasmática. Por lo que se utilizaron anticuerpos contra actina que es una proteína citoplasmática y contra claudina-1 que es una proteína integral de membrana con cuatro regiones transmembranales. Estas proteínas se utilizaron como controles positivos que avalan la pureza de las fracciones celulares. En los ensayos de western blot (Fig. 15) se observó reactividad con la actina de forma más marcada en el extracto total de proteínas y en la fracción de proteínas de citoplasma. Por el contrario, para claudina-1 se observó mayor reactividad en las fracciones de las proteínas de membrana, en la fracción de la pastilla insoluble y en el extracto total de proteínas. Con estos resultados se comprobó la pureza del fraccionamiento de las proteínas de membrana.

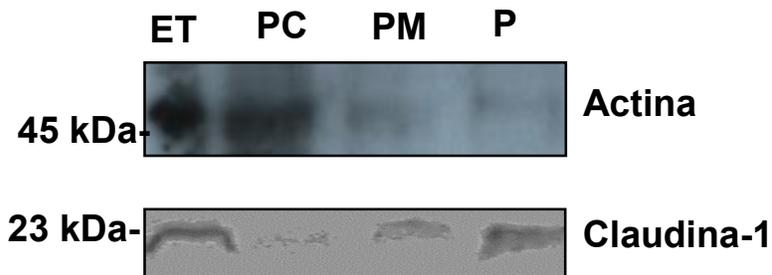


Fig. 15. Análisis de western blot para actina y claudina-1 de células MDCK.
 ET: Extracto total de proteínas, PC: Proteínas de citosol, PM: Proteínas de membrana y pastilla final.

7.5 Purificación de proteínas de membrana de trofozoítos de *Naegleria*

Posteriormente, se procedió a fraccionar y purificar las proteínas de membrana a partir de trofozoítos de *N. fowleri* (Fig. 16). Como referencias se cuenta con algunos trabajos publicados donde reportan el empleo de este kit para *N. fowleri*. Al realizar la electroforesis en condiciones reductoras se observó una clara separación de las proteínas de membrana, donde se encontraron bandas de proteínas con pesos relativos de 20, 23, 27, 47, 49, 60, 70, 75, 100 y 250 kDa. Al analizar dicho patrón proteico y al compararla con las fracciones de las especies no patógenas, se observó que las bandas con pesos de 22, 23, 27, 47 y 49 kDa se presentaron de forma más marcada en la fracción de membrana de *N. fowleri* (asteriscos). La pureza del fraccionamiento se validó por western blot contra una enzima citosólica que participa en la glucólisis denominada gliceraldehído 3 fosfatodeshidrogenasa (GAPDH) (Fig. 17) conservada en diferentes organismos, y que está presente en este protozoario. Por western blot se observó una mayor reactividad y presencia de esta proteína en las fracciones de extracto total de proteínas y en la fracción de proteínas de citoplasma como se esperaba.

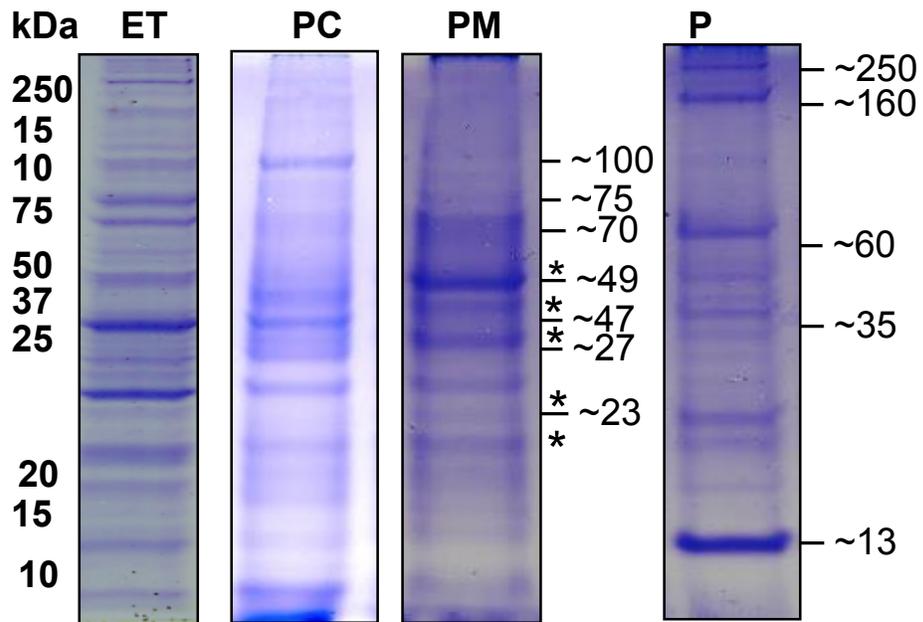


Fig. 16. SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie de las fracciones proteicas purificadas a partir de trofozoítos de *N. fowleri*. ET: Extracto total de proteínas, PC: Proteínas de citosol, PM: Proteínas de membrana y pastilla final.



Fig. 17. Análisis de western blot para GAPDH de trofozoítos de *N. fowleri*. ET: Extracto total de proteínas, PC: Proteínas de citosol, PM: Proteínas de membrana y pastilla final.

Alternativamente, también se purificaron las proteínas de membrana de las especies no patógenas (*N. lovaniensis* y *N. gruberi*) (Fig. 18 A, B), con cada una de las fracciones se desarrollaron geles de poliacrilamida en busca de diferencias en el perfil proteico de membrana entre las tres especies de *Naegleria*, esto nos permitiría poder sugerir que estas diferencias pudieran estar involucradas con la patogenicidad y virulencia de *N. fowleri*. Al analizar el perfil proteico de las proteínas de membrana entre las tres especies de amibas se pueden observar claras diferencias entre ellas. Comparando las proteínas de membrana de *N. fowleri* contra las de *N. lovaniensis* se observan bandas de forma más marcada con pesos relativos de 49, 27, 23 y 21 kDa para *N. fowleri*, mientras que para *N. lovaniensis* se presentan bandas de 97, 50 y 25 kDa que aparentemente se presentan en mayor proporción. Del mismo modo, al comparar *N. fowleri* con *N. gruberi* se presentan bandas diferenciales de 49, 47, 27, 23 y 22 kDa y de 55, 54, 53, 52 y 50 kDa, respectivamente (Tabla 1). Sin embargo, es importante mencionar que algunas de estas bandas pueden ser compartidas, y solo su expresión sea diferencial entre especies.

