



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**“Estudio del Proteosoma 20S en trofozoítos de
Naegleria gruberi y *Naegleria fowleri*”**

T E S I S

Que presenta

M.V.Z. Diana Angélica Martínez Valencia

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directores de 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.

Este proyecto estuvo bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular y del Dr. José de Jesús Serrano Luna del Departamento de Biología Celular; además de contar con la asesoría de la Dra. Patricia Talamás Rohana, el Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular y del Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete del Departamento de Biomedicina Molecular del Cinvestav.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de CVU 676064).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Mineko Shibayama y al Dr. Jesús Serrano por haber confiado en mí desde que ingresé al laboratorio. Además, por todo su apoyo y consejos, tanto profesionales como personales.

También quiero agradecer a la M. en C. Angélica Silva Olivares por todo el apoyo técnico con las amibas y por sus consejos con los experimentos.

Un agradecimiento muy especial para mi asesor y amigo, el Dr. Vianney Ortíz. Por haberme abierto las puertas al mundo de la ciencia hace 4 años; por su compañía, tiempo y consejos tanto personales como académicos.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: Daniel, Paula, Nadia, Moisés y Roberto, por el apoyo que me han brindado. Por su tiempo, ayuda y consejos con los experimentos; porque nunca recibí un “no” como respuesta ante cualquier duda.

A mis compañeros de generación y amigos: Paty, Daniel, Gandhi y Arturo. Por toda su ayuda durante los cursos, por estar siempre en buenos y malos momentos.

Gracias a mis amigos Penélope, Lorena, Luis, Carlos, Ximena, Araceli, Martín y Edgar por haberme apoyado al principio de la aventura que representó el posgrado. Su ayuda fue trascendente para llevar a cabo todo este proceso. Los amo.

Gracias a la Psicóloga Elisa Hernández, por haber aguantado y compartido todo este proceso conmigo. Por escucharme y apoyarme cuando más lo he necesitado; por entender el tiempo que he invertido en este proyecto.

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia por su apoyo para terminar la licenciatura; su apoyo antes de llegar a la Ciudad de México y por todo el apoyo que me siguen brindando día a día. Estamos en ciudades distintas, pero nunca dejan de estar conmigo. Gracias a mis padres Catalina y Julián; a mis hermanos Beatriz y Alfredo. No existen palabras adecuadas para describir todo lo que me han regalado. Los amo.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mis padres; a mi hermano Alfredo y especialmente a la Dra. Beatriz Martínez, por su ejemplo siempre.

También es dedicado a la persona con el nombre más bonito jamás pronunciado. Te amo.

Contenido

Lista de figuras	1
Lista de tablas	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 EL GÉNERO <i>Naegleria</i>	5
1.1.1 <i>Naegleria gruberi</i>	5
1.1.2 <i>Naegleria fowleri</i>	7
1.1.3 Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP)	8
1.1.4 Mecanismos de patogenicidad	9
1.2 EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA (SUP)	10
1.2.1 El proteosoma	12
1.2.2 El proteosoma en protozoarios.....	18
1.2.3 Inhibidores del proteosoma	20
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Análisis bioinformático	22
5.2 Cultivo de amibas	24
5.3 Cultivo celular	24
5.4 Obtención de extractos totales.....	25
5.5 Western Blot (WB)	26
5.6 Localización del proteosoma mediante microscopía confocal	27
5.7 Ensayos de viabilidad por FACS	28
5.8 Determinación de la proliferación de trofozoítos en presencia de los inhibidores del proteosoma Lactacistina y MG-132.....	29
6. RESULTADOS	29
6.1 Identificación y caracterización <i>in silico</i> de las subunidades que conforman el proteosoma 20S de <i>Naegleria gruberi</i> y <i>Naegleria fowleri</i>	29
a) Identificación y caracterización de las subunidades α	30
b) Modelamiento en 3D de las subunidades α	33

c)	Identificación y caracterización de las subunidades β	35
d)	Modelamiento en 3D de las subunidades β	37
e)	Identidad y similitud entre las subunidades del proteosoma de <i>Naegleria</i>	40
f)	Identidad y similitud entre las subunidades del proteosoma 20S de las especies de <i>Naegleria</i> y otros protozoarios.....	41
g)	Organización filogenética de las subunidades del proteosoma 20S de protozoarios	43
6.2	Identificación de la presencia de subunidades α y β del proteosoma de <i>N. gruberi</i> y <i>N. fowleri</i>	45
6.3	Determinación del efecto del inhibidor Lactacistina en la viabilidad y proliferación de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> y <i>N. fowleri</i>	48
6.4	Efecto del inhibidor MG-132 en la viabilidad y proliferación de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> y <i>N. fowleri</i>.....	52
6.5	Proliferación de <i>N. gruberi</i> y <i>N. fowleri</i> en co-incubación con los inhibidores del proteosoma.....	55
7.	DISCUSIÓN	57
8.	CONCLUSIONES	64
9.	PERSPECTIVAS	64
10.	BIBLIOGRAFÍA	65

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Naegleria gruberi</i>	6
Figura 2. Estadios de la amiba <i>Naegleria fowleri</i>	7
Figura 3. Mecanismos de patogenicidad de <i>N. fowleri</i> y el proceso de entrada hasta el plexo nervioso.....	10
Figura 4. Proceso de marcaje de las proteínas blanco con ubiquitina	12
Figura 5. Proteosoma 26S	13
Figura 6. El proteosoma en los 3 reinos de la vida.....	16
Figura 8. Conformación del proteosoma 20S	17
Figura 9. Mecanismo de inhibición de la Lactacistina sobre la treonina 1 de la subunidad β_5	21
Figura 10. Mecanismo de inhibición de MG-132 sobre la treonina 1 de las subunidades tipo β catalíticas.....	21
Figura 11. Alineamiento múltiple de las subunidades α de proteosoma de <i>N. gruberi</i>	31
Figura 12. Alineamiento múltiple de las subunidades α de proteosoma de <i>N. fowleri</i>	32
Figura 13. Modelos tridimensionales de las 6 subunidades α de <i>N. gruberi</i>	33
Figura 14. Modelos tridimensionales de las subunidades α de <i>N. fowleri</i>	34
Figura 15. Alineamiento múltiple de las subunidades β del proteosoma 20S de <i>N. gruberi</i>	35
Figura 16. Alineamiento múltiple de las subunidades β del proteosoma 20S de <i>N. fowleri</i>	36
Figura 17. Modelos tridimensionales de las subunidades β de <i>N. gruberi</i>	38
Figura 18. Modelos tridimensionales de las subunidades β de <i>N. fowleri</i>	39
Figura 19. Árbol filogenético sin raíz de las subunidades α y β del proteosoma en protozoarios y en la arquea <i>T. acidophilum</i>	44
Figura 20. Localización intracelular del proteosoma 20S en trofozoítos de <i>N. gruberi</i> mediante microscopía confocal	46
Figura 21. Localización intracelular del proteosoma 20S en trofozoítos de <i>N. fowleri</i> mediante microscopía confocal	47
Figura 22. Western-blot con el anticuerpo primario anti-subunidad α_1 del proteosoma 20S	48
Figura 23. Viabilidad de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> co-incubados con el inhibidor Lactacistina durante 24, 48 y 72 horas	49
Figura 24. Proliferación de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> co-incubados con Lactacistina.....	50
Figura 25. Viabilidad de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> co-incubados con el inhibidor Lactacistina durante 24, 48 y 72 horas	51
Figura 26. Proliferación de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> co-incubados con Lactacistina	51
Figura 27. Viabilidad de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> co-incubados con el inhibidor MG-132 durante 24, 48 y 72 horas	52
Figura 28. Proliferación de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> co-incubados con MG-132	53
Figura 29. Viabilidad de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> co-incubados con el inhibidor MG-132 durante 24, 48 y 72 horas	54
Figura 30. Proliferación de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> co-incubados con MG-132	54
Figura 31. Proliferación de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> en presencia de los inhibidores Lactacistina y MG-132	55
Figura 32. Proliferación de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> en presencia del inhibidor MG-132.....	56

Lista de tablas

Tabla 1. Primeros reportes del proteosoma 20S en organismos protozoarios	19
Tabla 2. Porcentajes de identidad estructural de las subunidades α del proteosoma de <i>Naegleria</i> contra <i>Bos taurus</i>	34
Tabla 3. Porcentajes de identidad estructural de las subunidades β del proteosoma de <i>Naegleria</i> contra <i>Bos taurus</i>	39
Tabla 4. Porcentajes de identidad y similitud encontrados entre subunidades α y β del proteosoma 20S de ambas especies de <i>Naegleria</i>	40
Tabla 5. Subunidades del proteosoma de <i>N. gruberi</i> y la subunidad ortóloga con mayor identidad y similitud	41
Tabla 6. Subunidades del proteosoma de <i>N. fowleri</i> y la subunidad ortóloga con mayor identidad y similitud	42

RESUMEN

El proteosoma 26S es un complejo multienzimático encargado del reconocimiento y degradación de proteínas intracelulares que participan en la regulación del ciclo celular, expresión de genes, estrés oxidativo, entre otros. Dentro de este complejo, el núcleo catalítico, o proteosoma 20S contiene los sitios específicos para la degradación de las proteínas. El núcleo 20S está involucrado en procesos como proliferación, diferenciación y capacidad infectiva de organismos patógenos. Sin embargo, hasta la fecha la presencia de este complejo no ha sido estudiada en el género *Naegleria*. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si el proteosoma 20S está presente en *Naegleria gruberi* y *Naegleria fowleri*, además de su posible participación en la viabilidad y proliferación de las amibas. Mediante estudios *in silico*, se logró determinar que *N. gruberi* tiene en su genoma las secuencias que codifican para 6 subunidades del tipo α y 7 secuencias para subunidades β ; por su parte, *N. fowleri* tiene 7 secuencias distintas para cada tipo de subunidad. Estas subunidades se encuentran altamente relacionadas con las subunidades ortólogas encontradas en otros organismos protozoarios. También, al co-incubar a los trofozoítos de ambas especies de *Naegleria* con los inhibidores específicos del proteosoma, Lactacistina y MG-132 a distintas concentraciones y a los tiempos de 24, 48 y 72 horas, se encontró que estos inhibidores no tienen un efecto significativo en la viabilidad de los trofozoítos. Sin embargo, al realizar la co-incubación de los trofozoítos de *N. gruberi* con ambos inhibidores a 10 μM , estos tuvieron un efecto amebostático en la proliferación de las amibas. Por otro lado, el inhibidor MG-132 a 25 μM solo retrasó la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri*. Además, al realizar un Western-blot se encontró a la subunidad $\alpha 1$ en extractos totales de ambas especies de *Naegleria*, la cual tuvo un peso de 29 kDa. Finalmente, se realizó el inmunomarcaje del proteosoma 20S en los trofozoítos de ambas especies y se encontró una localización citoplásmica. Por lo que se puede concluir que *N. gruberi* y *N. fowleri* poseen el complejo del proteosoma 20S, el cual tiene una localización citoplásmica y participa en la proliferación celular de las amibas.

ABSTRACT

The 26S proteasome is a multicatalytic complex involved in the recognition and degradation of intracellular proteins which participate in the regulation of the cell cycle, gene expression, oxidative stress, among others. Inside this complex, the catalytic nucleus or 20S proteasome contains the specific sites for the protein degradation. The 20S nucleus is involved in some functional processes like proliferation, differentiation and infective capacity of some protozoans. The presence of this complex has not been studied in the *Naegleria* genus. For all these reasons, the aim of the present work was to determinate if the 20S proteasome is present in *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri* and its possible participation in the viability and amoeba proliferation. The use of *in silico* studies, showed that *N. gruberi* has in its genome the sequences that codify for 6 α type subunits and other 7 sequences for β subunits, meanwhile *N. fowleri* has 7 α and 7 β different sequences. These sequences are highly related to their orthologues in other protozoans. Moreover, when we co-incubate trophozoites of both *Naegleria* species with the proteasome inhibitors, Lactacystin and MG-132 at different concentrations and time points of 24, 48 and 72 hours, we found that the inhibitors have no significant effects on the viability of trophozoites. While, *N. gruberi* trophozoites were incubated with both inhibitors at 10 μ M, we found an amoebostatic effect in the amoeba proliferation. Meanwhile, co-incubate 25 μ M of MG-132 inhibitor with *N. fowleri* trophozoites, this caused only a reduction of the proliferation of the amoeba. The Western-blot essay showed that both *Naegleria* species possesses the α 1 subunit, which had the 29 kDa of molecular weight. Finally, we also made the immunofluorescence 20S proteasome in the trophozoites of both *Naegleria* species and we found a cytoplasmic localization. With all these results we can conclude that both *N. gruberi* and *N. fowleri* possess the 20S proteasome, which has a cytoplasmic localization and participates in the cellular proliferation of the amoebae.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL GÉNERO *Naegleria*

Las amibas del género *Naegleria*, son microorganismos protozoarios pertenecientes al phylum Percolozoa, clase Heterolobosea, orden Schizopyrenida y a la familia Vahlkamfiidae. Este género incluye 36 especies (De Jonckheere, 2011; NCBI, 2017) que anteriormente se clasificaban de acuerdo a la morfología de sus quistes, la tolerancia a la temperatura, criterios inmunológicos, patogenicidad y patrones enzimáticos (Marciano-Cabral, 1988). Actualmente las especies de *Naegleria* se clasifican de acuerdo a la secuencia de los genes para SSrRNA (Subunidad Pequeña de RNA Ribosomal), así como por las secuencias de los ITS1 e ITS2 (Espaciadores Internos Transcritos 1 y 2) (De Jonckheere, 2011). Todas las especies patógenas de este género son termofílicas, pero no todas las especies termofílicas son patógenas (De Jonckheere, 2002), ya que la virulencia de las especies no se relaciona con su temperatura óptima de crecimiento (Marciano-Cabral, 1988). Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y cuerpos de agua dulce en todo el mundo (Marciano-Cabral, 1988).

Las especies *N. australiensis* y *N. italica* han sido reportadas como agentes patógenos capaces de causar la muerte de manera experimental a ratones (De Jonckheere, 2002; Visvesvara *et al.*, 2007). Por otro lado, *N. gruberi* es una especie no patógena para el ser humano, fue la primera especie del género *Naegleria* en ser identificada y es utilizada generalmente como control en ensayos de laboratorio (Fulton, 1977), además de que su genoma ya ha sido descrito (Fritz-Laylin *et al.*, 2010). Solamente la especie *N. fowleri* se ha reportado como patógena para los seres humanos (Visvesvara, 2010) ya que es el agente etiológico de una enfermedad aguda y fulminante que afecta al sistema nervioso central (SNC) denominada meningoencefalitis amibiana primaria (MAP).

1.1.1 *Naegleria gruberi*

N. gruberi fue aislada por primera vez a partir de heces o probablemente de agua por Schardinger en 1899. Schardinger realizó una descripción detallada de amibas que

podían convertirse a flagelado, en la cual narra: “estas amibas miden entre 12 y 24 μm de diámetro, contienen un único núcleo con un nucléolo prominente y forman una vacuola contráctil cada 3 minutos”. En dicha descripción, Schardinger nombró a este organismo *Amoeba gruberi*, sin embargo, el término *Naegleria* fue sugerido por Alexeieff en 1912 (Fritz-Laylin *et al.*, 2010) y un año después, Calkins propuso realizar una clasificación, en la que los organismos con fase flagelada fueron agrupados en el género *Naegleria* (De Jonckheere, 2014).