Tabla 1: Comparación de las bandas proteicas presentes en la fracción de membrana entre los trofozoítos de <i>Naegleria</i>	
<i>N. fowleri</i>	<i>N. lovaniensis</i>
49	97
27	50
23	25
21	
<i>N. fowleri</i>	<i>N. gruberi</i>
49	55
47	54
27	53
23	52
22	50

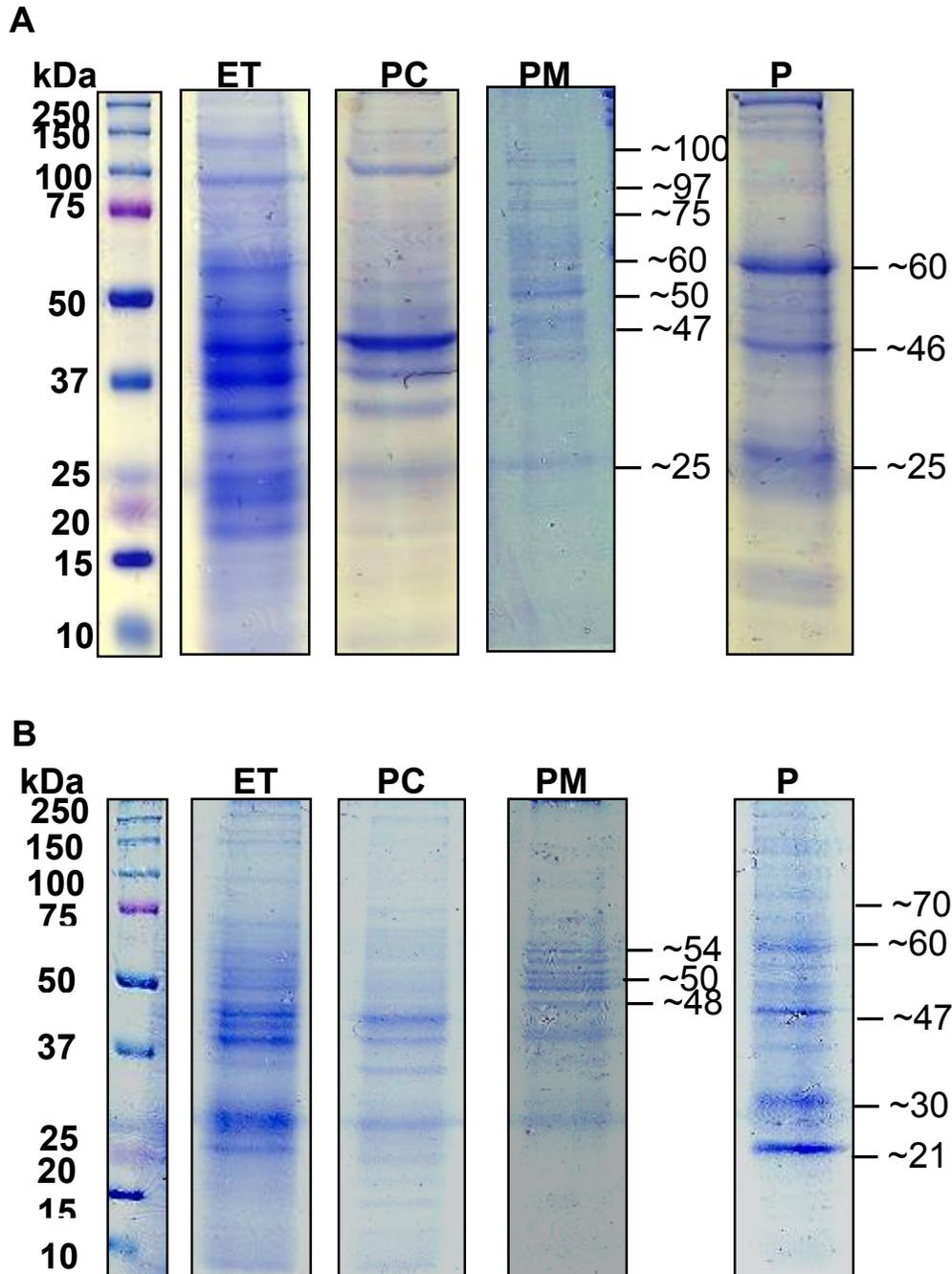


Fig. 18. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de las fracciones proteicas purificadas a partir de trofozoítos de las especies no patógenas de *Naegleria*. (A) Fraccionamiento proteico a partir de trofozoítos de *N. lovaniensis* (B) y de *N. gruberi*. ET: Extracto total de proteínas, PC: Proteínas de citosol, PM: Proteínas de membrana y pastilla final.

Para disminuir el porcentaje de error que se produce al realizar electroforesis de proteínas de membrana de cada especie de amiba por separado se procedió a purificar las proteínas y correr las tres fracciones de membrana en un solo gel de poliacrilamida (Fig. 19). De esta manera se pudo comparar con mayor certeza los perfiles proteicos observando diferencias en las bandas de proteínas entre cada especie. Al analizar los geles se observó la expresión diferencial de bandas proteicas de 23, 26, 49, 70, 100 y 250 kDa que se encuentra en *N. fowleri* de una forma más marcada con respecto a *N. lovaniensis* que es la especie filogenéticamente más cercana a ésta. Por otro lado, se observó diferencias más claras con *N. gruberi*, ya que las bandas de 250, 100, 70, 24 y 23 kDa presentes en *N. fowleri* no se observaron en las proteínas de membrana purificadas de *N. gruberi*. Además, hay bandas presentes en *N. fowleri* que están más marcadas con respecto a las de *N. gruberi* y *N. lovaniensis* estas son la banda de 49 y 70 kDa, respectivamente.

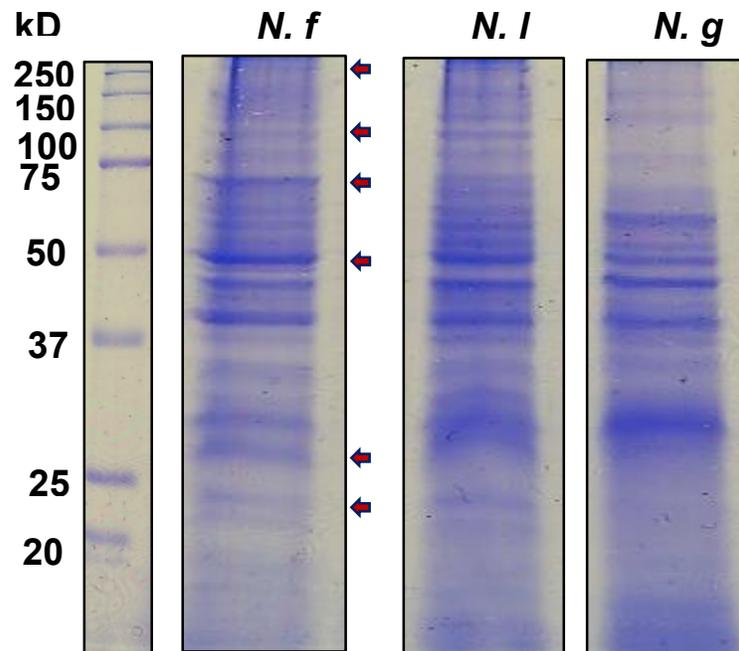


Fig 19. SDS-PAGE al 12% teñida con azul de Coomassie de las fracciones proteicas de membrana purificadas a partir de trofozoítos de *Naegleria*. *N.f*: *N. fowleri*, *N.l*: *N. lovaniensis* y *N.g*: *N. gruberi*. Flechas: bandas diferencialmente presentes en *N. fowleri*.

7.6 Purificación de proteínas de membrana biotiniladas de *N. fowleri* por el kit Mem-PER Plus

Al realizar la purificación de proteínas de membrana de los trofozoítos biotinilados y detectarlos con estreptavidina-HRP dos proteínas de 70 y 100 kDa (Fig. 21) las cuales están presentes en los gels de poliacrilamida de la fracción de membrana de *N. fowleri* teñidos con azul de Coomassie. Sin embargo, se pueden observar una banda de 250 kDa en la fracción de citoplasma y bandas de 200, 150 y 130 kDa en la pastilla insoluble, posiblemente se deba a al reconocimiento de proteínas endógenas.