La forma predominante de *N. gruberi* es el trofozoito que mide 15 μm de diámetro, es activo metabólicamente y es capaz de dividirse. En esta fase, la amiba se desplaza por medio de pseudópodos (Figura 1) (Fulton, 1977). Además, *N. gruberi* es capaz de transformarse a una fase flagelada, con dos flagelos, aunque se han reportado más (Oddó, 2006), los cuales utiliza para desplazarse hacia medios más ricos en nutrientes. En medios deficientes en nutrientes o con poca humedad, *N. gruberi* es capaz de transformarse a una fase resistente llamada quiste y que además puede sobrevivir en ambientes de estrés (Figura 1). El quiste es uninucleado y mide entre 8 y 12 μm , es usualmente esférico y posee una doble pared de celulosa (Visvesvara, 2010), además de presentar un núcleo con un nucléolo menos pronunciado y una variedad de vacuolas citoplasmáticas, de tipo alimenticias y contráctiles (Marciano-Cabral, 1988).

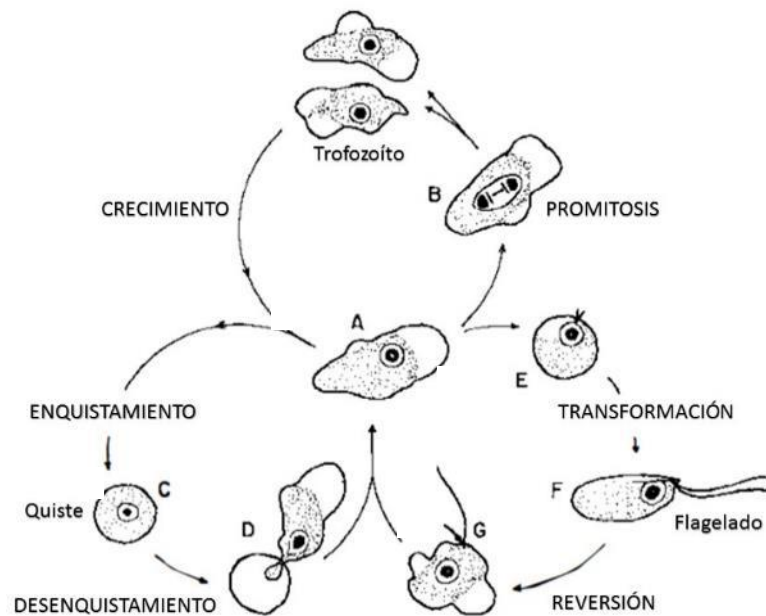


Figura 1. Ciclo de vida de *N. gruberi* (Modificado de Fulton, 1977).

1.1.2 *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri fue aislada por Fowler y Carter en 1965, a partir de 4 casos de niños de entre 8 y 9 años de edad que murieron por una meningitis piógena aguda cuyo agente etiológico era desconocido (Fowler y Carter, 1965). Posteriormente se denominó a la patología como meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) causada por *N. fowleri* (Carter, 1970).

N. fowleri es un ameboflagelado que se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, el cual ha sido aislado a partir de muestras de suelo y cuerpos de agua dulce naturales y artificiales (Visvesvara *et al.*, 2007), como son: piscinas, charcos, estanques, lagos, ríos, aguas termales, piscinas de hidroterapia, acuarios, aguas residuales, canales de riego, agua doméstica (Cope *et al.*, 2015) además de raspados nasales y de garganta de individuos sanos (Siddiqui y Khan, 2014). Es un organismo que resiste temperaturas superiores a 45°C (Visvesvara, 2010), en donde se desarrolla de manera óptima (De Jonckheere, 2002). Al igual que *N. gruberi*, presenta 3 estadios en su ciclo de vida: trofozoíto, flagelado y durante condiciones extremas, quiste (Figura 2).

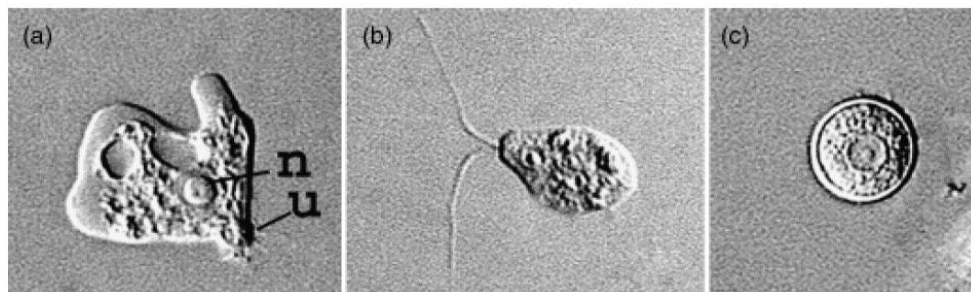


Figura 2. Estadios de la ameba *Naegleria fowleri*. (a) Trofozoíto; (b) Forma flagelada; (c) Quiste. n: núcleo, u: uroide (Visvesvara *et al.*, 2007).

En medios de cultivo axénicos, el trofozoíto mide entre 10 y 25 μm de diámetro y se reproduce por fisión binaria (De Jonckheere, 2011); presenta un rápido movimiento ameboideo mediante la producción de protuberancias citoplasmáticas en su extremo anterior, llamadas lobopodios. En su extremo posterior, presenta una protuberancia denominada uroide, la cual tiene la característica de ser altamente adherente. El citoplasma contiene numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso,

ribosomas, un aparato de Golgi primitivo, vacuolas alimentarias y una vacuola contráctil (Visvesvara, 2010). *N. fowleri* también se puede diferenciar a la fase flagelada y/o fase de quiste cuando las condiciones de crecimiento se vuelven adversas (Visvesvara *et al.*, 2007).

1.1.3 Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP)

La MAP es una enfermedad aguda y fulminante que se presenta en niños y adultos jóvenes sanos con historial de haber estado en contacto con agua dulce (Visvesvara *et al.*, 2007), principalmente por haber realizado actividades acuáticas; también se ha reportado que una mala purificación del agua, prácticas como abluciones, actividades recreativas o lavados nasales con agua contaminada, representan un riesgo para adquirir la amiba y desarrollar la enfermedad. Esta patología es fatal en más del 90% de los casos documentados (Siddiqui y Khan, 2014) y a pesar de que hasta el año 2011 se habían reportado 235 casos, solamente existen 15 casos de recuperación a esta patología en el mundo (Martínez-Castillo *et al.*, 2016). En México, hasta mediados del año 2017 se habían reportado 45 casos (Martínez-Castillo *et al.*, 2016; DGE, 2017); sin embargo, no existen datos epidemiológicos exactos sobre la MAP en nuestro país ni en el mundo, ya que en los casos presentados no se realizan diagnósticos adecuados ni el reporte de los mismos. El diagnóstico temprano y certero de esta enfermedad es trascendente para la vida del paciente, ya que con frecuencia los pacientes mueren entre el tercer y séptimo día después de la aparición de los síntomas (Yoder *et al.*, 2012).

A la fecha no existe un tratamiento específico para esta enfermedad, sin embargo, se ha reportado que el antifúngico amfotericina B tiene un efecto amebicida *in vitro* y un efecto terapéutico *in vivo* (Carter, 1969). Por lo anterior, ha sido la droga más usada en el tratamiento para la MAP, a pesar de que el porcentaje de mortalidad aún es muy alto. De manera más reciente, Debnath y colaboradores (2012) reportaron que el fármaco conocido como corifungin (que pertenece a la misma clase de antifúngicos que la amfotericina B) a las concentraciones de 6.25 a 25 μM tiene un efecto amebicida en los trofozoítos de *N. fowleri*. Además de que este fármaco causó un 100% de sobrevivencia en un modelo murino de MAP al tratar a los ratones con corifungin a 9 mg/kg/día

durante 10 días. Por esta razón, los autores sugieren el uso de corifungin como una nueva opción terapéutica contra la MAP causada por *N. fowleri*.

Sin embargo, el éxito de *N. fowleri* para causar daño al hospedero radica en su capacidad de evadir al sistema inmune innato, además de distintos mecanismos de patogenicidad con que cuenta la amiba.

1.1.4 Mecanismos de patogenicidad

La capacidad que posee *N. fowleri* para invadir y causar daño al hospedero depende de algunos mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia (Figura 3), entre los que se ha descrito:

- **Evasión de la respuesta inmune innata.** Mediante la formación de “capping” (Shibayama *et al.*, 2003) y evasión del complemento (Ferrante y Thong, 1979).
- **Adhesión.** Mediada por una proteína tipo integrina de 60 kDa que se encuentra en la membrana plasmática de la amiba (Han *et al.*, 2004). También cuenta con una molécula tipo integrina de 70 kDa que está involucrada en la adhesión a componentes de la matriz extracelular, como laminina-I, fibronectina y colágeno tipo IV; además esta proteína co-localiza en las estructuras tipo adhesión focal que forma *N. fowleri* (Jamerson *et al.*, 2012).
- **Fagocitosis.** Mediante las proyecciones citoplásmicas llamadas copas fagocíticas, que permiten a la amiba fagocitar bacterias, levaduras, eritrocitos y otros desechos celulares (Scaglia *et al.*, 1991).
- **Citotoxicidad.** *N. fowleri* produce una cisteína-proteasa de 30 kDa que causa efecto citopático en células de riñón de hámster (Aldape *et al.*, 1994), además de los Naeglerioporos A y B que tienen la capacidad de inducir la formación de poros en la membrana de linfocitos T humanos (Herbst *et al.*, 2002).
- **Productos de secreción.** Se ha reportado la presencia de cisteína-proteasas tipo catepsina B, que degradan IgA, IgG, IgM, colágeno, fibronectina, hemoglobina y albúmina (Lee *et al.*, 2014).

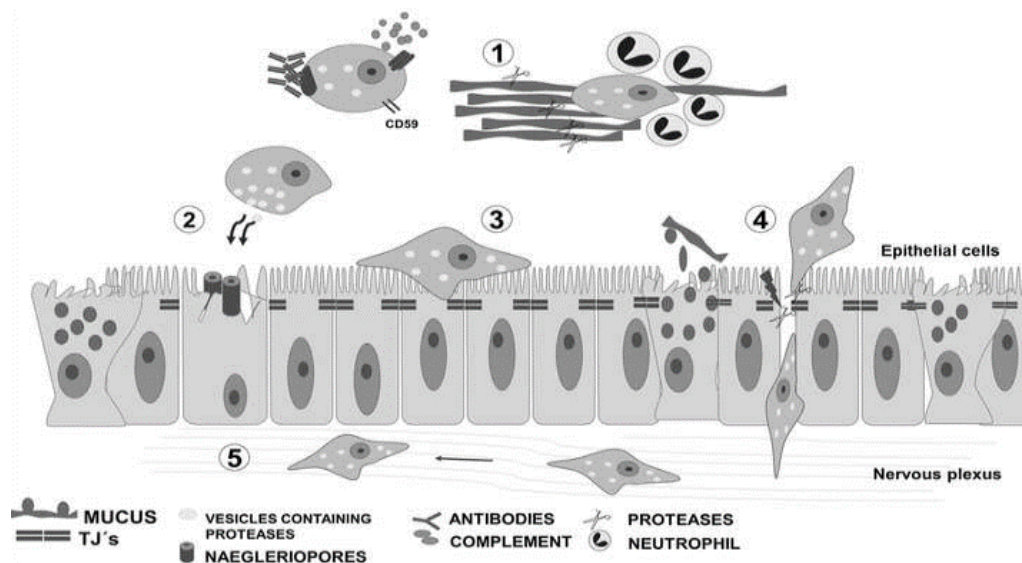


Figura 3. Mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* y el proceso de entrada hasta el plexo nervioso. 1. Evasión de la respuesta inmune innata mediante la producción de mucinas y la formación de capping; 2. Secreción de los Naegleriopores y formación de un poro en la membrana de las células de epitelio olfatorio; 3. Adhesión y citotoxicidad en el epitelio; 4. Daño a las uniones estrechas e invasión del neuroepitelio; 5. Migración de las amibas a través del plexo nervioso (Martínez-Castillo *et al.*, 2016).

Marciano-Cabral y Cabral en 2007, proponen que la regulación de las proteínas de la amiba puede ser un aspecto crítico para la conversión de aislados de *Naegleria* a su estado más virulento. Además, se requiere de una regulación eficaz de la síntesis y degradación de proteínas para el correcto funcionamiento de una célula.

En células eucariontes se describen dos principales vías para la degradación de proteínas: el aparato lisosomal y la vía autofágica para moléculas asociadas a membrana o proteínas extracelulares adquiridas por endocitosis; y el sistema ubiquitina-proteosoma (SUP) para la degradación de proteínas propias de la célula, ya sea citosólicas o nucleares (Lee y Goldberg, 1998; Makioka *et al.*, 2002).

1.2 EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA (SUP)

La producción y regulación de las proteínas en la célula necesita ser controlada para conservar un equilibrio celular y así mantenerse en concentraciones fisiológicas funcionales. Debido a las mutaciones o errores durante la transcripción, en el “splicing” de RNA o la traducción, algunas proteínas son ensambladas de manera incorrecta, por lo que la célula debe tener la capacidad para degradar estas proteínas potencialmente dañinas (Alberts *et al.*, 2015). La degradación de dichas proteínas no funcionales es

llevada a cabo por el sistema ubiquitina-proteosoma (Zwickl *et al.*, 1999), representando la vía principal para la degradación de proteínas (Gräwert y Groll, 2010), ya que se encarga de degradar alrededor del 90% de proteínas intracelulares (Lee y Goldberg, 1998; Jung y Grune, 2008).

La degradación de proteínas mediante el SUP participa en distintas funciones celulares, incluyendo la regulación del ciclo celular, respuesta inmune y la degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (también llamado “control de calidad”) (Nandi *et al.*, 2006). Los sustratos del SUP son modificados post-traduccionamente para su degradación por esta vía mediante la unión covalente de cadenas de poli-ubiquitina (Hanna y Finley, 2007). Otra manera de marcar una proteína para su degradación es mediante la fosforilación de un sitio específico, lo cual desenmascara una señal de degradación oculta de manera normal. Otra alternativa es mediante la ruptura de un péptido unido a la proteína, haciendo que esta ruptura cree un nuevo extremo N-terminal, convirtiéndose en proteína blanco. Esta ruptura es reconocida como un residuo N-terminal “desestabilizante”, por lo que la enzima E3 realiza la ubiquitinación de la proteína blanco (Alberts *et al.*, 2015).

Para la formación de cadenas de poliubiquitina se requiere, en primer lugar, de la activación de una molécula de ubiquitina, lo cual ocurre cuando una proteína llamada enzima activadora de ubiquitina (E1) utiliza la energía proveniente de la hidrólisis de ATP para formar un enlace tioéster con el extremo carboxilo-terminal de un residuo de glicina en la ubiquitina. E1 entonces transfiere esta ubiquitina activada a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) mediante transesterificación. Finalmente, las enzimas accesorias llamadas ubiquitina-ligasas (E3) se encargan de formar enlaces isopeptídicos entre el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina en la proteína blanco y el grupo carboxilo-terminal activado en la ubiquitina (Finley *et al.*, 2012). Las enzimas E3 detectan señales de degradación y transfieren la ubiquitina activada a la proteína blanco o a otras ubiquitinas. Después de este paso, E2 y E3 son liberadas y el ciclo se repite hasta que el sustrato es poli-ubiquitinado (Huber *et al.*, 2012) (Figura 4). Se requiere una cadena de al menos 4 moléculas de ubiquitina para que una proteína pueda ser reconocida para su degradación (Hicke, 2001), aunque también se ha

encontrado en *Saccharomyces cerevisiae* que el proteosoma puede degradar proteínas sin marca de ubiquitina (Lee y Goldberg, 1998; Schmidt *et al.*, 2005).