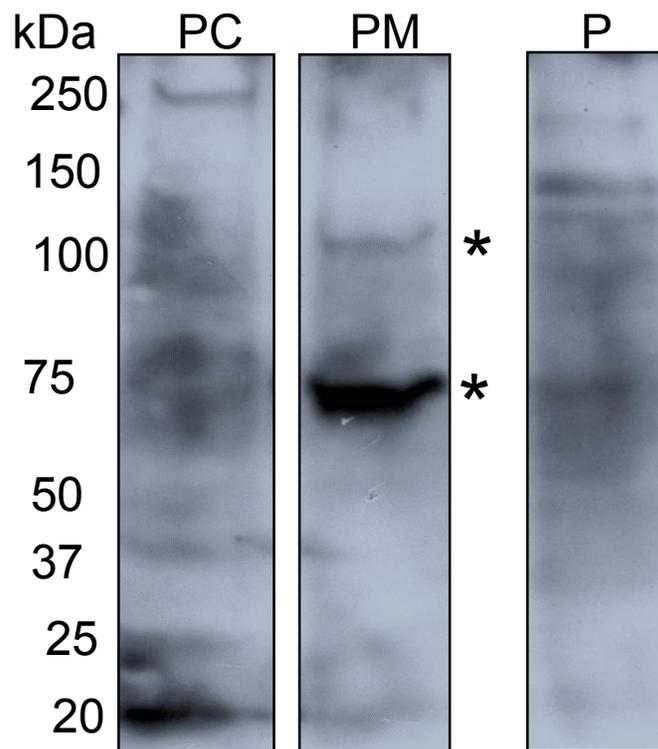


Fig 20. Blot de las proteínas de membrana biotiniladas de trofozoítos de *N. fowleri*. PC: Proteínas de citosol, PM: Proteínas de membrana y pastilla final.

7.7 Identificación por espectrometría de masas de las bandas de proteínas de membrana de 23, 26, 49, 70, 100, 250 kDa de *N. fowleri*.

Por otro lado, se enviaron a identificar por espectrometría de masas las bandas con pesos de 23, 26, 49, 70, 100, 250 kDa que se observaron de forma diferencial en *N. fowleri*.

Tabla 2: Proteínas de membrana de <i>N. fowleri</i> identificadas por espectrometría de masas		
# acceso	Proteína	PM
15982543	Membrane protein [<i>Naegleria fowleri</i>]	19.9
290981229	Isocitrate dehydrogenase NADP-dependent [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	36.8
291001563	Hypothetical protein NAEGRDRAFT_82392 [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	37.1
484759721	Succinate:cytochrome c oxidoreductase subunit 2 (mitochondrion) [<i>Naegleria fowleri</i>]	31.9
608604508	Cathepsin B-like protein [<i>Naegleria fowleri</i>]	34.1
1353726	Cysteine proteinase homolog, partial [<i>Naegleria fowleri</i>]	38.8
290998601	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	50.7
291001231	Hydroxymethyltransferase [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	55.6
290998219	Obtusifoliol 14alpha-demethylase [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	54.8
291001817	4-aminobutyrate aminotransferase [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	49.7
290979834	Predicted protein [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	52.9
290980235	Predicted protein [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	56.2
51012459	Hsp70 [<i>Naegleria fowleri</i>]	71.4
290997253	HSP70 family protein [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	70.8
484759714	ATP synthase F1 subunit alpha (mitochondrion) [<i>Naegleria fowleri</i>]	61.9
290995759	Mitochondrial F-1-atpase subunit [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	66.0
290977521	Predicted protein [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	60.2
290988534	Predicted protein [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	65.2
290992482	Aconitase [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	85.8
290992182	Heat shock protein 70 [<i>Naegleria gruberi</i> strain NEG-M]	78.7
565306664	Hypothetical protein L345_12976, partial [<i>Ophiophagus hannah</i>]	123.3

Al analizar los resultados arrojados por espectrometría de masas se observó que la mayoría de las proteínas identificadas pertenecen a enzimas metabólicas y únicamente una proteína de membrana plasmática denominada Mp2CL5 fue identificada, proteína que hasta la actualidad no se le ha identificado función alguna; sin embargo, se sugiere que está involucrada en los mecanismos de patogenicidad de la ameba, por lo que es un objeto muy interesante de estudio para elucidar si participa en el proceso de adhesión. Al analizarla y alinearla con adhesinas ya conocidas en diferentes parásitos no se encontró similitud; así mismo, al analizar los dominios conservados en las bases de datos no se encontró ningún dominio. En conclusión no existe casi nada reportado sobre esta proteína, ni a nivel estructural, ni funcional, por lo que es importante analizarla en posteriores estudios.

VIII. Discusión

Las enfermedades infecciosas producidas por protozoarios parásitos son un problema de salud pública, siendo los más afectados los países en vías de desarrollo. Las AVL tienen una distribución cosmopolita, se denominan como organismos anfizóicos debido a que pueden ser microorganismos de vida libre y ocasionalmente invaden a un hospedero causándole una infección (Visvesvara *et al.*, 2007). Las infecciones producidas por AVL son muy agudas y altamente mortales, hasta del 95%. La AVL *Naegleria fowleri* es el agente etiológico de la MAP, cuya infección se adquiere al entrar en contacto con cuerpos de aguas contaminados con este protozoario. Este microorganismo se adhiere a la mucosa nasal, penetra al neuroepitelio olfatorio y a través del nervio olfatorio llegan a los bulbos olfatorios produciendo la enfermedad. Por estudios inmunohistoquímicos en el ratón se observó desde etapas tempranas a los trofozoítos de *N. fowleri* en el lumen de la cavidad nasal, embebidos en una gran capa de moco y rodeados de un infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares (PMN) (Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a). En esta etapa de la infección la secreción de mucinas, la inflamación local y otros mecanismos de la respuesta innata se presentan como una barrera de protección que cumple un papel relevante en respuesta a la infección por *N. fowleri*; ya que los datos disponibles en la actualidad sugieren que la inmunidad innata puede jugar un papel más importante

que la inmunidad adquirida en la resistencia a la infección por ésta amiba (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

Es bien conocido que los epitelios celulares en el humano constituyen la primera línea de defensa contra diversos microorganismos patógenos y agentes infecciosos. Estos epitelios regulan el tránsito de moléculas, iones y la liberación de diversos componentes de la respuesta inmune innata que juegan un papel primordial en el control de las infecciones. La invasión de los patógenos a través de los epitelios, es un proceso complejo que el patógeno desencadena para poder invadir e infectar su célula blanco. La adhesión de los microorganismos patógenos sobre las células del hospedero es el primer paso para la colonización e infección exitosa, en la MAP se ha reportado que el trofozoíto es la fase infectante, se adhiere a la mucosa nasal y establece el proceso de reconocimiento con las células del hospedero.

Existe una gran variedad de glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos que decoran la superficie de las células de humanos y animales. Estos glicoconjugados participan en diversos procesos celulares fundamentales, incluyendo contacto célula-célula, célula-MEC, la motilidad, el crecimiento y la señalización celular. Los tejidos mucosales representan el sitio de infección o la vía de acceso para la mayoría de los patógenos, incluyendo virus, bacterias y protozoos. En la superficies de los tejidos de las mucosas de los diferentes tractos, diversos residuos de hidratos de carbono están presentes y juegan un papel crucial en la infección (Beachey *et al.*, 1981; Kato *et al.*, 2014). Sin embargo, en *N. fowleri* poco es lo que se conoce sobre el proceso de adherencia a su célula blanco.