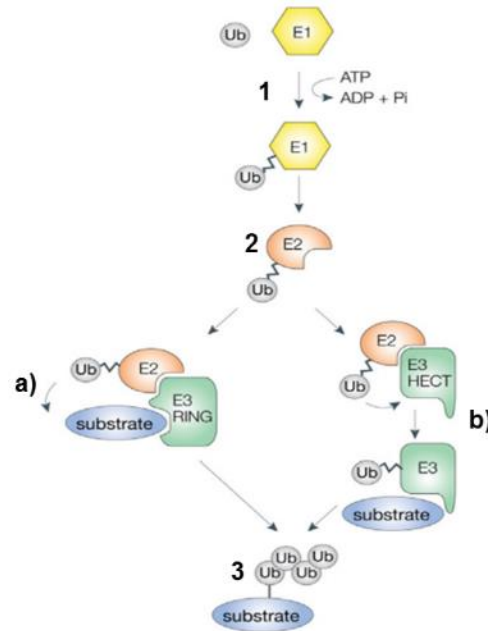


Figura 4. Proceso de marcate de las proteínas blancas con ubiquitina. 1. La enzima E1 activa a una ubiquitina y se une a ella mediante la degradación de ATP a ADP y Pi. 2. La ubiquitina es transferida a E2 y aparece la formación de dos posibles complejos: **a)** E2 más una enzima E3 con dominio RING. En este caso, se forma un complejo entre las enzimas E2 más una ubiquitina y E3 con la proteína blanco, sin embargo, la molécula de ubiquitina se transfiere directamente de E2 al sustrato y no entra en contacto con E3; **b)** E2 más una enzima E3 con dominio HECT. La molécula de ubiquitina es transferida desde E2 a E3, posteriormente E3 se une a la proteína blanco para la transferencia de la ubiquitina. 3. Los pasos se repiten y se forma una cadena de poli-ubiquitinas (Modificado de Woelk *et al.*, 2007).

1.2.1 El proteosoma

El proteosoma es el componente proteolítico del SUP. Normalmente el SUP se encuentra formado por un núcleo catalítico central, conocido como Proteosoma 20S; y uno o dos complejos reguladores en los extremos (Hendil *et al.*, 2009). En eucariontes, han sido descritos varios complejos reguladores, como el complejo regulador PA700 (o Proteosoma 19S), PA200 y PA28, también conocido como Proteosoma 11S o inmunoproteosoma (Fort *et al.*, 2015); sin embargo, se ha estudiado de manera más amplia al complejo regulador 19S. La unión de un núcleo proteolítico más uno o dos complejos 19S en los extremos se denomina proteosoma 26S (Figura 5).

El complejo regulador 19S se encuentra conformado por 10 subunidades en la base y 9 en la tapa. Este complejo está unido al núcleo proteolítico mediante la base, aunque la

subunidad Rpn6 de la tapa también tiene contacto con el proteosoma 20S (Pathare *et al.*, 2012).

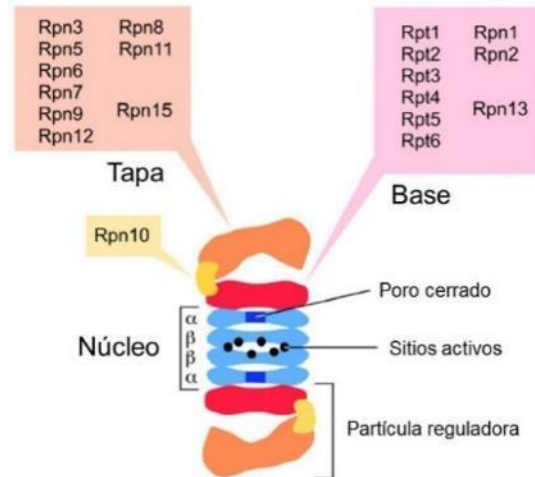


Figura 5. Proteosoma 26S. Se muestran los componentes de la base y la tapa de los complejos reguladores 19S. En el núcleo catalítico o proteosoma 20S se señalan los anillos conformados por subunidades α en ambos extremos y los anillos de subunidades β al centro, además de los sitios activos de estos. Rpn: subunidades no-ATPasa; Rpt: subunidades ATPasa (Modificado de Hanna y Finley, 2007).

La función del complejo regulador 19S es el reconocimiento de las proteínas blanco, además del desdoblamiento de las mismas. De manera particular, las subunidades Rpn 10, 13 actúan como receptores de ubiquitina, ya que reconocen a las cadenas de poliubiquitina en las proteínas diana. Por otra parte, las enzimas Rpt2, Rpt3 y Rpt5 son cruciales para permitir el paso del sustrato hacia el núcleo 20S (Smith *et al.*, 2007).

La subunidad Rpn11 se encarga de la desubiquitinación de la proteína blanco, proceso que debe ocurrir antes de la proteólisis del sustrato.

Hablando específicamente del núcleo proteolítico o proteosoma 20S, este complejo fue descrito por primera vez por Harris en 1968 a partir de la observación del producto de la hidrólisis de fantasmas de eritrocitos humanos mediante microscopía electrónica de transmisión. Este autor describió dos estructuras independientes (un anillo o 4 anillos conformando un cilindro), además sugirió la naturaleza proteica de esta estructura, su posible conformación a partir de subunidades y su ubicación citoplásmica. A pesar de lo anterior, se ignoraba completamente la función del proteosoma, pero se sugería que la

conformación cilíndrica le brindaba estabilidad a la estructura, como ocurre con algunas partículas virales. Para el año 1986, Kopp y colaboradores describieron al proteosoma como “un complejo de proteinasa multicatalítica (o MCP, nombre que permaneció durante varios años) encontrado en músculo esquelético de rata; es una enzima no-lisosomal de alto peso molecular activa a pH neutro o alcalino, compuesta por cuatro anillos o discos”. Fue hasta el año de 1988 cuando Arrigo y colaboradores lo denominaron proteosoma, puesto que engloba las características de la partícula: su actividad proteolítica y su naturaleza de complejo proteico (Lupas y Baumeister, 1998). Se ha descrito que el proteosoma juega un papel crucial en la eliminación de proteínas mal plegadas, el control de las proteínas reguladoras, el procesamiento de proteínas mediante proteólisis parcial específica, eliminación de proteínas aberrantes que han entrado al retículo endoplásmico rugoso, control del ciclo celular, así como la preparación de péptidos para su presentación en el complejo principal de histocompatibilidad tipo I (Gille *et al.*, 2003). El proteosoma se encuentra en múltiples copias dispersas en el citosol y núcleo de la célula, además de estar asociado a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, constituyendo alrededor del 1% del total de proteínas de una célula (Alberts *et al.*, 2015; Wilk y Orłowski, 1980). En células HeLa, se ha encontrado que el proteosoma representa una concentración de entre 1–20 µg por 1 mg de proteína soluble y tiene una vida media de cerca de 5 días (Heink *et al.*, 2005). El proteosoma tiene participación en varios procesos celulares, algunos de ellos esenciales para la viabilidad celular. La distribución intracelular del proteosoma es un proceso altamente dinámico que varía de acuerdo al tipo, condiciones de crecimiento, densidad, condiciones de estrés, diferenciación y fase del ciclo de vida en el que se encuentra la célula (Pereira-Neves *et al.*, 2015).

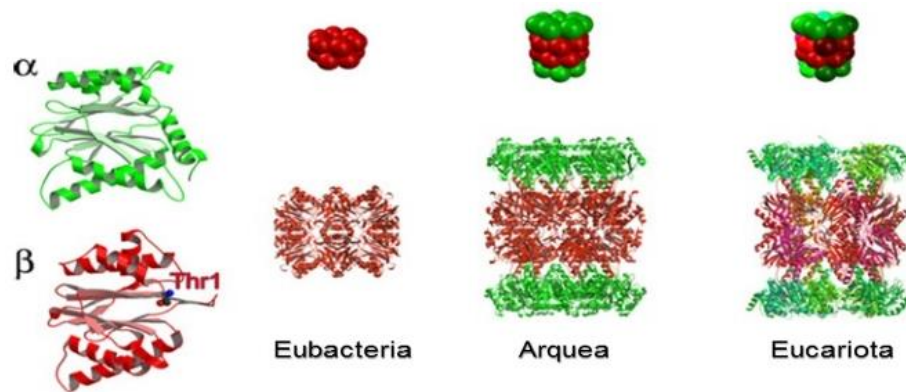


Figura 6. El proteosoma en los 3 reinos de la vida. **a)** Conformación cuaternaria de las subunidades tipo α y β proteosoma 20S. Las subunidades β se caracterizan por tener un residuo de Treonina en el extremo amino-terminal. **b)** Complejo HiVU encontrado en bacterias y proteosoma 20S encontrado en arqueas y eucariontes. (Modificado de Gräwert y Groll, 2010).

El proteosoma es un complejo altamente conservado en los 3 reinos de la vida (Figura 6) y presenta una gran homología en la conformación de su estructura cuaternaria y en la geometría de sus sitios activos (Groll *et al.*, 2005).

El proteosoma 20S de las arqueas se encuentra conformado por 14 subunidades α iguales y 14 subunidades tipo β idénticas con sitios activos similares, por lo que cuenta con 14 subunidades proteolíticas con actividad de tipo quimiotripsina (Löwe *et al.*, 1995). En el Proteosoma 20S de eucariontes, se encuentran 7 subunidades tipo α distintas y 7 subunidades β diferentes, cada subunidad es codificada por un gen. Este tipo de proteosoma tiene solo 6 subunidades proteolíticas activas: 2 subunidades con actividad de tipo caspasa ($\beta 1$) y que reconocen residuos ácidos; 2 subunidades con actividad tipo tripsina ($\beta 2$) las cuales reconocen residuos básicos y; 2 subunidades con actividad de tipo quimiotripsina ($\beta 5$) que reconocen residuos hidrofóbicos (Raule *et al.*, 2015). (Figura 7). Los sitios proteolíticos se encuentran “secuestrados” en el interior del complejo para asegurar que el acceso a estos sitios se encuentre bajo un estricto control y regulación, evitando así la proteólisis no específica (Finley *et al.*, 2012).

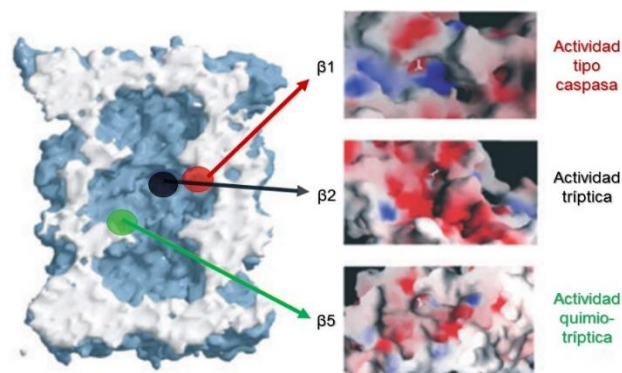


Figura 7. Subunidades catalíticas del proteosoma 20S: ubicación dentro del complejo y tipo de actividad catalítica (Modificado de Groll *et al.*, 2005).

De manera histórica, la primera descripción de la estructura del proteosoma mediante análisis cristalográfico se realizó en la arquea *Thermoplasma acidophilum* (Löwe, 1995). Posteriormente, se describió la estructura del proteosoma 20S de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Groll *et al.*, 1997); mientras que, en mamíferos, la primera estructura descrita fue la de los bovinos (Unno *et al.*, 2002).

Actualmente se sabe que el proteosoma 20S está constituido por cuatro anillos, compuestos a su vez, cada uno por 7 proteínas individuales; las subunidades se ensamblan para formar una estructura en forma de barril (Lupas *et al.*, 1993) de aproximadamente 160 x 100 Å (Borissenko y Groll, 2007). Esta estructura tiene un peso aproximado de 700 kDa. Los dos anillos internos están formados por subunidades β (numeradas de la 1 a la 7). Los anillos externos poseen 7 subunidades α (1 a la 7) y cada uno trabaja como una entrada selectiva para dar acceso a las proteínas blanco (Figura 8) (Zwickl *et al.*, 1999; Finley *et al.*, 2012).

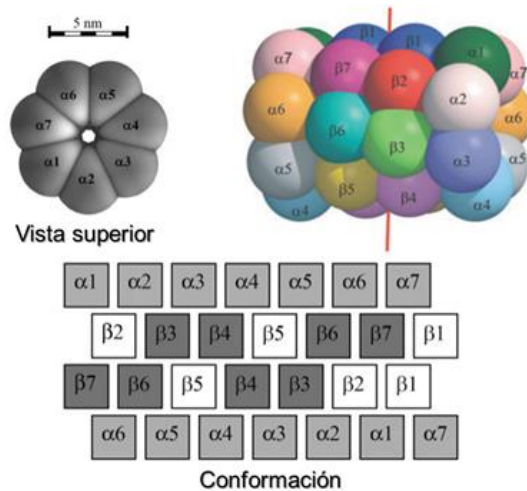


Figura 8. Conformación del proteosoma 20S. Se observa una vista superior que señala el ancho del complejo, además de la vista lateral y una vista extendida que muestra el arreglo de las subunidades α y β en sus respectivos anillos (Modificado de Jung y Grune, 2008 y Groll *et al.*, 2005).

En eucariontes, las subunidades α son inactivas catalíticamente (Bochtler *et al.*, 1999) pero tienen un papel estructural de ensamble para el proteosoma 20S (Pereira-Neves *et al.*, 2015) y se sabe que los anillos de las subunidades α regulan la entrada del sustrato a la cámara interna del complejo (Groll *et al.*, 2000). Además, los extremos N-terminal de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 7$ regulan de manera estricta la entrada de las proteínas a la cámara proteolítica interna, la cual tiene un diámetro máximo de alrededor de 53 Å (Nandi *et al.*, 2006).

Se ha reportado que el proteosoma tiene una función proteolítica solamente cuando se ha ensamblado por completo, ya que la asociación de los anillos β expone y activa a un residuo de treonina en el extremo N-terminal (Ramos *et al.*, 1998), el cual le brinda la característica de hidrolasa Ntn (o hidrolasa con un nucleófilo de treonina en el extremo amino terminal) a las subunidades β del proteosoma. A pesar de pertenecer a la misma familia de proteínas, solo las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ poseen actividad proteolítica y se han descrito cinco aminoácidos que son cruciales para dicha actividad, los cuales se encuentran conservados en sitios proteolíticamente activos, estos son: treonina-1, lisina-33, glicina-128, serina-129 y glicina-130 (Gille *et al.*, 2003; Hanna y Finley, 2007). Una vez que la proteína blanco ha sido reconocida y desdoblada, el producto de su degradación está formado por péptidos con una longitud que varía entre 2–30 aminoácidos aunque muestra 3 picos de distribución que varían entre 2–3, 8–10 y 20–

30 aminoácidos (Luciani *et al.*, 2005). La generación de péptidos pequeños permite que puedan ser utilizados en procesos de biosíntesis (Hanna y Finley, 2007).

1.2.2 El proteosoma en protozoarios

Se conoce que, dentro del reino eucariota, el proteosoma 20S de mamíferos y protozoarios presenta diferencias que involucran estructura, genes, inmunoreactividad y actividad de peptidasa (Groll *et al.*, 2005). Estas características sugieren la posibilidad de poder diseñar drogas con alta especificidad hacia el proteosoma de protozoarios patógenos sin causar daño al proteosoma del hospedero (Paugam *et al.*, 2003).

Previamente se ha reportado la presencia del proteosoma 20S en algunos organismos protozoarios (Tabla 1), esto de manera directa por ejemplo mediante la purificación del complejo y de manera indirecta, midiendo el efecto de inhibidores del proteosoma en procesos biológicos de dichos microorganismos.