La comprensión de los mecanismos de patogenicidad y virulencia de este protozoario son un aspecto relevante para trabajar en la elaboración de vacunas y tratamientos efectivos contra dicho protozoario y así disminuir la tasa de mortalidad atribuida a esta enfermedad. Por lo que, es de gran relevancia conocer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la adhesión de *N. fowleri* al neuroepitelio olfatorio. Como se ha venido describiendo, los carbohidratos juegan un papel importante en el proceso de adhesión. Probablemente existan diferencias en el contenido, naturaleza y distribución de carbohidratos entre diferentes especies

de un mismo género. Por lo que estas diferencias pudieran estar relacionados con los mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* y otros protozoarios parásitos. Debido a esto, se han analizado las diferencias en la superficie celular entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. Por análisis de microscopía electrónica de transmisión, los autores reportan diferencias notables entre ambas especies (Gonzales-Robles *et al.*, 2007). Además, en otro trabajo se ha evaluado y descrito las diferencias en la capacidad de adhesión e invasión a proteínas de la MEC por *N. fowleri* con respecto a *N. lovaniensis* (Jamerson *et al.*, 2012). Estos resultados avalan las características patogénicas y virulentas en *N. fowleri* y no así para *N. lovaniensis* y *N. gruberi*.

El empleo de las lectinas como herramienta de reconocimiento y/o afinidad para diferentes carbohidratos ha sido utilizado desde hace tiempo en diferentes microorganismos para conocer el tipo de glicoconjugados presentes en la superficie de éstos, con el fin identificar blancos terapéuticos (Mirhaghaniá y Warton., 1998; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010; Pacheco-Yépez *et al.*, 2009; Soto-Arredondo *et al.*, 2014).

En este trabajo se utilizaron lectinas biotiniladas y acopladas a FITC para poder establecer un patrón de marcaje de la superficie celular, ya que se conoce que *N. fowleri* presenta una mayor proporción de glicoconjugados de α -D-manosa, α -D-glucosa y α -L-fucosa en comparación con *N. gruberi* los cuales están involucrados en la adherencia a la mucosa nasal (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010; Carrasco-Yépez *et al.*, 2013). Debido a esto, se utilizaron lectinas que reconocen estos glicoconjugados (Con A y TPA), observando un patrón de marca distribuido en toda la superficie de los trofozoítos. Sin embargo, se observaron parches localizados en un polo de la célula que podría sugerir una distribución heterogénea de las glicoproteínas reconocidas por las lectinas. Además, posiblemente existan rearrreglos de la membrana plasmática al estar en contacto con estas lectinas, que como es bien conocido son capaces de inducir aglutinación al establecerse el contacto con las glicoproteínas. Así también, la incubación con las lectinas probablemente produzca en los trofozoítos un rearrreglo de la membrana plasmática

conduciendo al establecimiento de mecanismos conocidos como “capping” y “shedding” que permita eliminar una parte de las lectinas (Shibayama *et al.*, 2003).

Con respecto al reconocimiento, se puede observar una mayor fluorescencia en aquellos trofozoítos incubados con Con A, que los incubados con TPA, estos resultados concuerdan con lo antes reportado por Cervantes-Sandoval y colaboradores (2010), posiblemente tenga que ver con la afinidad y especificidad de estas lectinas, ya que Con A reconoce hasta dos tipos de residuos de carbohidratos y TPA únicamente a uno. Por lo tanto, el reconocimiento y la afinidad son diferente. También es probable que existan otros factores que influyan en una mayor expresión de un tipo determinado de residuo de carbohidrato que otros, incluso el hecho de que el cultivo amibiano no es del todo sincrónico y no todas las amibas se encuentran en fase de crecimiento exponencial, lo que podría estar afectando la expresión de proteínas de superficie. Por otro lado, a pesar de la importancia que tienen las glicoproteínas en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, poco se conoce sobre su biosíntesis, no se conoce que tipo de glicosilación es la que presentan, por lo que estos aspectos deben ser investigados en proyectos futuros.

Debido a la importancia que existe para conocer la naturaleza de las moléculas de superficie de *N. fowleri* que están involucradas en la citoadherencia y basado en los antecedentes de que los residuos de carbohidratos de manosa, glucosa y fucosa están implicados en el proceso de adhesión, se procedió a investigar que proteínas de la membrana plasmática de *N. fowleri* puede estar involucradas.

Con la finalidad de identificar a las proteínas y glicoproteínas de membrana, se procedió a marcar la superficie de los trofozoítos de *N. fowleri* con biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin) usando un método similar al descrito para otros géneros de amibas de vida libre como *Balamuthia mandrillaris* y *Acanthamoeba* spp (Matin *et al.*, 2007; Soto-Arredondo *et al.*, 2014), observando una positividad en los trofozoítos del 97%, donde la fluorescencia se puede observar en la superficie apical de una manera más evidente. Así mismo, dicho marcaje de membrana en las tres especies de *Naegleria* fue corroborado por microscopía confocal, ya que en algunos

trofozoítos la fluorescencia aparentemente está en el citoplasma celular. Se observó la marca en la membrana en las tres especies y se encontró de manera más evidente en *N. fowleri* y *N. gruberi*, no así para *N. lovaniensis*; sin embargo, a nivel de citoplasma se observan pequeñas marcas fluorescentes en los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* y una marcada fluorescencia en el citoplasma de *N. lovaniensis*, lo que sugiere que las ambas están internalizando la biotina, o la membrana de los trofozoítos es permeable a la estreptavidina-FITC y ésta está reconociendo proteínas endógenas con biotina (carboxilasas). Así mismo, posiblemente estas amibas estén fagocitando o internalizando la biotina. En cuanto a las características morfológicas se observa un patrón ameboideo característico y la formación de pseudópodos, que nos indica que los trofozoítos se encuentran viables al momento de realizar la fijación. Por otro lado, para excluir la presencia de biotina endógena, se realizó el control negativo, sin exposición a biotina en los trofozoítos de las tres especies de *Naegleria* utilizando FITC y peroxidasa; el resultado obtenido no mostró marca en la superficie de los trofozoítos (datos no mostrados).