Organismo	Hallazgos
<i>Dictyostelium discoideum</i> ¹	Purificación, análisis de la conformación por E2D, caracterización de la actividad proteolítica; localización por inmunofluorescencia
<i>Trypanosoma brucei</i> ²	Purificación y caracterización por WB, E2D, caracterización de la actividad proteolítica y localización por MET
<i>Trypanosoma cruzi</i> ³	Purificación y caracterización por E2D y sustratos fluorogénicos; inhibidores de proteosoma causan arresto del ciclo celular y bloquean la transformación de tripomastigotes a amastigotes
<i>Entamoeba histolytica</i> ⁴	Purificación. Comprueban presencia mediante WB y miden actividad tipo quimiotripsina
<i>Plasmodium falciparum</i> ⁵ <i>Plasmodium yoelii</i> ⁵ <i>Plasmodium berghei</i> ⁵	Lactacistina bloquea la transformación de merozoíto a trofozoíto y de trofozoíto a esquizonte; además, disminuye la capacidad infectiva de los esporozoítos de <i>P. yoelii</i>
<i>Giardia lamblia</i> ⁶	Purificación y demostración de su presencia por E2D y WB
<i>Entamoeba invadens</i> ⁷	Uso de Lactacistina inhibe el enquistamiento; caracterización mediante E2D; localización por MET
<i>Leishmania mexicana</i> ⁸	Purificación y caracterización mediante E2D y uso de sustratos fluorogénicos; arresto del ciclo celular de amastigotes y promastigotes con el uso de inhibidores
<i>Cryptosporidium parvum</i> ⁹	Clonación de una proteína tipo subunidad β y miden expresión del mRNA en esta proteína en esporozoítos
<i>Leishmania donovani</i> ¹⁰	Clonación de una proteína tipo subunidad α , northern y WB para medir su expresión
<i>Toxoplasma gondii</i> ¹¹	Caracterización mediante WB e inmunofluorescencia; uso de sustratos para definir el tipo de actividad
<i>Leishmania chagasi</i> ¹²	Lactacistina bloquea la proliferación de amastigotes, pero no tiene efecto en la invasión de macrófagos de ratón
<i>Leishmania major</i> ¹³	La inhibición del proteosoma induce la acumulación de un regulador de la transcripción en el núcleo de los promastigotes
<i>Tritrichomonas foetus</i> ^{14,15}	Purificación y caracterización de actividad proteolítica; caracterización <i>in silico</i> ; localización por inmunofluorescencia; Lactacistina detiene proliferación y causa arresto del ciclo celular
<i>Acanthamoeba castellanii</i> ¹⁶	Uso de gliotoxina inhibe actividad proteolítica y causa el arresto del ciclo celular; también induce la formación de pseudoquistes
	Inhibidores del proteosoma tienen efecto amebostático y detienen el enquistamiento; no afectan actividad citotóxica de trofozoítos

Tabla 1. Primeros reportes del proteosoma 20S en organismos protozoarios. Los datos son presentados por orden cronológico. E2D: Electroforesis en dos dimensiones; MET: Microscopía electrónica de transmisión. ¹Schauer *et al.*, 1993; ²Hua *et al.*, 1996; ³González *et al.*, 1996; ⁴Scholze *et al.*, 1996; ⁵Gantt *et al.*, 1998; ⁶Emmerlich *et al.*, 1999; ⁷Gonzalez *et al.*, 1999; ⁸Robertson, 1999; ⁹Chung *et al.*, 2000; ¹⁰Christensen *et al.*, 2000; ¹¹Shaw *et al.*, 2000; ¹²Silva-Jardim *et al.*, 2004; ¹³Dubessay *et al.*, 2006; ¹⁴Pereira-Neves *et al.*, 2015; ¹⁵Pereira-Neves *et al.*, 2016; ¹⁶Siddiqui *et al.*, 2016.

Estos hallazgos sugieren que *N. gruberi* y *N. fowleri* al igual que otros protozoarios, cuentan con el SUP para la degradación de proteínas. Por otra parte, señalan al proteosoma 20S como blanco farmacológico para el diseño racional de drogas para la prevención o tratamiento de enfermedades producidas por protozoarios.

Cabe remarcar que en la gran mayoría de los estudios resumidos en la Tabla 1, se determinó la presencia y/o participación del proteosoma en procesos biológicos mediante el uso de inhibidores de este complejo. Esta vía resulta factible para estudios sobre el proteosoma debido a la alta especificidad y afinidad que tienen los inhibidores.

1.2.3 Inhibidores del proteosoma

Se ha reportado previamente el diseño, especificidad y uso de inhibidores del proteosoma, entre los que figuran principalmente: Lactacistina, clasto-lactacistina- β -lactona, MG-132, epoxomicina, salinosporamida A y B, TMC-95, syrbantinas (Gräwert y Groll, 2010), bortezomib, epoxomicina, homobelactosina C, omuralida y PS-519, entre otros (Moore *et al.*, 2008). Cada inhibidor tiene un blanco específico dentro del proteosoma, aunque la mayoría están dirigidos a la subunidad β 5 (actividad tipo quimiotripsina), debido a que es el principal tipo de actividad proteolítica en el proteosoma de eucariontes superiores (Wilk y Orłowski, 1980; Silva-Jardim *et al.*, 2004).

Particularmente el inhibidor Lactacistina, no inhibe ningún otro tipo de proteasa conocida, además del proteosoma (Fenteany *et al.*, 1995). El primer reporte de este inhibidor fue en 1991, cuando Omura y colaboradores describieron los efectos de un compuesto aislado a partir del medio de cultivo de una cepa de *Streptomyces*, sobre células Neuro 2A de neuroblastoma de ratón. Este compuesto indujo la formación de neuritas en las células y se determinó que se trataba de un metabolito microbiano con actividad de factor neurotrófico. El producto fue caracterizado y nombrado Lactacistina ($C_{15}H_{24}N_2O_7S$), debido a que en su estructura posee un enlace tioéster que une restos de γ -lactámicos con N-acetilcisteína. Lactacistina es un compuesto de naturaleza no peptídica y se une al grupo hidroxilo de la Treonina 1, impidiendo que este residuo se una al sustrato y comience con el ataque nucleofílico (Kisselev y Goldberg, 2001) (Figura 9).

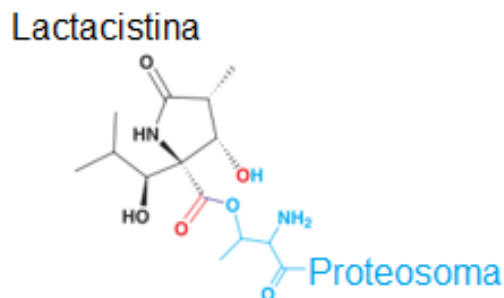


Figura 9. Mecanismo de inhibición de la Lactacistina sobre la Treonina 1 de la subunidad $\beta 5$ (Modificado de Kisselev y Goldberg, 2001).

Por otro lado, el inhibidor MG-132 es un péptido aldehído que además inhibe enzimas proteolíticas como serina y cisteína proteasas. La inhibición se logra mediante la reacción del grupo hidroxilo del sitio activo de la Treonina 1, en donde forma enlaces hemiacetales reversibles (Figura 10).

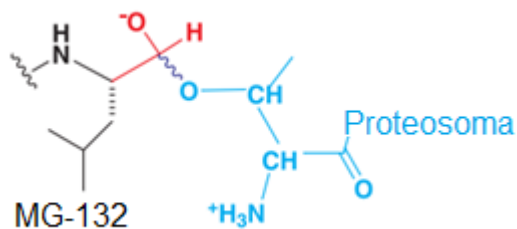


Figura 10. Mecanismo de inhibición de MG-132 sobre la Treonina 1 de las subunidades tipo β catalíticas (Modificado de Kisselev y Goldberg, 2001).

No se ha descrito por completo en qué subunidad β actúa el inhibidor MG-132, sin embargo, en un modelo de proteosoma 20S purificado a partir de eritrocitos de humano se encontró que este inhibidor tiene un efecto muy notorio sobre la actividad proteolítica de tipo tripsina (subunidad $\beta 2$), lo cual se determinó mediante el uso de sustratos fluorogénicos y la co-incubación del inhibidor con los proteosomas purificados (Di Giovanni *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

El proteosoma 20S es un complejo proteico multienzimático indispensable para el buen funcionamiento celular y su presencia ha sido descrita previamente en otros protozoarios. Por lo que es de nuestro interés conocer si este complejo regulador de proteínas también se encuentra en *N. gruberi* y *N. fowleri*, además de algunos procesos biológicos en los que podría estar involucrado.

3. HIPÓTESIS

Las amibas de vida libre *N. gruberi* y *N. fowleri* poseen el proteosoma 20S, el cual participa en la proliferación celular.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar las subunidades α y β del proteosoma 20S en *N. gruberi* y *N. fowleri*, además de su participación en la proliferación celular.

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar y caracterizar *in silico* las subunidades del proteosoma 20S de *N. gruberi* y *N. fowleri*.
2. Identificar la presencia de subunidades α y β del proteosoma de *N. gruberi* y *N. fowleri*.
3. Determinar si los inhibidores específicos de proteosoma, Lactacistina y MG-132 afectan la viabilidad y proliferación de los trofozoítos de *N. gruberi* y *N. fowleri*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Análisis bioinformático

Se realizó la búsqueda de las secuencias de aminoácidos correspondientes a las subunidades α y β que conforman el proteosoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales fueron utilizadas como referencia para el análisis bioinformático. Las secuencias

obtenidas fueron alineadas con el genoma de *N. gruberi* (aislado NEG-M) en la base de datos Protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) y con el genoma de *N. fowleri* ATCC 30863 en la base de datos Eupath (<http://www.eupathdb.org/>).

Por otro lado, se realizó un alineamiento múltiple utilizando los genomas de *D. discoideum*, *G. lamblia*, *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. major*, *L. braziliensis*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *P. berghei*, *P. vivax*, *P. yoelii*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *E. histolytica*, *E. invadens*, *T. vaginalis*, *T. foetus*, *C. parvum*, *T. annulata* y *B. bovis* obtenidos en la base de datos Eupath (<http://www.eupathdb.org/>).

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los aminoácidos correspondientes a las subunidades α y β que conforman el proteosoma 20S de las dos especies de *Naegleria*, además de los organismos mencionados. Los parámetros considerados para elegir las secuencias, fueron los siguientes: evidencia experimental de la existencia de la subunidad mediante espectrometría de masas o microarreglos, la identificación de los dominios y motivos específicos altamente conservados para cada una de las subunidades, así como también el número de aminoácidos presentes en cada secuencia.

Para la caracterización *in silico* de los dominios y motivos que posee cada subunidad del proteosoma 20S de *N. gruberi* y de *N. fowleri*, las secuencias de aminoácidos de cada subunidad (α o β , respectivamente) fueron ingresadas en los programas Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

Para realizar los modelamientos estructurales en 3D de cada subunidad, se utilizaron los servidores I-TASSER (Zhang, 2008), Phyre2 (Kelley, 2015) y SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Se eligieron los modelamientos de mayor homología estructural con cada subunidad α o β de *S. cerevisiae* y la edición y análisis de las estructuras, además de su empalme con las subunidades de *S. cerevisiae* se realizó con el programa UCSF Chimera 1.11.2 (Pettersen *et al.*, 2004).

Posteriormente, con el objetivo de identificar posibles regiones conservadas entre las secuencias, fue utilizado el programa MEGA versión 7 (Kumar *et al.*, 2015), además de que este software permitió la localización de motivos o residuos específicos cuya función en el proteosoma haya sido previamente caracterizada.

Posteriormente, se realizó un alineamiento de cada subunidad α y cada subunidad β de ambas especies de *Naegleria*. Además, se realizaron otros alineamientos múltiples tomando como referencia la secuencia de cada subunidad del proteosoma de *N. gruberi* y *N. fowleri*. Estas secuencias fueron comparadas con las secuencias ortólogas de los protozoarios enlistados previamente. Los alineamientos se realizaron mediante el uso de la herramienta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

El análisis *in silico* permitió determinar los porcentajes de identidad y similitud entre subunidades de *N. gruberi* y *N. fowleri*, además del porcentaje entre las subunidades ortólogas de los otros protozoarios analizados. Finalmente, para la construcción del árbol filogenético de las subunidades α y β de todos los organismos protozoarios mencionados, se utilizó el programa MEGA versión 7.

5.2 Cultivo de amibas

Se utilizó una cepa patógena de *N. fowleri* ATCC 30808 y una cepa de la especie no patógena *N. gruberi* (Proporcionada por el Dr. G. Visvesvara, CDC Atlanta, USA). Los trofozoítos fueron crecidos en cultivo axénico en medio de Bactocasitona (Becton Dickinson) al 2% (m/v) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Microlab) al 10% (v/v). Los trofozoítos de *N. fowleri* fueron crecidos a 37°C, mientras que los cultivos de *N. gruberi* fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (48 horas para ambas especies).

Además, se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1:IMSS, los cuales fueron crecidos en medio TYI-S-33 (Diamond, 1978) suplementado con SFB al 10% (Microlab) e incubados a 37°C durante 72 horas.

5.3 Cultivo celular

Se utilizaron células Huh-7, las cuales provienen de hepatocarcinoma de humano. Las células fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 2 mM de glutamina, al cual se le agregó penicilina-estreptomicina, anfotericina B y SFB al 5%; las células se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 100%.

5.4 Obtención de extractos totales

a) Obtención de extractos de trofozoítos. Los cultivos de trofozoítos de ambas especies de *Naegleria*, además de los trofozoítos de *E. histolytica* se utilizaron en fase logarítmica de crecimiento. Los cultivos se enfriaron en hielo durante 40 minutos para despegar a las amibas y recuperarlas en tubos Falcon de 15 ml. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 2,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las amibas fueron resuspendidas en 250 µl de amortiguador de lisis celular cOmplete Lysis-M (Sigma-Aldrich) (que inhibe serina y cisteína-proteasas, metaloproteasas y calpaínas) para finalmente ser recuperadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Las amibas fueron lisadas por choque térmico, colocando los tubos 30 segundos en agua hirviendo y 30 segundos en nitrógeno líquido (estos dos tiempos representan un ciclo). Se realizaron 4 ciclos para *E. histolytica*, 5 ciclos para *N. fowleri* y 6 para *N. gruberi*. Una vez obtenidos los extractos, se agregaron 50 µl a cada muestra de un cocktail de inhibidores de proteasas que contenía 10 mM de p-hidroximercuribenzoato (PHMB), 5 mM de N-etilmaleimida (NEM), 2 mM de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 5 µM de iodoacetamida (IAA), 6 µM de Aprotinina y 2 mM de L-trans-epoxysuccinyl-L-leucilamido [4-guanidino]-butano (E-64), para inhibir por completo la actividad de las proteasas. Los extractos fueron utilizados para Western-blot el mismo día de su obtención.

b) Obtención de extractos de células. Los cultivos celulares se lavaron 2 veces con PBS para posteriormente agregar 200 µl de amortiguador de lisis celular + inhibidores de proteasas para lisar las células con un raspador de células ("cell scrapper"). El lisado celular se recuperó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml que se mantuvo en agitación constante durante 2 horas a 4°C. Después de este tiempo, el extracto fue centrifugado a 15,000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se realizó un homogenizado y se utilizó para Western-blot el mismo día de su obtención.

c) Preparación de extractos para electroforesis. Se determinó la concentración de proteína presente en los extractos celulares mediante la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976). Posteriormente, se tomaron 100 µl de cada muestra a los que se les agregó 25 µl de amortiguador de corrida Laemmli 4X (Bio-Rad) y 12.5 µl de

β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Las muestras se calentaron en baño maría a ebullición durante 5 minutos y se dejaron enfriar para ser utilizadas para la electroforesis de una dimensión.

5.5 Western Blot (WB)

Para la electroforesis se utilizaron 2 geles de poliacrilamida al 15%, en los que se colocaron 60 μ g de proteína de cada extracto por carril. Se realizó una corrida a 50 V durante 15 min para el gel concentrador; seguida de una corrida a 100 V por 3 h para el gel separador, utilizando un amortiguador de corrida 1X con SDS en una cámara de corrimiento electroforético. Uno de los geles resultantes fue teñido con azul de Coomassie por aproximadamente 3 h y posteriormente desteñido con solución desteñidora (compuesta de metanol y ácido acético). Utilizando el otro gel, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Millipore), en una cámara de transferencia a 500 mA durante 1.5 h. Para comprobar que hubo una transferencia adecuada, la membrana fue teñida con Rojo de Ponceau y desteñida con PBS en agitación. Después, la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada (Svelty) al 10% en PBS-Tween 20 al 0.05% durante toda la noche a 4°C y en agitación constante. Al día siguiente, se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%: 2 lavados de 10 min y 2 de 5 min, respectivamente. Para la detección de las bandas, la membrana fue incubada con un anticuerpo policlonal de conejo anti-subunidad α -1 de humano a una dilución 1:2000 (Abcam), durante 3 h en agitación constante y a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 10 min y 2 lavados de 5 min con PBS-Tween 20 al 0.05% en agitación constante para remover el anticuerpo primario. Después, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario chivo anti-conejo acoplado a peroxidasa a una dilución 1:10,000 en PBS-Tween 20 al 0.05% durante 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron 10 lavados de 5 min con PBS-Tween 20 al 0.05% y se realizó el revelado con un kit de luminol (Santa Cruz) y con el scanner C-DiGit (LI-COR) con un tiempo de exposición de 12 min. Como control de especificidad se utilizó una membrana que fue incubada únicamente con el anticuerpo secundario.

Después del revelado, la membrana fue sometida a la técnica de *stripping*, la cual consistió en retirar el luminol mediante 2 lavados de 1 min, seguido de 2 lavados de 5 min; ambos con PBS-Tween 20 al 1% en agitación constante. Después se incubó a la membrana en solución de “stripping” durante 30 min a 60°C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se realizaron 8 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%: los primeros 2 durante 1 min; después 2 por 15 min y finalmente 4 lavados de 5 min cada uno. Se realizó de nuevo el bloqueo durante toda la noche a 4°C y se realizó la inmunodetección siguiendo el protocolo descrito con anterioridad, pero utilizando un anticuerpo primario de ratón anti-actina a la dilución 1:1000. Además de un anticuerpo secundario chivo anti-ratón acoplado a peroxidasa a la dilución 1:2500. Los lavados y el revelado fueron similares a lo descrito anteriormente.

5.6 Localización del proteosoma mediante microscopía confocal

A partir de un cultivo de *N. gruberi* o de *N. fowleri* en fase logarítmica de crecimiento, se sembraron 5×10^5 trofozoítos en 3 cubreobjetos pre-tratados con Silane (Sigma-Aldrich). Se colocó un cubreobjetos por pozo en una placa de 24 pozos y las muestras se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente o a 37°C, respectivamente para permitir la adherencia de los trofozoítos. Después, las muestras se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS y fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS; las muestras fueron permeabilizadas con PBS-Tritón X-100 al 0.2% durante 10 min a temperatura ambiente y después se realizaron 3 lavados con PBS, cada uno de 5 min. Se utilizó albúmina al 1% durante 1 hora a 37°C para bloquear las muestras. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS, 5 min cada uno. Después, los trofozoítos fueron incubados con el anticuerpo primario conejo anti-subunidad α -1 a la dilución 1:200 o con el anticuerpo primario conejo anti-subunidad β -2 a la dilución 1:100, ambos anticuerpos disueltos en albúmina al 1%. A las amibas tomadas como control negativo se les agregó únicamente albúmina. Las muestras se incubaron durante 2 h a 37°C y después fueron lavadas 3 veces con PBS, 5 min por lavado. Posteriormente, todas las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario (chivo anti-conejo) acoplado a FITC a una dilución 1:200. Después de este

tiempo, se retiró el anticuerpo secundario y se lavaron las muestras 3 veces con PBS, 5 min por lavado. Se retiró el PBS y los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio al 0.0001% durante 10 min a temperatura ambiente; se realizaron 2 lavados, retirando de inmediato el PBS. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados en un portaobjetos usando Vectashield (Vector Laboratory); las muestras se mantuvieron en la oscuridad a 4°C hasta su análisis con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa ZEN (Zeiss microscopy).

5.7 Ensayos de viabilidad por FACS

Los cultivos de ambas especies de *Naegleria* fueron utilizados en fase logarítmica de crecimiento. Las cajas fueron colocadas en un baño de hielo durante 40 min para despegar a las amibas, cuantificarlas y resembrar 2×10^5 trofozoítos por pozo en placas de 12 pozos. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Las muestras se incubaron a 37°C para *N. fowleri* o a temperatura ambiente para *N. gruberi*, durante 24, 48 o 72 h, con el inhibidor de proteosoma Lactacistina (Sigma-Aldrich) o con MG-132 (TargetMol) usando las concentraciones de 10, 20 y 40 μM ; y 10, 25 y 50 μM , respectivamente. Cada pozo se llevó a 1 ml agregando medio de Bactocasitona sin SFB. Los controles utilizados fueron amibas crecidas en 1 ml de medio Bactocasitona con o sin SFB.

Posterior a los tiempos de incubación, los cultivos se colocaron en hielo durante 30 min para despegar y recuperar a las amibas en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se tomaron 10 μl de cada tubo para contar a los trofozoítos utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad de las muestras se determinó mediante el uso del fluorocromo Sytox Green Nucleic Acid Stain (ThermoFisher) a una concentración final de 10 nM. Este fluorocromo penetra en las células que tienen la membrana comprometida o dañada y se une a los ácidos nucleicos. Posteriormente, se contaron 20,000 eventos por muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Como control negativo de viabilidad se utilizaron amibas fijadas en paraformaldehído al 4% durante 30 min y permeabilizadas con PBS-Tritón X-100 al 0.02% por 10 min. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Kaluza (Beckman Coulter). Los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

5.8 Determinación de la proliferación de trofozoítos en presencia de los inhibidores del proteosoma Lactacistina y MG-132

A partir de un cultivo de trofozoítos de *N. gruberi* o de *N. fowleri* en fase logarítmica de crecimiento, se tomaron y resembraron 200,000 amibas por pozo en una placa de 12 pozos. Los inhibidores Lactacistina y MG-132 fueron utilizados a la concentración de 10 μ M en medio de Bactocasitona sin SFB para los trofozoítos de *N. gruberi*, mientras que para *N. fowleri*, se utilizó el inhibidor MG-132 a la concentración de 25 μ M. Como controles se utilizaron amibas incubadas solamente en medio Bactocasitona con o sin SFB. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Las amibas se incubaron durante 24, 48 o 72 h a temperatura ambiente para *N. gruberi* y a 37°C para *N. fowleri*. Después de cada tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS pH 7.2. Se agregaron 500 μ l del reactivo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich) (MTT) a 0.5mg/ml por pozo y la placa se incubó a 37°C durante 2 h. Posterior a este tiempo, la placa fue incubada en hielo durante aproximadamente 40 min para despegar y recuperar a las amibas en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Las muestras fueron centrifugadas a 1700 rpm durante 8 min para empaquetar a las amibas y descartar el sobrenadante; se agregaron 200 μ l de DMSO (Sigma-Aldrich) y las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C. El sobrenadante de cada muestra fue recuperado y colocado en una caja de 96 pozos para determinar la absorbancia de las muestras mediante espectrofotometría a las longitudes de onda de 540 y 720 nm. Los datos de absorbancia fueron extrapolados a una curva estándar y así poder determinar la cantidad de amibas presentes en cada tiempo. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación y caracterización *in silico* de las subunidades que conforman el proteosoma 20S de *Naegleria gruberi* y *Naegleria fowleri*

De manera general, se buscaron las secuencias de las subunidades α y β que conforman el proteosoma 20S en *N. gruberi* y *N. fowleri*, tomando como referencia las

secuencias de las subunidades correspondientes a *S. cerevisiae*. Así como también se realizó la comparación en distintos microorganismos protozoarios.

Una vez seleccionadas las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple para las subunidades α y para las subunidades β de *N. gruberi* y *N. fowleri*.

a) Identificación y caracterización de las subunidades α

En el caso de *N. gruberi* se encontraron las secuencias correspondientes a 6 de las 7 subunidades tipo α descritas. La subunidad α_3 no se encontró utilizando como referencia a *S. cerevisiae*, por lo que también se realizó la búsqueda tomando como referencia las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de *N. fowleri* y *Homo sapiens* de la subunidad α_3 , a pesar de que no se logró identificar a la subunidad α_3 , los resultados arrojaron que la proteína con mayor homología posee el dominio semejante al de la subunidad α tipo 4 (Figura 11). Por otro lado, para *N. fowleri* fue posible identificar las 7 secuencias distintas de subunidades tipo α (Figura 12).

En el análisis de las secuencias de las subunidades α de ambas especies se encontró a la secuencia consenso llamada Hélice H0, así como también el residuo conservado de tirosina en el extremo amino terminal, el cual participa en la regulación de la apertura del poro del núcleo catalítico, para permitir la entrada y salida de los sustratos. También se encontró el motivo GxxxD, el cual está altamente conservado en las subunidades α y β del proteosoma de arqueas y eucariontes.



Figura 12. Alineamiento múltiple de las subunidades α de proteosoma de *N. fowleri*. Los alineamientos fueron obtenidos utilizando el programa MEGA versión 7.

De manera interesante, se encontró un residuo de treonina en el extremo amino-terminal de la subunidad $\alpha 3$ de *N. fowleri*, el cual determina el tamaño y rigidez del poro del núcleo del complejo catalítico.

b) Modelamiento en 3D de las subunidades α

Además de los alineamientos, se realizó el modelamiento tridimensional de las secuencias para las subunidades α de ambas especies de *Naegleria*, tomando como referencia a las estructuras de las subunidades de *S. cerevisiae*. En este análisis se encontró que las 6 secuencias de *N. gruberi* presentan 1 capa de 5 estructuras β plegadas que se encuentran de manera anti-paralela a otra capa de 5 β plegadas, las cuales tienen α hélices en ambos extremos (Figura 13); esta conformación correlaciona con lo previamente descrito para las proteínas del proteosoma 20S de arqueas y eucariontes.

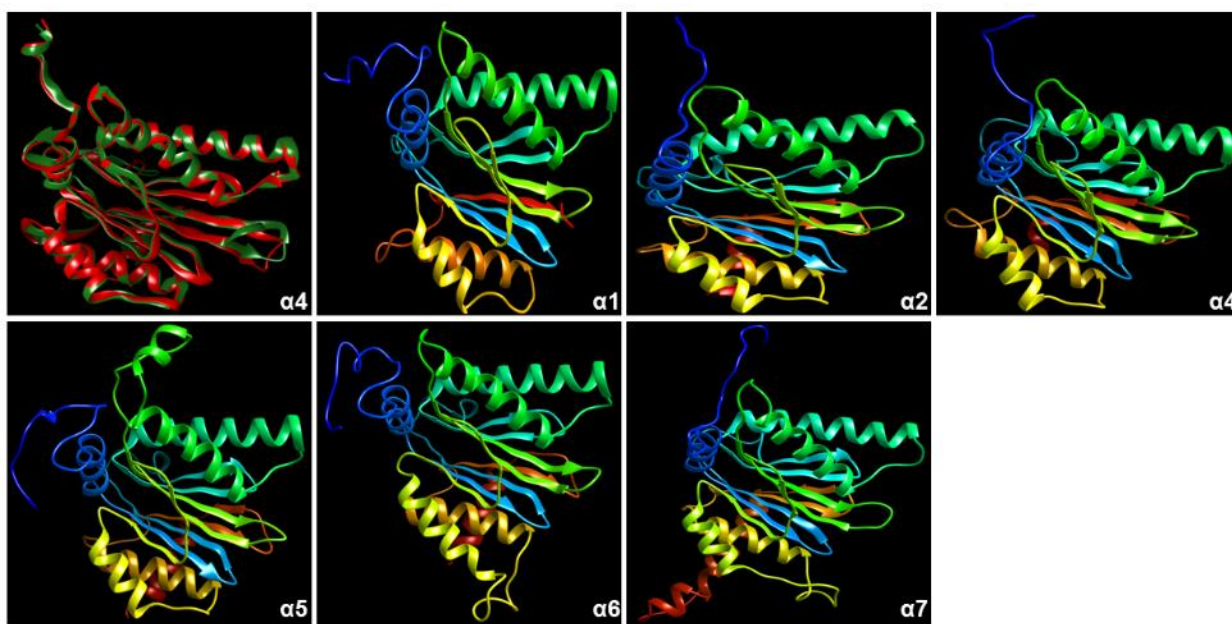


Figura 13. Modelos tridimensionales de las 6 subunidades α de *N. gruberi*. El primer recuadro muestra a la subunidad $\alpha 4$ de *S. cerevisiae* en color rojo y sobrepuesta, a la subunidad ortóloga de *N. gruberi* en color verde. Los modelamientos se obtuvieron mediante el uso del servidor Phyre2, mientras que la edición y análisis de las estructuras se realizó con el programa UCSF Chimera 1.11.2.

Los porcentajes de homología estructural para cada subunidad α de *N. gruberi* fueron los siguientes: para $\alpha 1$ del 50%, $\alpha 2$ 37%, $\alpha 4$ 59%, $\alpha 5$ 59%, $\alpha 6$ 46% y $\alpha 7$ 56%.

Por otra parte, el modelamiento de las 7 subunidades α de *N. fowleri* presentó un arreglo tridimensional similar al de *N. gruberi*, ya que se encontraron 2 capas de estructuras β plegadas de frente y de manera anti-paralela, que están rodeadas por α hélices (Figura 14). Para estos modelamientos se tomaron como referencia a las subunidades tipo α de *S. cerevisiae*.