Posteriormente, se utilizó el kit Mem-PER Plus para hacer un fraccionamiento subcelular y de esa forma purificar a las proteínas de la membrana plasmática de los trofozoítos previamente marcados con biotina. Enseguida se realizó una electroforesis y una electrotransferencia a membranas de PVDF el cual fue revelado con estreptavidina-HRP. Se encontraron dos bandas de aproximadamente 70 y 100 kDa en la fracción membranal. Sin embargo, en la fracción citoplasmática también se detectó una banda de aproximadamente 250 kDa, así como también en la fracción insoluble se detectaron bandas de aproximadamente de 70, 110, 130, 160 kDa. Este resultado posiblemente sea debido a que en las fracciones de citoplasma y del paquete insoluble la estreptavidina-HRP se une a biotina endógena de *N. fowleri*. Estos resultados son parcialmente similares a los reportados por González-Robles y colaboradores (2007) en donde observaron que al biotinar los trofozoítos de *N. fowleri* se encontraron bandas de aproximadamente 220, 70, 55 y 30 kDa en la fracción de membrana. Sin embargo, los autores mencionan que algunas proteínas marcadas con biotina también se encontraron asociadas con la fracción soluble. De la misma forma, Carrasco-Yépez y colaboradores (2013) observaron

positividad a la peroxidasa en su control negativo de *N. fowleri* por lo que argumentan que la presencia de proteínas citoplásmicas se pueden unir a la biotina y que pueden ser enzimas del tipo de las carboxilasas. En el mismo trabajo reportaron la presencia de tres proteínas con pesos relativos de 250, 150 y 75 kDa que fueron observadas al realizar un blot de extractos totales al incubar con estreptavidina-HRP, que de manera similar sugieren que podría tratarse de proteínas dependientes de biotina reconocidos por la estreptavidina. En nuestro estudio a diferencia de lo reportado por este grupo, en el control negativo de trofozoítos (sin exposición a biotina), no se observó positividad a la biotina como era de esperarse. El uso de esta metodología no puede discriminar proteínas del citosol que se unen a la biotina endógena. Sin embargo, existe evidencia que de manera particular *Naegleria gruberi* presenta en su genoma secuencias que codifican para proteínas que contienen biotina, es decir, enzimas dependientes de biotina (carboxilasas) que pueden ser reconocidas por la estreptavidina (Fritz-Laylin *et al.*, 2010). Por otro lado, este tipo de proteínas se han descrito en diferentes órganos y tejidos tales como el hígado, cartílago, riñones y huesos (Praul *et al.*, 1998; Lydan y O'Day, 1991). Además, de que en otros protozoarios se ha reportado la presencia de proteínas que contienen biotina, tal es el caso de *Dictyostelium discoideum* una AVL donde se ha descrito la presencia de al menos 20 proteínas biotiniladas de manera endógena que podrían ser enzimas que contienen biotina como grupo prostético, que catalizan reacciones de carboxilación, descarboxilación o transcarboxilación y que tienen funciones relevantes en el metabolismo de los ácidos grasos, gluconeogénesis y catabolismo de aminoácidos (Lydan y O'Day, 1991). Por tal motivo es necesario realizar estudios adicionales para conocer si *N. fowleri* presenta este tipo de proteínas.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar las proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri* que posiblemente estén involucradas en el mecanismo de adherencia a las células del hospedero, para lo cual se purificaron las proteínas de membrana plasmática de *N. fowleri* utilizando el kit de purificación comercial Mem-PER Plus. También se purificaron las proteínas de las fracciones membranales de las especies no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi* con el fin de hacer una

comparación entre los patrones proteicos de las tres especies y de esa forma analizar si existían diferencias entre estas fracciones. Como referencia de la efectividad de este kit se contaba con algunos trabajos publicados donde reportan su empleo para la purificación de proteínas de membrana de *N. fowleri* y *Acanthamoeba*, donde reportan la presencia de proteínas tipo integrina y actividad de proteasas en la fracción de membrana purificada (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009; Jamerson *et al.*, 2012; Vyas *et al.*, 2014).

En nuestro estudio al realizar la electroforesis de las proteínas de membrana por separado en geles diferentes y en condiciones reductoras se observaron bandas con pesos relativos de 20, 23, 27, 47, 49, 60, 70, 75, 100 y 250 kDa para *N. fowleri*. De éstas, las bandas con pesos de 22, 23, 27, 47 y 49 se observaron de forma más marcada en la fracción de membranas de *N. fowleri*, cuya pureza relativa fue confirmada por western blot utilizando la enzima GAPDH, de manera similar a como lo realizó Vyas y colaboradores en el 2014. Al analizar el perfil proteico de la membrana de las otras dos especies no patógenas de amibas y compararlas con las de *N. fowleri*, se observó que para *N. lovaniensis* se presentan en mayor intensidad las bandas de 97, 50 y 25 kDa. Del mismo modo, al comparar *N. fowleri* con *N. gruberi* se presentaron bandas diferenciales de 49, 47, 27, 23 y 22 kDa y de 55, 54, 53, 52 y 50 kDa, respectivamente. Sin embargo, es importante mencionar que alguna de estas bandas pueden estar compartidas entre las especies de *Naegleria* y solo su expresión sea diferencial. Por otro lado, para poder comparar mejor los patrones de proteínas de membranas entre las tres especies de amibas, dichas proteínas fueron corridas en un mismo gel de poliacrilamida y se observaron notables diferencias. Adicionalmente, se encontraron diferencias en los patrones proteicos en *N. fowleri* que fueron de 23, 26, 49, 70, 100 y 250 kDa que se encuentra mayormente expresadas con respecto a *N. lovaniensis* que es la especie filogenéticamente más cercana a ésta. Tomando en cuenta estos resultados se enviaron estas bandas para su análisis por espectrometría de masas, para así conocer si algunas de ellas podrían corresponder a proteínas tipo adhesinas. En la actualidad existen pocos estudios referentes a proteínas de membrana que han sido

identificadas en *N. fowleri* y que podrían ser las mismas que encontramos en las proteínas purificadas de membrana.

N. fowleri inicia la infección a su huésped al adherirse al neuroepitelio olfatorio y posteriormente invadir al SNC, este proceso implica la interacción con componentes de la MEC; se conoce que la fibronectina es considerada como uno de los componentes importantes de la MEC. En un trabajo realizado por Han y colaboradores (2004) con trofozoítos de *N. fowleri* se encontró una banda proteica de 60 kDa que se une a fibronectina; por análisis de western blot usando anticuerpos anti-integrinas se comprobó que ésta proteína y otra de 75 kDa pertenecen a la familia de las integrinas. Más recientemente se ha demostrado por western blot que en lisados totales y en proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri* obtenidas por el kit (Mem-PER eukaryotic) se detectó la presencia de dos proteínas similares a integrinas, con pesos de 53 kDa y de 70 kDa (Jamerson *et al*, 2012). Hasta el momento, únicamente el grupo de Réveiller y colaboradores en el 2001 han reportado sólo una proteína de membrana en *N. fowleri* que ha identificada como proteína Mp2CL5; esta proteína no fue identificada en las especies no patogénas del género *Naegleria* así como tampoco en el género *Acanthamoeba*. La proteína recombinante expresada y purificada tiene un peso de aproximadamente de 23 kDa. Al producir anticuerpos contra esta proteína se identificó la Mp2CL5 nativa con un peso de 17 kDa localizada en la membrana plasmática de los trofozoítos de *N. fowleri*. Más recientemente, Fritzing y colaboradores (2006) reportaron la presencia de una proteína reguladora del complemento similar a CD-59, esta proteína presenta un peso relativo de 18 kDa y fue detectada en la membrana plasmática de los trofozoítos de *N. fowleri* pero no en los trofozoítos de *N. gruberi*; La protectina CD59 es una glicoproteína de 18-20 kDa anclada a la membrana vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) que tienen la capacidad de inhibir la formación del complejo de ataque a la membrana por el complemento (MAC). Los autores de estos estudios no mencionan a estas proteínas como posibles adhesinas, solamente la relacionan como otro mecanismo de patogenicidad presentes en la membrana.