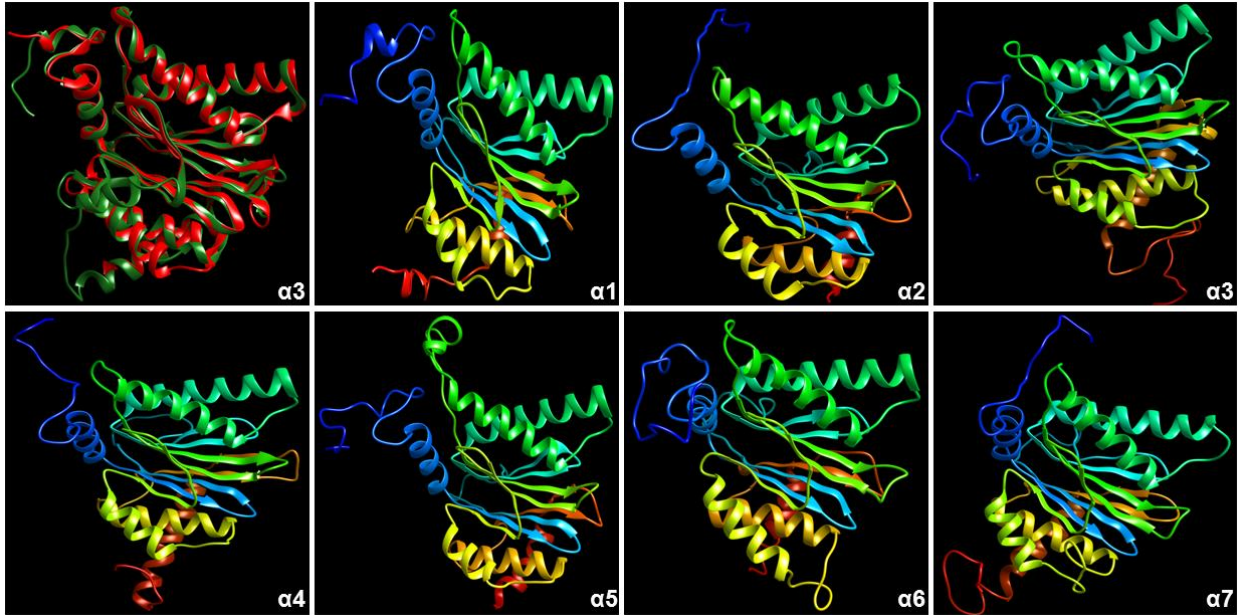


Figura 14. Modelos tridimensionales de las subunidades α de *N. fowleri*. Todas las subunidades mostraron la estructura descrita para subunidades del proteosoma. El primer cuadro muestra en rojo a la subunidad $\alpha 3$ de *S. cerevisiae* y en verde a su ortóloga en *N. fowleri*. Los modelamientos se obtuvieron mediante el uso del servidor Phyre2, mientras que la edición y análisis de las estructuras se realizó con el programa UCSF Chimera 1.11.2.

La homología estructural de cada subunidad α de *N. fowleri* comparada con *S. cerevisiae* fue la siguiente: para $\alpha 1$ fue del 31%, $\alpha 2$ 34%, $\alpha 3$ 47%, $\alpha 4$ 32%, $\alpha 5$ 34%, $\alpha 6$ 32% y $\alpha 7$ 31%.

Cabe mencionar que se tomó como referencia a *S. cerevisiae* por considerarse un organismo más cercano a las especies de *Naegleria*, sin embargo, todas las subunidades presentaron una homología estructural mayor al ser comparadas con las proteínas del proteosoma 20S de *Bos taurus*, lo cual se resume en la Tabla 2.

Subunidad	<i>N. gruberi</i>	<i>N. fowleri</i>
1	56	53
2	63	61
3		51
4	60	61
5	34	57
6	59	46
7	34	60

Tabla 2. Porcentajes de identidad estructural de las subunidades α del proteosoma de *Naegleria* contra *Bos taurus*.

Se encontró al residuo de treonina en la posición 1 de las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$. Este residuo es característico de las proteínas de la familia de Hidrolasas Ntn o hidrolasas con un nucleófilo de treonina en el extremo amino terminal.

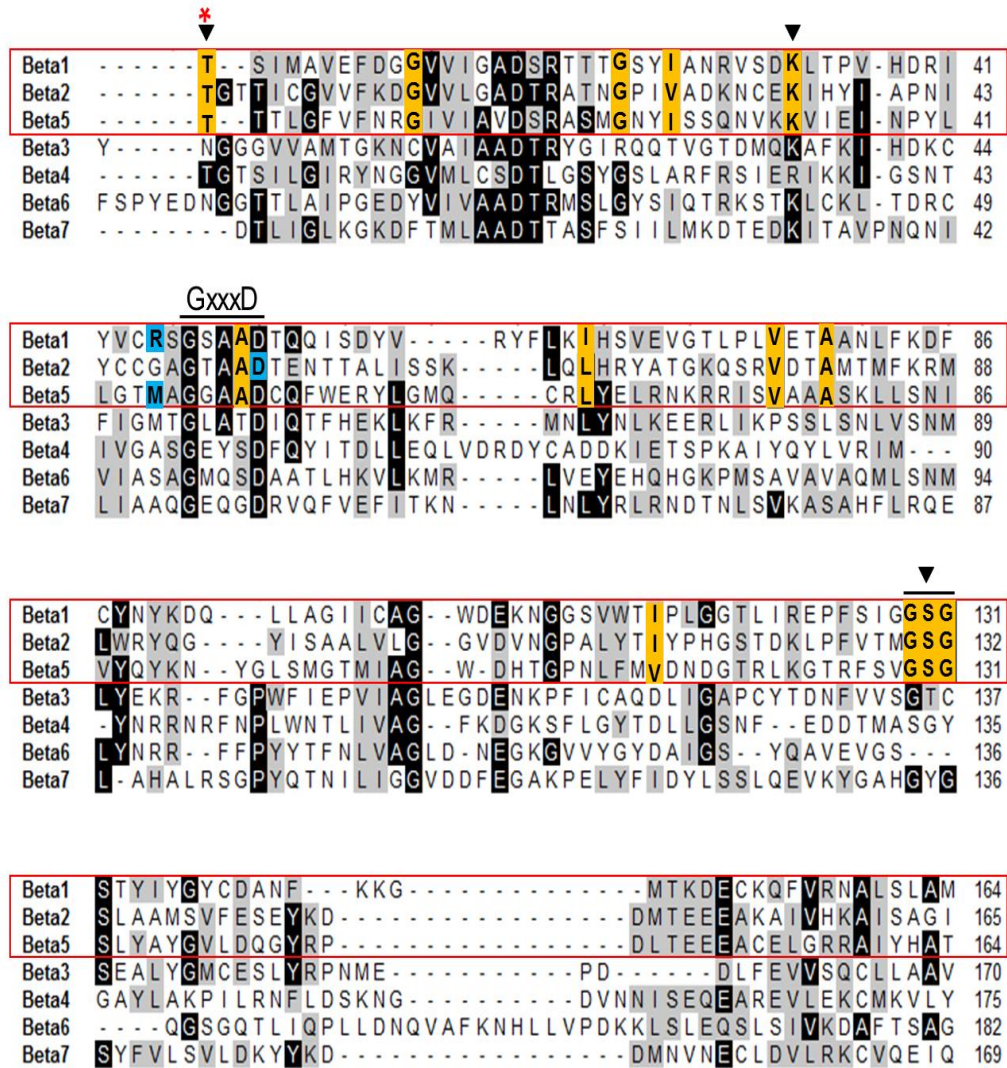


Figura 16. Alineamiento múltiple de las subunidades β del proteosoma 20S de *N. fowleri*. En rojo se señalan las posibles subunidades catalíticas. En amarillo se remarca a aminoácidos altamente conservados en subunidades catalíticas. El asterisco indica a la treonina-1 en subunidades proteolíticas, lo cual las convierte en hidrolasas Ntn. Las flechas indican a los residuos indispensables para la actividad catalítica. En azul se señalan a los residuos que brindan especificidad a las subunidades β catalíticas.

Todas las posibles subunidades catalíticas, cuentan con los residuos indispensables para la actividad proteolítica de estas proteínas, los cuales son la treonina-1, lisina-33, glicina 128, serina-129 y glicina-130. Se encontraron los residuos que brindan la especificidad de la actividad proteolítica, los cuales son un residuo de arginina en la

posición 45 de las subunidades β 1, el cual les permite la actividad de tipo caspasa; un residuo de ácido aspártico en la posición 53 de las subunidades β 2, el cual les da la especificidad de tipo tripsina y; finalmente un residuo de metionina en la posición 45 de las subunidades β 5, este residuo les brinda la actividad tipo quimiotripstina. Estos aminoácidos fueron encontrados en las subunidades catalíticas de ambas especies. En todas las subunidades tipo β se encontró al motivo GxxxD, que está altamente conservado en las subunidades tipo α y β de arqueas y eucariontes. Para la caracterización de estas subunidades, las secuencias completas de cada subunidad fueron ingresadas al servidor Conserved Domains para así determinar la región correspondiente al dominio de subunidad de proteosoma. Dichas regiones fueron utilizadas para la elaboración de los alineamientos.

d) Modelamiento en 3D de las subunidades β

Una vez determinados los residuos, motivos y dominios encontrados en cada subunidad β , se procedió a realizar el modelamiento estructural de las secuencias. Se encontró que la conformación de todas las subunidades β de *N. gruberi* es la clásica estructura descrita para subunidades del proteosoma de arqueas y eucariontes, en la cual se encuentra una capa de 5 estructuras β plegadas al centro de manera anti-paralela a otra capa de 5 β plegadas, que se encuentran rodeadas por α hélices en los extremos, similar a lo encontrado en las subunidades tipo α (Figura 17).

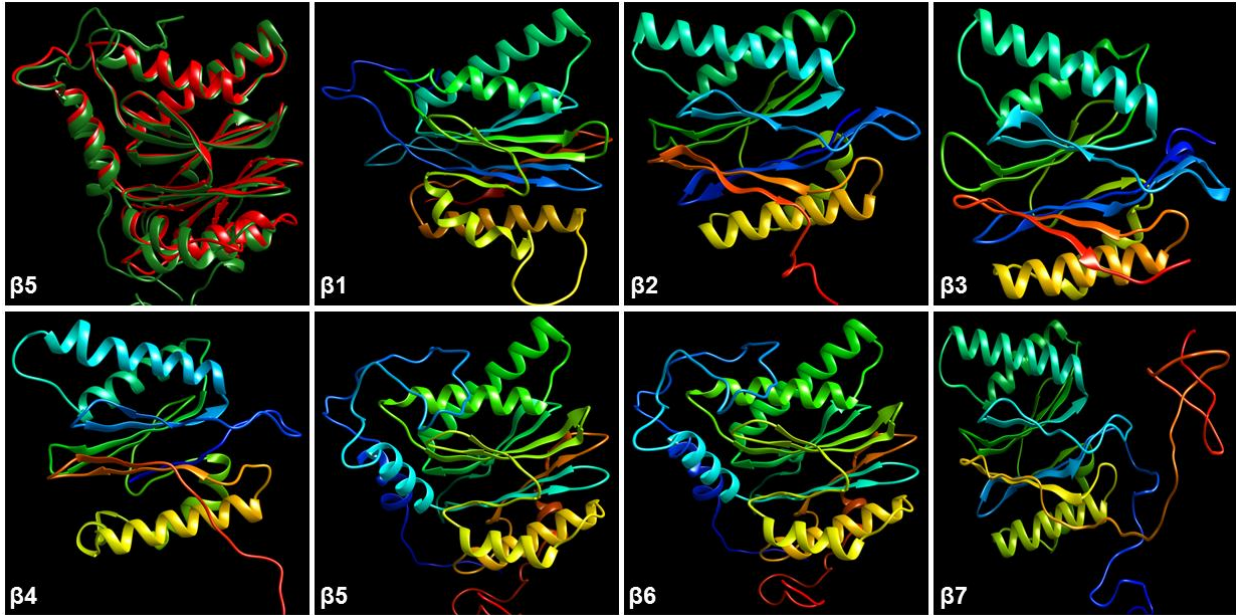


Figura 17. Modelos tridimensionales de las subunidades β de *N. gruberi*. La primera imagen muestra en rojo a la subunidad $\beta 5$ de *S. cerevisiae* y en verde a su ortóloga en *N. gruberi*. Todas las subunidades mostraron la estructura descrita para subunidades del proteosoma. Los modelamientos se obtuvieron mediante el uso del servidor Phyre2, mientras que la edición y análisis de las estructuras se realizó con el programa UCSF Chimera 1.11.2.

La homología estructural de cada subunidad fue la siguiente: para $\beta 1$ 43%, $\beta 2$ 42%, $\beta 3$ 54%, $\beta 4$ 48%, $\beta 5$ 62%, $\beta 6$ 59% y $\beta 7$ 51%.

La estructura descrita previamente para estas proteínas fue encontrada nuevamente al realizar los modelamientos de las subunidades β de *N. fowleri* (figura 18).

La identidad estructural de cada subunidad de *N. fowleri* contra sus ortólogas en *S. cerevisiae* fue la siguiente: para $\beta 1$ 18%, $\beta 2$ 18%, $\beta 3$ 23%, $\beta 4$ 43%, $\beta 5$ 20%, $\beta 6$ 16% y $\beta 7$ 54%.

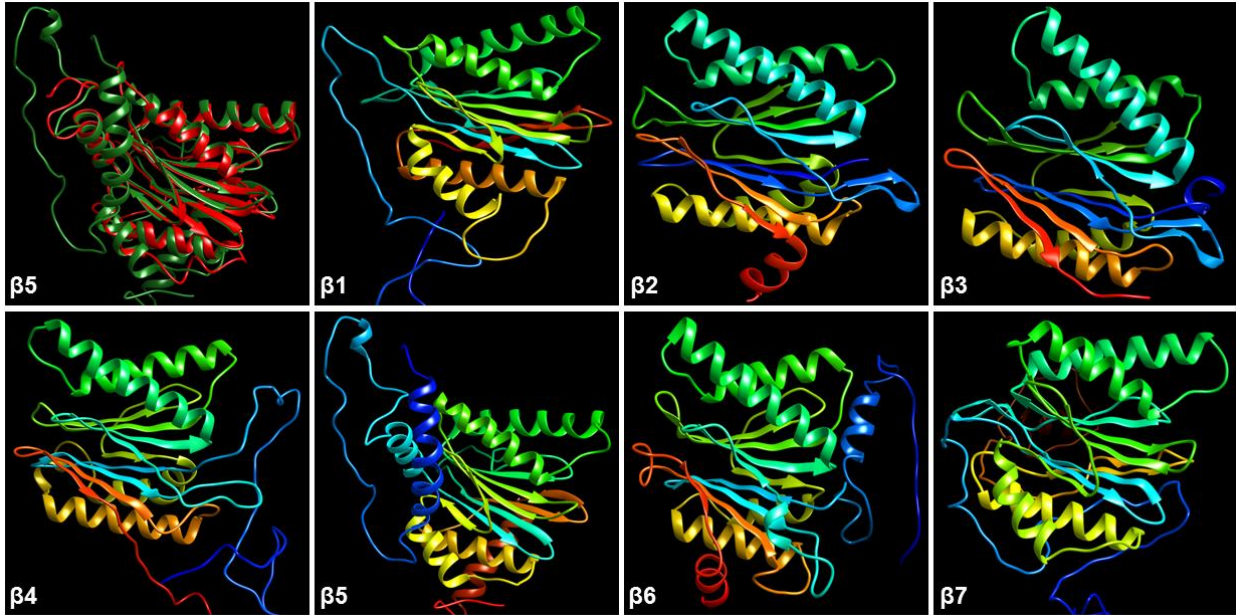


Figura 18. Modelos tridimensionales de las subunidades β de *N. fowleri*. Todas las subunidades mostraron la estructura descrita para subunidades del proteosoma. La primera imagen muestra a la subunidad $\beta 5$ de *S. cerevisiae* en rojo y sobrepuesta en verde, a la proteína ortóloga de *N. fowleri*. Los modelamientos se obtuvieron mediante el uso del servidor Phyre2, mientras que la edición y análisis de las estructuras se realizó con el programa UCSF Chimera 1.11.2.

A pesar de lo anterior, los porcentajes de identidad estructural fueron superiores al compararse las subunidades β de ambas especies de *Naegleria* contra *Bos taurus* (Tabla 3).

Subunidad	<i>N. gruberi</i>	<i>N. fowleri</i>
1	42	54
2	44	44
3	52	63
4	46	51
5	63	67
6	57	65
7	51	68

Tabla 3. Porcentajes de identidad estructural de las subunidades β del proteosoma de *Naegleria* contra *Bos taurus*.

Con estos resultados se logró determinar *in silico* que las subunidades α y β del proteosoma 20S de *N. gruberi* y *N. fowleri* poseen los motivos y dominios característicos de las subunidades del proteosoma de arqueas y eucariontes, además de los residuos que podrían estar regulando su interacción con los complejos

reguladores 19S y las secuencias de localización nuclear que podrían permitir su translocación al núcleo bajo condiciones que así lo requieran. También, las subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ poseen los dominios y residuos indispensables para llevar a cabo una función proteolítica en las especies de *Naegleria*.

e) Identidad y similitud entre las subunidades del proteosoma de *Naegleria*

Una vez que fueron caracterizadas las subunidades del proteosoma en ambas especies de *Naegleria*, se realizó un alineamiento comparativo de ambas especies de cada una de las subunidades α y β . Los porcentajes de identidad y similitud se presentan en la Tabla 4.

Subunidad	Identidad	Similitud	
α	1	90	97
	2	96	98
	3		
	4	94	97
	5	94	98
	6	91	97
	7	89	93
β	1	93	97
	2	88	95
	3	89	95
	4	86	95
	5	83	91
	6	96	99
	7	90	97

Tabla 4. Porcentajes de identidad y similitud encontrados entre subunidades α y β del proteosoma 20S de ambas especies de *Naegleria*.

Como se mencionó anteriormente, no se encontró ninguna secuencia correspondiente a la subunidad $\alpha 3$ de *N. gruberi*, por lo que no se realizó el alineamiento correspondiente. En los porcentajes de identidad entre subunidades α de *N. gruberi* y *N. fowleri*, se observan valores desde 89 y hasta 96%, mientras que para subunidades β , los valores van desde el 88 hasta el 96%. Además, los porcentajes de similitud entre subunidades α van del 93 hasta el 98%, y entre subunidades β se encontraron valores 91 hasta 99%,

lo cual indica la gran similitud en las proteínas, puesto que son dos especies que pertenecen al mismo género.

f) Identidad y similitud entre las subunidades del proteosoma 20S de las especies de *Naegleria* y otros protozoarios

También se realizó un alineamiento de cada subunidad α y cada subunidad β de las especies de *Naegleria*, pero contra las subunidades ortólogas en organismos protozoarios.

En la Tabla 5 se resumen los porcentajes de identidad y similitud encontrados para cada subunidad de *N. gruberi*, cada uno con el ortólogo con mayor identidad. Se incluyó también el número de residuos con que cuenta cada secuencia.

	Subunidad	Residuos	Ortólogo	Residuos	Identidad	Similitud
α	1	219	<i>D. discoideum</i>	248	60	78
	2	233	<i>T. gondii</i>	236	69	82
	3					
	4	236	<i>T. gondii</i>	252	65	81
	5	251	<i>D. discoideum</i>	242	66	83
	6	255	<i>D. discoideum</i>	250	53	73
	7	259	<i>D. discoideum</i>	250	63	81
β	1	233	<i>D. discoideum</i>	236	56	72
	2	209	<i>P. berghei</i>	195	45	66
	3	205	<i>D. discoideum</i>	205	60	78
	4	198	<i>D. discoideum</i>	259	49	69
	5	300	<i>T. brucei</i>	310	69	82
	6	251	<i>D. discoideum</i>	213	64	82
	7	271	<i>D. discoideum</i>	266	66	82

Tabla 5. Subunidades del proteosoma de *N. gruberi* y la subunidad ortóloga con mayor identidad y similitud (mostrado en porcentaje). Los alineamientos se realizaron con el servidor Protein BLAST (NCBI).

El organismo con el que se observó la mayor identidad fue *D. discoideum* el cual es una amiba de vida libre al igual que *N. gruberi*, mientras que los porcentajes de identidad contra otros protozoarios van desde 45% contra *P. berghei* hasta 69% contra *T. brucei*;

mientras que el menor porcentaje de similitud fue contra *D. discoideum* (β 2) con un 66%, y el mayor fue de 83%, también contra *D. discoideum* (α 5).

Con respecto a *N. fowleri*, los alineamientos fueron realizados contra sus respectivas proteínas ortólogas en otros protozoarios, los resultados se muestran en la Tabla 6. De igual manera se observó que *D. discoideum* comparte una alta identidad en varias subunidades (α 3, α 5-7; β 1, β 3-4, β 6-7). Los porcentajes de identidad encontrados en subunidades α van desde 49% contra *D. discoideum* hasta 69% contra el organismo *T. gondii*; mientras que para subunidades β , dichos valores van del 48% contra *C. parvum* hasta 70% contra *T. brucei*.

	Subunidad	Residuos	Ortólogo	Residuos	Identidad	Similitud
α	1	254	<i>L. major</i>	263	58	79
	2	240	<i>T. gondii</i>	236	69	82
	3	271	<i>D. discoideum</i>	248	49	69
	4	257	<i>T. gondii</i>	252	63	81
	5	256	<i>D. discoideum</i>	242	67	83
	6	262	<i>D. discoideum</i>	250	53	72
	7	261	<i>D. discoideum</i>	250	61	79
β	1	265	<i>D. discoideum</i>	236	56	73
	2	208	<i>C. parvum</i>	203	48	62
	3	205	<i>D. discoideum</i>	205	60	79
	4	258	<i>D. discoideum</i>	259	53	72
	5	299	<i>T. brucei</i>	310	70	82
	6	251	<i>D. discoideum</i>	213	63	82
	7	300	<i>D. discoideum</i>	266	65	82

Tabla 6. Subunidades del proteosoma de *N. fowleri* y la subunidad ortóloga con mayor identidad y similitud (mostrado en porcentaje). Los alineamientos se realizaron con el servidor Protein BLAST (NCBI).

Además, los porcentajes de similitud para las subunidades α se encuentran desde 69% (*D. discoideum*, α 3) hasta 83% (*D. discoideum*, α 5). Mientras que las similitudes encontradas en las subunidades β van desde 62% contra *C. parvum* (β 2), y el valor más alto encontrado fue contra *T. brucei* y *D. discoideum* (β 5, 6 y 7), con un 82%.

g) Organización filogenética de las subunidades del proteosoma 20S de protozoarios

Los altos porcentajes de identidad y similitud de *N. gruberi* y *N. fowleri* con otros protozoarios indican que las proteínas del proteosoma 20S de ambas especies de *Naegleria* comparten características que las clasifican como subunidades del proteosoma.

Se realizó un árbol filogenético sin raíz con la finalidad de determinar la relación filogenética entre las subunidades α y β del proteosoma 20S de los organismos protozoarios. Para ello, fueron ingresadas las secuencias completas de todas las subunidades del proteosoma de los organismos protozoarios mencionados anteriormente.

En el árbol (Figura 19) se incluyeron las subunidades α o β de *T. acidophilum* (triángulos verdes), las cuales se presentan en un clado independiente, debido a que este organismo es una arquea y posee un único tipo de subunidad α y un solo tipo de subunidad β .

El árbol además reveló que los distintos tipos de subunidad se encuentran separados de acuerdo al dominio que poseen, por ejemplo, todas las subunidades α 5 se encuentran en el mismo grupo. Esto indica que las subunidades del proteosoma de todos los protozoarios poseen características compartidas y que dependen del tipo de subunidad al que pertenecen.

Además, se realizó una prueba de “bootstrap” con 1000 repeticiones para validar la construcción del árbol y los números superpuestos en los clados indican el porcentaje obtenido. En este caso solamente se marcaron los porcentajes superiores al 90%. Este análisis refuerza los hallazgos de que las secuencias del proteosoma 20S tanto de *N. gruberi* como de *N. fowleri* poseen las características propias del proteosoma 20S.

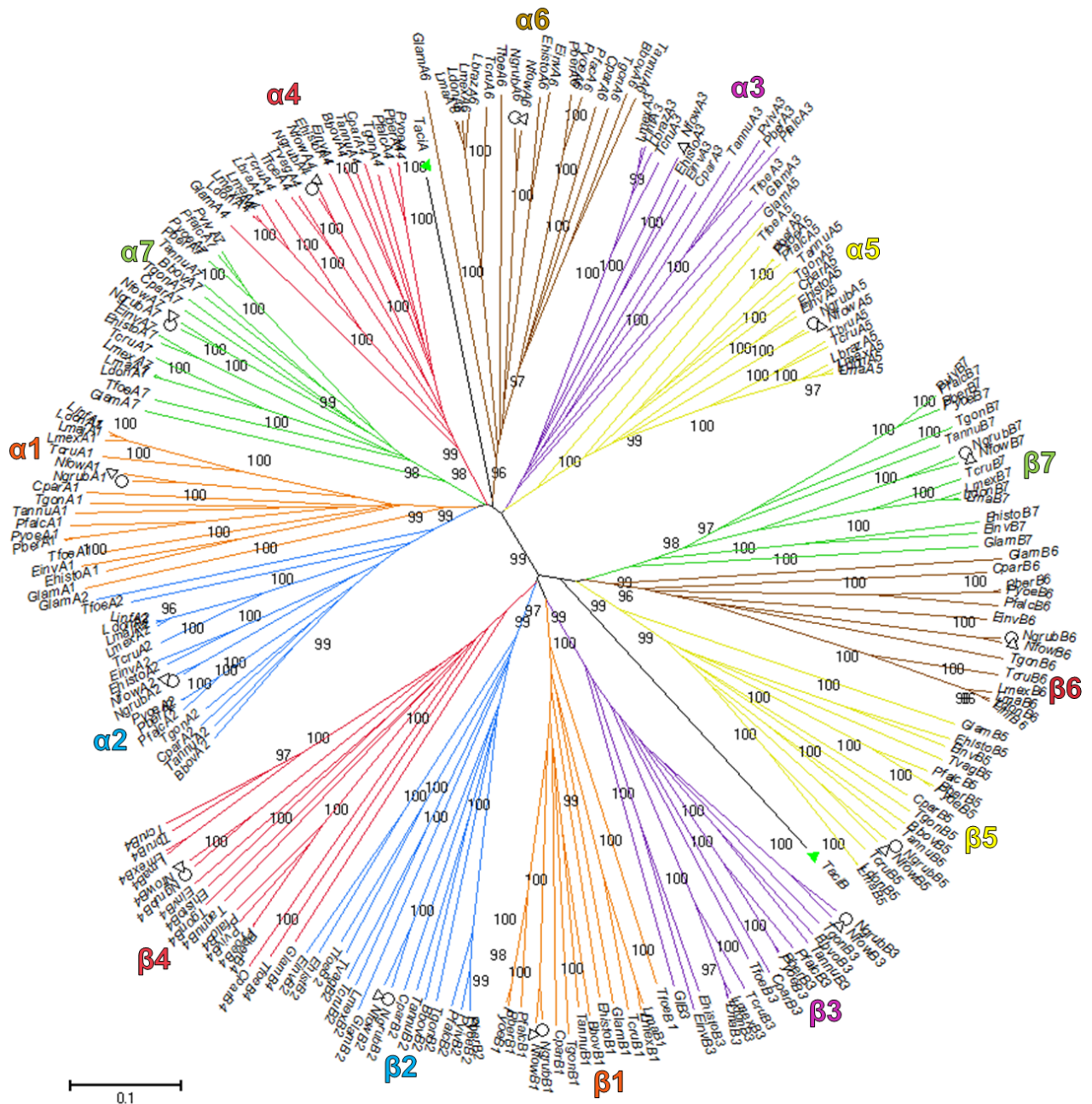


Figura 19. Árbol filogenético sin raíz de las subunidades α y β del proteosoma en protozoarios y en la arquea *T. acidophilum*. Se ingresaron las secuencias completas de todas las subunidades. Los triángulos de color verde señalan las subunidades α o β de *T. acidophilum*. Los círculos y triángulos señalan a las proteínas α o β de *N. gruberi* o *N. fowleri*, respectivamente. Para validar la construcción de este árbol se realizó una prueba de “bootstrap” con 1000 repeticiones. Abreviaturas: Bbov, *B. bovis*; Tannu, *T. annulata*; Cpar, *C. parvum*; Tgon, *T. gondii*; Pfalc, *P. falciparum*; Pber, *P. berghei*; Pyoe, *P. yoelii*; Pviv, *P. vivax*; Ngrub, *N. gruberi*; Nfow, *N. fowleri*; Ehisto, *E. histolytica*; Einv, *E. invadens*; Tcru, *T. cruzi*; Tbru, *T. brucei*; Lmex, *L. mexicana*; Lmaj, *L. major*; Ldon, *L. donovani*; Linf, *L. infantum*; Lbra, *L. braziliensis*; Glam, *G. lamblia*; Tvag, *T. vaginalis*; Tfoe, *T. foetus*. La letra A o B después de cada abreviatura se refiere a subunidad tipo α o β , respectivamente.

6.2 Identificación de la presencia de subunidades α y β del proteosoma de *N. gruberi* y *N. fowleri*

Los resultados de microscopía confocal y Western blot revelaron la presencia de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$ del proteosoma 20S en *N. gruberi* y en *N. fowleri*.

El inmunomarcaje de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$ en trofozoítos de *N. gruberi* mostró que las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$ se localizan en el citoplasma (Figura 20). Dicha distribución fue corroborada mediante la realización de cortes en Z, en donde no se logran apreciar punto de co-localización a nivel nuclear. Los núcleos fueron marcados con yoduro de propidio. Para determinar la especificidad de la reacción, se utilizaron trofozoítos fijados y permeabilizados, los cuales fueron incubados únicamente con el anticuerpo secundario, donde no se observó marca positiva para FITC.

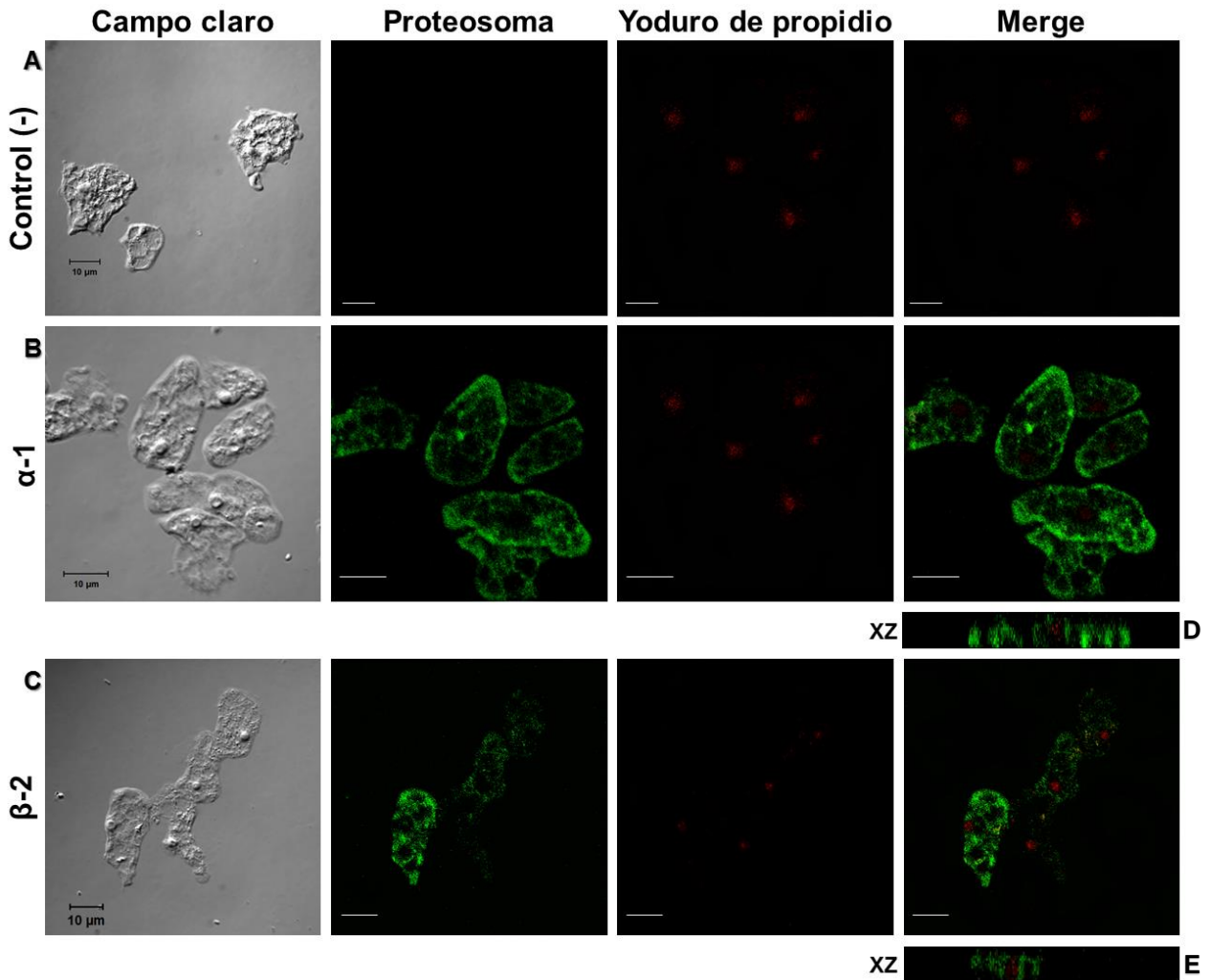


Figura 20. Localización intracelular del proteosoma 20S en trofozoítos de *N. gruberi* mediante microscopía confocal. A. Control negativo, trofozoítos incubados solo con el anticuerpo secundario acoplado a FITC; B. Marcaje de la subunidad α 1; C. Marcaje de la subunidad β 2; D. Corte en Z de los trofozoítos marcados contra la subunidad α 1; E. Corte en Z de los trofozoítos marcados contra la subunidad β 2. 63X.