Poco se conoce sobre las moléculas implicadas en el proceso de adhesión en *N. fowleri*, sin embargo, se han realizado estudios encaminados a conocer con mayor detalle este fenómeno. Cervantes-Sandoval y colaboradores en el 2010, reportaron por análisis de western blot y utilizando lectinas biotiniladas diferencias significativas en la expresión de glicoproteínas de aproximadamente 63, 51, 40 y 38 kDa reconocidas por Con A. Mientras que al utilizar TPA observaron glicoproteínas de 63, 55, 50, 40, 38, 32, 29 y 26 kDa. Por otra parte, Carrasco-Yépez y colaboradores (2013) utilizando extractos totales de *N. fowleri* y co-incubados con Con A identificaron glicoconjugados de aproximadamente 250, 200, 108, 75, 73, 68, 48, 41, 37, 30 y 25 kDa, mientras que al revelar con *G. nivalis* (manosa) se observaron bandas de 250, 210, 170, 150, 100, 75, 73, 70, 60, 58, 42, 44, 30 y 25 kDa y con *P. sativum* (manosa y glucosa) se detectaron bandas de 250, 150, 75, 66, 64, 30 y 25 kDa. Los autores concluyeron que existen glicoproteínas que pueden estar involucradas en fenómenos de adhesión; en el presente trabajo se encontraron algunas proteínas que se comparten con los trabajos anteriores.

Por otro lado, también se han estudiado a las células MDCK como modelo de células blanco en interacción con trofozoítos de *N. fowleri*. En este trabajo se reportó que esta amiba es capaz de adherirse a las células MDCK degradando a las proteínas de uniones estrechas tales como Zonula Ocludens-1 (ZO-1) y claudina-1 (Shibayama *et al.*, 2013). Por lo que estos resultados sugieren que estas células presentan proteínas que cumplan con el papel de receptores que reconocen y permiten establecer el contacto con las proteínas de membrana (adhesinas) de los trofozoítos de *N. fowleri*. Cabe mencionar que este tipo de epitelio no es la célula blanco de este protozoario, sin embargo, es difícil realizar estudios con células que provienen del epitelio nasal o respiratorio ya que las líneas celulares que están comercialmente disponible presentan el inconveniente de producir una gran cantidad de moco que en general inhibe la adherencia de los trofozoítos (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a). En el presente proyecto también se purificaron las proteínas de membrana biotiniladas de células MDCK. Con las que se realizaron ensayos de overlay, esta metodología se utilizó por primera vez en estudios con amibas de vida libre, a partir de proteínas de membrana que fueron incubadas con

la fracción de proteínas de membrana biotiniladas de las células MDCK. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, es decir, no se logró detectar ninguna posible marca que nos diera evidencia de interacciones proteína-proteína entre estos dos tipos celulares, posiblemente se necesiten realizar modificaciones más profundas al protocolo experimental de esta metodología, ya que se piensa que la concentración de proteína o la marca de biotina este interfiriendo con el reconocimiento proteína-proteína. Además, se pretende realizar los mismos ensayos utilizando la línea celular A459 de origen alveolar que nos brindará mayor información como células blanco de manera similar a la infección natural.

La identificación de proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri* se realizó por MALDI-TOF, se identificaron proteínas implicadas en el metabolismo celular o poseen dominios de las proteínas que participan en estos procesos, principalmente en las vías metabólicas de síntesis de colesterol, glucogénesis, síntesis de aminoácidos y ciclo de Krebs. Además, se identificaron cisteína proteasas y proteínas de choque térmico; las cisteína proteasas se conoce que principalmente participan en los procesos de invasión, migración y supervivencia intracelular en diversos parásitos. Por otro lado, hay evidencia de que las proteasas pueden funcionar como adhesinas, e incluso se conoce que estas proteínas pueden tener relocalización a la membrana plasmática a diferentes compartimentos celulares y que son importantes para el proceso de adherencia a la célula blanco (Arroyo y Alderete, 1989; García-Rivera *et al.*, 1999). Además se ha reportado la existencia de proteínas de choque termino que funcionan como lectinas endógenas GlcNAc que pueden actuar como proteínas de transporte de glicoproteínas O-GlcNAc entre el citosol y el núcleo (Lefebvre *et al.*, 2001). Lo que nos lleva a pensar en la posibilidad de también participar en el proceso de adhesión, como una nueva función de este tipo de proteínas. Por otro lado, debido a que se identificaron diversas enzimas metabólicas, es importante estudiar si alguna de estas podría estar participando en la adhesión y no descartarlas para su estudio, ya que existe evidencia científica de la participación de enzimas en la adherencia de algunos parásitos a las células diana (Alderete *et al.*, 2001; Meza-Cervantez *et al.*, 2011), por tales motivos estudios futuro son necesarios.

IX. Conclusiones

- ✓ Se purificaron proteínas de membrana de los trofozoítos de *N. fowleri* y de las especies no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*
- ✓ Existen diferencias en los patrones de proteínas de membrana entre la especie patógena *N. fowleri* y las no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*
- ✓ Se identificaron por espectrometría de masas las proteínas de membrana de *N. fowleri* con pesos relativos de 23, 26, 49, 70, 100, 250 kDa, los resultados muestran la presencia de una proteína de membrana, enzimas metabólicas y proteínas tipo carboxilasas en *N. fowleri*.
- ✓ Se detectaron dos proteínas de membrana biotiniladas de 70 y 100 kDa en *N. fowleri*.

X. Perspectivas

- ❖ Analizar la composición de aminoácidos, estructura y función de las proteínas de membrana identificadas por análisis *in silico*.
- ❖ Obtener proteínas recombinantes de la o las proteínas de interés que cumplan con características de adhesinas.
- ❖ Producir anticuerpos a partir de la proteína recombinante candidato y realizar ensayos de localización e inhibición de la adhesión en la línea celular de origen alveolar A549 e *in situ* mediante explantes de la mucosa olfatoria.
- ❖ Realizar ensayos de Overlay o co-inmunoprecipitación con proteínas de la línea celular A549.

XI. Referencias bibliográficas

1. Aldape K., H. Huizinga, J. Bouvier, J. Mckerrow, (1994). *Naegleria fowleri*: Characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Experimental Parasitology*, Volume 78, Issue 2, Pag 230-241. Doi:10.1006/Expr.1994.1023.
2. Alderete J. F., Millsap K. W., Lehker M. W., Benchimol M. (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol* **3**, 359–370.
3. Arroyo R. y Alderete J. F. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* **57**, 2991–2997.
4. Arroyo R y Orozco E, (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesion. *Molecular and biochemical parasitology*, 23. 151-158.
5. Beachey Edwin H. Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces (1981). *The Journal of Infectious Diseases*.
6. Blair B, Sarkar P, Bright KR, Marciano-Cabral F, Gerba CP. *Naegleria fowleri* en pozo de agua. *Emerg Infect Dis*. 2008.
7. Carrasco-Yepez M, Campos-Rodriguez R, Godinez-Victoria M, Rodriguez-Monroy MA, Jarillo-Luna A, Bonilla-Lemus P, Contis-Montes De Oca A and Rojas-Hernandez S (2013). *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of α -D mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitol Res* 112:3615–3625.
8. Carter, R. F. (1970), Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, 100: 217–244. Doi: 10.1002/path.1711000402.
9. Cateau E, Héchard, Rodier M. Les amibes libres: un danger méconnu Free living amoebae: an unrecognized risk. *Revue Francophone des Laboratoires*. March 2014, Pages 41–51, Doi: 10.1016/S1773-035X (14)72404-9.
10. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, García-Latorre E, Tsutsumi V. and Shibayama M, (2008a). Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology*, Vol. 154 No. 123895-3904.
11. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, García-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M, (2008b). Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis, *Parasitology International*, Volume 57, Issue 3, Pages 307-313.
12. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, Pacheco-Yépez J, Silva-Olivares A, Tsutsumi V, Shibayama M. *Parasitol Res*, (2010). Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. Doi: 10.1007/S00436-010-1727-Z.

13. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, Meza-Cervantez P, Arroyo R, Tsutsumi V, Shibayama M. (2009). *Naegleria fowleri* induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation. *Microbiology*; 155(Pt 11):3739-47. Doi: 10.1099/Mic.0.030635-0.
14. Chávez-Munguía Bibiana, Salazar Villatoro Lizbeth, Omaña-Molina Maritza, Rodríguez-Monroy Marco Aurelio, Segovia-Gamboa Norma, Martínez-Palomo Adolfo, (2014). *Naegleria Fowleri*: Contact-Dependent Secretion of Electron-dense Granules, *Experimental Parasitology* 142 1–6.
15. De Jonckheere J. F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboid flagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol.* 1520-8. Doi:10.1016/J.Meegid.
16. De Jonckheere JF. (2004), Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist*, Volume 155, Issue 1, Pages 89–103.
17. De Jonckheere, J. F. (2002). A century of research on the amoeboid flagellate genus *Naegleria*. In: *Acta protozoologica*, Vol. 41, No. 4, P. 309-342.
18. Ferrante A. and Bates E., (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae *naegleria* and *acanthamoeba spp.* *Infection and immunity*, Dec., Pag 3320-3321.
19. Fowler M., Carter R. F., (1965) Acute pyogenic meningitis probably due to *acanthamoeba sp.*: a preliminary report. *Brit. Med. J.* 2, 740 Repor-742.
20. Fritzing AE., Toney DM and Marciano-Cabral F. Identification of a *Naegleria fowleri* Membrane Protein Reactive with Anti-Human CD59 Antibody *Infect Immun.* Feb 2006; 74(2): 1189–1195. Doi: 10.1128/IAI.74.2.1189-1195.2006.
21. Garcia-Rivera G, Rodriguez MA, Ocadiz R, Martinez-Lopez MC, Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Orozco E.(1999), *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol.* 33(3):556-68. Erratum in: *Mol Microbiol* 2000 Jan; 35(1):248.
22. Garate M, Cubillos I, Noorjahan P (2005). Biochemical characterization and functional studies of mannose-binding Protein in *acanthamoeba*. *Infect Immun.* 73(9): 5775–5781.
23. Garate M, Marchant J, Cubillos I, Cao Z, Naveed A. And Noorjahan P (2006), In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Vol. 47 No. 31056-1062.
24. Garate M, Cao Z, Bateman E and Panjwani N (2004). Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*, *The journal of biological chemistry*, 279, 29849-29856.
25. Gauci Victoria J., Elise P. Wright, and Jens R. Coorsen. Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *J Chem Biol.* Jan 2011; 4(1): 3–29
26. González-Robles A., Cristóbal-Ramos A.R, González Lázaro M, Omaña-Molina M, Martínez-Palomo A, (2009). *Naegleria fowleri*: Light and electron microscopy

- study of mitosis. *Experimental Parasitology*. Volumen 122, Issue 3, Pages 212-217. González-Robles A., Castañón G, Cristóbal-Ramos A.R, Hernández-Ramírez V.I, Omaña-Molina M, Martínez-Palomo A, (2007). Cell surface differences of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* exposed with surface markers. *Experimental parasitology*. Volumen 117, Issue 4, Pages 399-404.
27. Hae-Jin Sohn & Jong-Hyun Kim & Myeong-Heon Shin & Kyoung-Ju Song & Ho-Joon Shin, (2010). The Nf-Actin Gene Is An Important Factor For Food-Cup Formation And Cytotoxicity Of Pathogenic *Naegleria Fowleri*. *Parasitol Res* 106:917–924 Doi: 10.1007/S00436-010-1760.
 28. Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis.* 2010 Jul; 8(4):2016. Doi:10.1016/j.tmaid.2010.06.001.
 29. Herbst R, Ott C, Jacobs T, Marti T, Marciano-Cabral F, Leippe M (2002). Pore-Forming Polypeptides of the Pathogenic Protozoon *Naegleria Fowleri*. *Biol. Chem.* 277:22353-22360.
 30. Holbrook TW, Boackle RJ, Parker BW, Vesely J. Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect Immun.* 1980 Oct; 30(1):58-61.
 31. Jamerson M, Rocha-Azevedo B, and Marciano-Cabral F, (2012). Pathogenic *Naegleria Fowleri* and Non-Pathogenic *Naegleria Lovaniensis* Exhibit Differential Adhesion To, And Invasion Of, Extracellular Matrix Proteins. *Microbiology*, 158(Pt3):791–803. Doi: 10.1099/Mic.0.055020-0.
 32. Jarolim, K. L., McCosh J. K., Howard M. J., John, D. T. (2000). "A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice." *J Parasitol* 86(1): 50-55.
 33. Kato Kentaro and Ishiwa Akiko. The Role of Carbohydrates in Infection Strategies of Enteric Pathogens (2014). *Tropical Medicine and Health.* 43(1), 41–52. doi:10.2149/tmh.2014-25
 34. Kinchel C. Doerner and Bryan A. White, (1990). Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic Acid-Schiff Stain. *Analytical Biochemistry* 187,147-150.
 35. Kyoung-Ju S, Kyung-Hui S, Byoung-Kuk N, Jong-Hyun K, Daeho K and Sun P, Jhang-Ho P, Kyung-Il I, Ho-Joon S (2007). Molecular Cloning and Characterization of a Cytosolic Heat Shock Protein 70 from *Naegleria Fowleri* *Parasitol Res* 100:1083–1089. Doi 10.1007/S00436-006-0404-8.
 36. Lares-Villa Fernando Claudia Hernández-Peña Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007–October 2008) DOI: 10.1016/j.exppara.2010.04.011
 37. Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J. P., & Michalski, J. C. (2001). Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins

- from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochemical Journal*, 360(Pt 1), 179–188.
38. Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health*. 2010 Jun; 213(3):167-75. Doi: 10.1016/j.ijheh.2010.03.004.
 39. Lowrey And J Mclaughlin *Infect. Immun.* 1984, 45(3):731. A Multicomponent Hemolytic System in the Pathogenic Amoeba *Naegleria Fowleri*.
 40. Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Reviews*, Mar. 1988, p. 114-133.
 41. Marciano-Cabral, F. And Cabral, G. A. (2007), the Immune Response to *Naegleria Fowleri* Amebae and Pathogenesis of Infection. *Fems Immunology & Medical Microbiology*, 51: 243–259. Doi: 10.1111/J.1574-695x.2007.00332.
 42. Martínez, A. J., Nelson, E. C., Jones, M. M., Duma, R. J., Rosenblum, W. I. (1971). "Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study." *Lab Invest* 25(5): 465-475.
 43. Martínez, J., Duma, R. J., Nelson, E. C., Moretta, F. L. (1973). "Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study." *Lab Invest* 29(2):121-133.
 44. Matin A, Ruqaiyyah S, Suk-Yul J, Sik-Kim K. *Balamuthia mandrillaris* interactions with human brain microvascular endothelial cells *in vitro*. *Med Microbiol*. Aug 2007 Vol. 56, No. 8 1110-1115, Doi:10.1099/Jmm.0.47134-0j.
 45. Meza-Cervantez P, González-Robles A, Cárdenas-Guerra R, Ortega-López J, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R. *Microbiology* 157(12):3469-3482 doi:10.1099/mic.0.053033-0
 46. Mirhaghaniá A. Warton A. Involvement of *Trichomonas vaginalis* surface-associated glycoconjugates in the parasite/target cell interaction. A quantitative electron microscopy study *Parasitol Res* (1998) 84: 374±381.
 47. Movahedi Zahra, Reza Shokrollahi Mohammad, (2012). Primary amoebic meningoencephalitis in an Iranian infant. *Rep Med*: 782854.
 48. Ondarza Raúl N, Hurtado Gerardo, Tamayo Elsa, Iturbe Angélica, Hernández Eva, (2006). *Naegleria Fowleri*: A Free-Living Highly Pathogenic Amoeba Contains Trypanothione/Trypanothione Reductase And Glutathione/Glutathione Reductase Systems. *Experimental Parasitology*, 114 141–146. Doi:10.1016/J.Exppara.2006.03.001
 49. Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Rojas-Hernández S, Serrano-Luna J, Rivera-Aguilar V, Villa Treviño S, Martínez Palomo A, Tsutsumi V, Shibayama M, (2009). Expresión diferencial de glicoconjugados de superficie en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. *Parasitology International*. Volumen 58, Número 2, Páginas 171-177.

50. Petri W.A.Jr, R. D. Smith, P H Schlesinger, C F Murphy, and J I Ravdin. (1987) Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence Of *Entamoeba histolytica*. J Clin Invest. 80(5): 1238–1244. Doi: 10.1172/Jci113198
51. Pieters Roland J. Carbohydrate Mediated Bacterial Adhesion (2011). Bacterial Adhesion, Advances in Experimental Medicine and Biology.
52. Qvarnstrom Y, Visvesvara G, Sriram R, Da Silva A. J, (2006), Multiplex Real-Time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. Clin Microbiol; 44(10):3589-95.
53. Rocha-Azevedo B, Jamerson M, Cabral G, Marciano-Cabral F, (2010). *Acanthamoeba culbertsoni*: analysis of amoebic adhesion and invasion on extracellular matrix components collagen I And Laminin-1. Experimental Parasitology. 79–84.
54. Rocha-Azevedo B, Jamerson M, Cabral, G. A, Silva-F, Cabral G. And Marciano-Cabral F. (2009), *Acanthamoeba* interaction with extracellular matrix glycoproteins: biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. Journal of eukaryotic microbiology. 56: 270–278. Doi: 10.1111/J.1550-7408.2009.00399.X
55. Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R. (2004). "Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice." Parasitol Res 94(1): 31-36.
56. Schuster F. I. y Visvesvara G.S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol; 34: 1001-1027.
57. Serrano-Luna, J, Cervantes-Sandoval, I., Tsutsumi, V. And Shibayama, M. (2007). A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. Journal of eukaryotic microbiology. 54: 411–417. Doi: 10.1111/J.1550-7408.2007.00280.X
58. Shibayama M, Martínez-Castillo M, Silva-Olivares A, Galindo-Gómez S, Navarro-García F, Escobar-Herrera J, Sabanero M, Tsutsumi V and Serrano-Luna J (2013), Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. Microbiology.159, P. 392-401.
59. Shibayama Mineko, José De Jesús Serrano-Luna, Saúl Rojas-Hernández, Rafael Campos-Rodríguez, Víctor Tsutsumi, (2003), Interaction Of Secretory Immunoglobulin A Antibodies With Naegleria Fowleri Trophozoites And Collagen Type I, Canadian Journal Of Microbiology, 49(3): 164-170, 10.1139/W03-023
60. Sina M. Alastair G. B. Simpson, Mark A. Farneb Robert A. Andersen, Roger Anderson, D John R. Barta, Samuel S. Bowser, F. Guy Brugerolle, Robert A. Fensome, Suzanne Fredericq, Timothy Y. James, J. Sergei Karpov, Kpaul Kugrens, John Krug, M Christopher E. Lane, N Louise A. Lewis, O Jean Lodge, P Denis H. Lynn, David G. Mann, Richard M. Mccourt, Leonel Mendoza,

- Moestrup, Usharon E. Mozley-Standridge, Thomas A. Nerad, W Carol A. Shearer, X Alexey V. Smirnov, Yfrederick W. Spiegelz And Max F. J. R. Taylor. J. (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes With emphasis on the taxonomy of Protists. *Eukaryot. By The International Society of Protistologists, Microbiology.* 52(5), Pp. 399–451. Doi: 10.1111/J.1550-7408.2005.00053.X
61. Song, K.-J., Jang, Y. S., Lee, Y. A., Kim, K. A., Lee, S. K. And Shin, M. H. (2011). Reactive oxygen species-dependent necroptosis in Jurkat t cells induced by pathogenic free-living *Naegleria fowleri*. *Parasite immunology.* 33: 390–400. Doi: 10.1111/J.1365-3024.2011.01297.X.
 62. Soto-Arredondo K. J, Flores-Villavicencio L. L, Serrano-Luna J. J. Shibayama M. And Sabanero-López M. (2014), Biochemical and cellular mechanisms regulating *Acanthamoeba castellanii* adherence to host cells. *Parasitology,* 141(4):531-4.
 63. Su-Yeon Kang, Kyoung-Ju Song, Seok-Ryoul Jeong, Jong-Hyun Kim, Sun Park, Kyongmin Kim, Myung-Hee Kwon, and Ho-Joon Shin, (2005). Role Of The Nfa1 Protein In Pathogenic *Naegleria Fowleri* Cocultured With Cho Target Cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12(7): 873–876. Doi: 10.1128/Cdli.12.7.873-876.2005
 64. Toney D. M, Marciano-Cabral F. (1994). Membrane vesiculation of *Naegleria fowleri* amoebae as a mechanism for resisting complement damage. *The journal of immunology.* Vol. 152. No. 6. 2952-2959.
 65. Trabelsi F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. (2012). Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Les amibes libres pathogènes: Revue Épidémiologique ET Clinique Pathologie Biologie.* Pages 399–405. Doi: 10.1016/J.Patbio.2012.03.002.
 66. Vargas-Zepeda J, Gómez-Alcalá Av, Vásquez-Morales Ja, Licea-Amaya L, De Jonckheere Jf, Lares-Villa F.(2005), Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch Med Res.* Jan-Feb; 36(1):83-6.
 67. Visvesvara G.S y Schuster F.L. Opportunistic Free-Living Amebae, Part II, *Clinical Microbiology Newslettern,* Doi: 10.1016/j.clinmicnews.2008.10.001
 68. Visvesvara S. Moura G, and. Schuster F.L (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba Spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, And Sappinia diploidea.* *Immunology & Medical Microbiology.* Volume 50, Issue 1, 1–26. Doi: 10.1111/J.1574-695x.2007.00232.
 69. Yoder J.S., Ba Eddy, Visvesvara G.S, Capewell L, Beach M.J, (2010). The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiol Infect.* 138 (7):968-75. Doi: 10.1017/S0950268809991014.