También se realizó el análisis por microscopía confocal de los trofozoítos de *N. fowleri* (Figura 21). Como control negativo se utilizaron amibas fijadas y permeabilizadas pero incubadas solamente con el anticuerpo secundario, por lo que no se observa marca positiva para FITC. Al incubar a los trofozoítos con los anticuerpos anti-subunidades α 1 y β 2 se observó marca positiva para estas subunidades con una distribución citoplásmica. En los cortes en Z realizados no se logró apreciar una co-localización del proteosoma en los núcleos de *N. fowleri*.

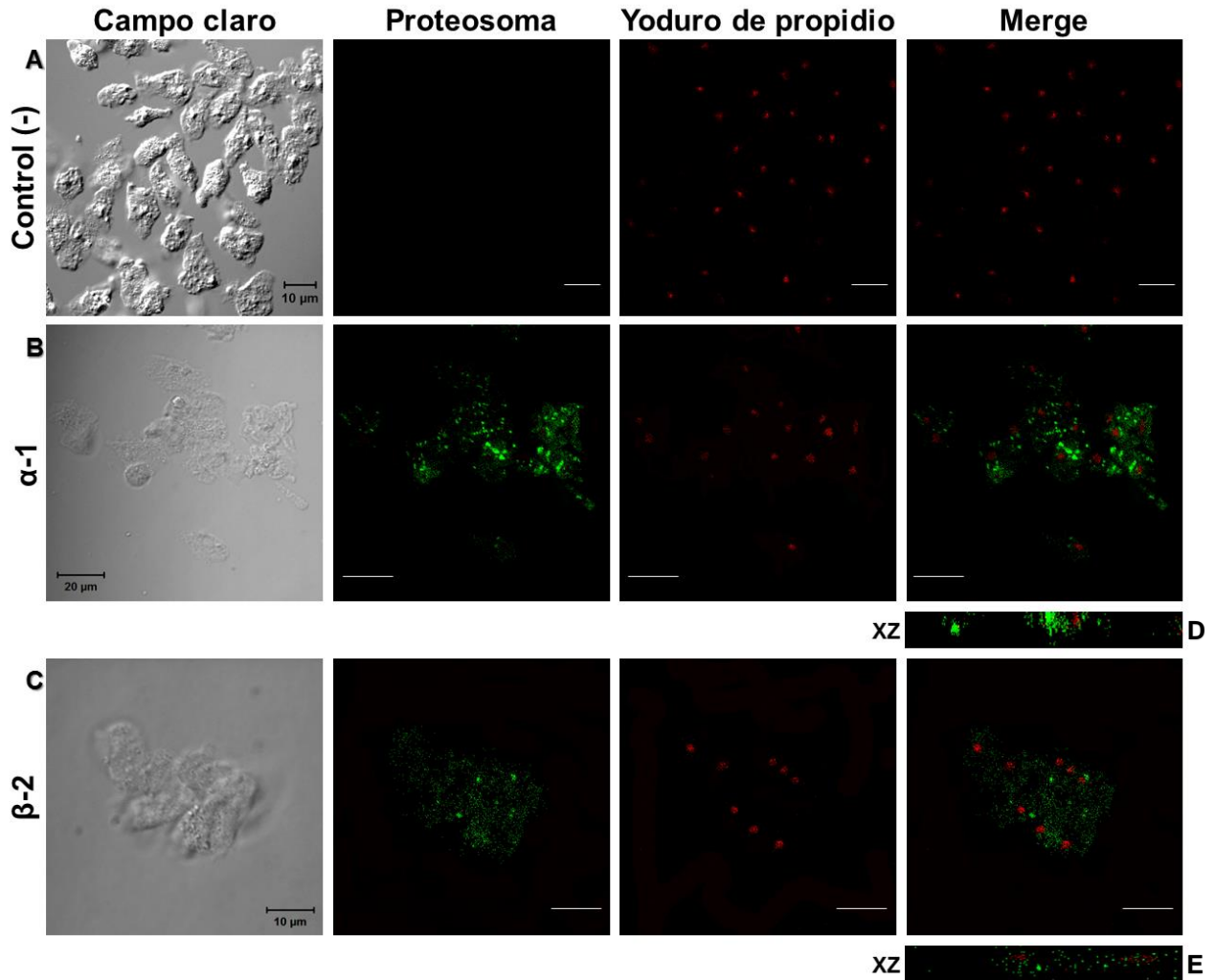


Figura 21. Localización intracelular del proteosoma 20S en trofozoítos de *N. fowleri* mediante microscopía confocal. A. Control negativo, trofozoítos incubados solamente con el anticuerpo secundario acoplado a FITC; B. Marcaje de la subunidad α 1; C. Marcaje de la subunidad β 2; D. Corte en Z de los trofozoítos marcados contra la subunidad α 1; E. Corte en Z de los trofozoítos marcados contra la subunidad β 2. 63X.

Por otro lado, por medio de la técnica de Western-blot, se detectó una banda de aproximadamente 29 kDa en los extractos de *N. gruberi* y *N. fowleri*, utilizando el anticuerpo anti -subunidad α 1 (Figura 22). El peso molecular observado corresponde con el peso reportado para dicha proteína. Además, la banda de 29 kDa también fue observada en *E. histolytica* y en células de humano (Huh-7).

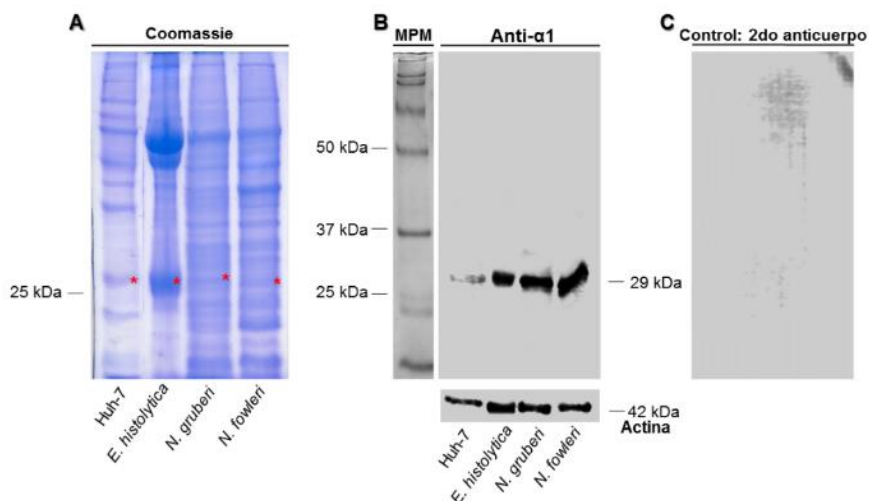


Figura 22. Western-blot con el anticuerpo primario anti-subunidad $\alpha 1$ del proteosoma 20S. A. Patrón proteico obtenido mediante la tinción de un gel al 15% teñido con azul de Coomassie, los asteriscos señalan las posibles bandas pertenecientes a la proteína esperada; B. Western-blot utilizando el anticuerpo primario anti-subunidad $\alpha 1$; C. Control de especificidad del anticuerpo primario, se utilizó una membrana que fue incubada únicamente con el anticuerpo secundario chivo anti-conejo. Como control de carga se utilizó a la proteína actina.

6.3 Determinación del efecto del inhibidor Lactacistina en la viabilidad y proliferación de los trofozoítos de *N. gruberi* y *N. fowleri*

Con el fin de determinar si el proteosoma podría estar involucrado en la viabilidad y proliferación de *N. gruberi* y *N. fowleri*, se utilizaron distintas concentraciones de los inhibidores Lactacistina y MG-132 en cultivos de amibas. En primer lugar, se buscó establecer las concentraciones de Lactacistina que no resultaran tóxicas para las amibas.

En la figura 23 se muestra el efecto de Lactacistina a las concentraciones de 10, 20 y 40 μM en los trofozoítos de *N. gruberi*. Se utilizaron estas concentraciones debido a que ya han sido reportadas en otros organismos protozoarios.

Como control negativo de viabilidad se utilizaron amibas fijadas y permeabilizadas, por lo que presentaron viabilidades de aproximadamente 2%. Los controles de amibas en medio Bactocasitona con y sin SFB mostraron una viabilidad superior al 95% a los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

A las 24 horas de co-incubación, las amibas tratadas con Lactacistina muestran una viabilidad de 97, 95 y 95%, al usar las concentraciones de 10, 20 y 40 μM .

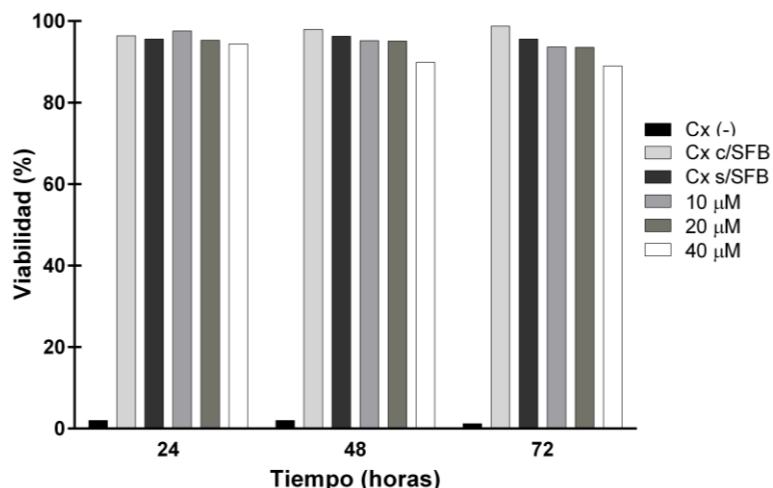


Figura 23. Viabilidad de los trofozoítos de *N. gruberi* co-incubados con el inhibidor Lactacistina durante 24, 48 y 72 horas. Como control negativo se utilizaron amibas fijadas en paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con PBS-Tritón X100 al 0.2%. Los trofozoítos tratados con el inhibidor fueron incubados en medio Bactocasitona sin SFB. Los resultados fueron obtenidos mediante el uso del fluorocromo Sytox green y citometría de flujo. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se registraron 20,000 eventos por muestra.

A las 48 horas, las amibas tratadas con 10 y 20 μM del inhibidor, mantuvieron una viabilidad del 95% mientras que las amibas tratadas con 40 μM presentaron un 90% de viabilidad. Dichas viabilidades permanecieron sin cambios hasta las 72 horas de co-incubación.

A la par, las amibas utilizadas para medir la viabilidad fueron cuantificadas mediante el uso de una cámara de Neubauer. Los datos se analizaron estadísticamente y se encontró que los tratamientos con 10, 20 y 40 μM fueron significativos a todos los tiempos, con respecto al control sin SFB (Figura 24), por lo que para ensayos posteriores con trofozoítos de *N. gruberi*, se decidió utilizar la concentración de 10 μM de Lactacistina.

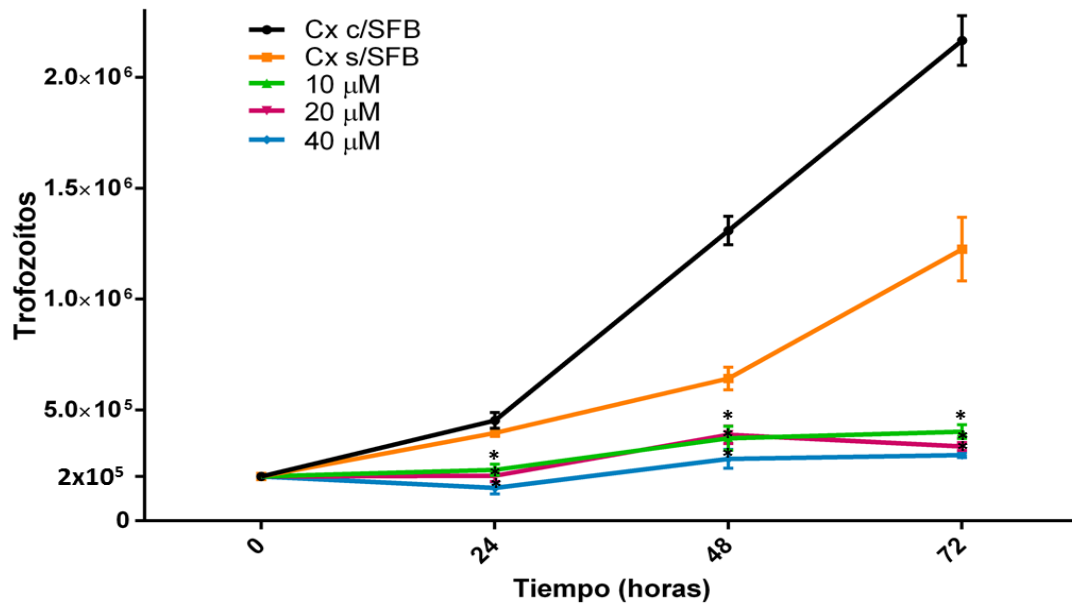


Figura 24. Proliferación de los trofozoítos de *N. gruberi* co-incubados con Lactacistina. * $P < 0.0001$.

También se buscó determinar el efecto de la Lactacistina en los trofozoítos de *N. fowleri* y los resultados se observan en la Figura 25.

Los controles con y sin SFB mantienen una viabilidad superior al 95% a las 24 y 48 horas de incubación, sin embargo, dicha viabilidad se ve disminuida a las 72 horas, ya que se observa un 91% de viabilidad.

Al utilizar un tratamiento de 10 µM en *N. fowleri*, se obtuvo una viabilidad del 97% a las 24 horas de co-incubación. Este valor disminuyó a 91% a las 48 horas y se mantuvo así hasta las 72 horas.

Por otra parte, las amibas tratadas con 20 µM de Lactacistina presentan viabilidades de 96, 91 y 89%, correspondientes a los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

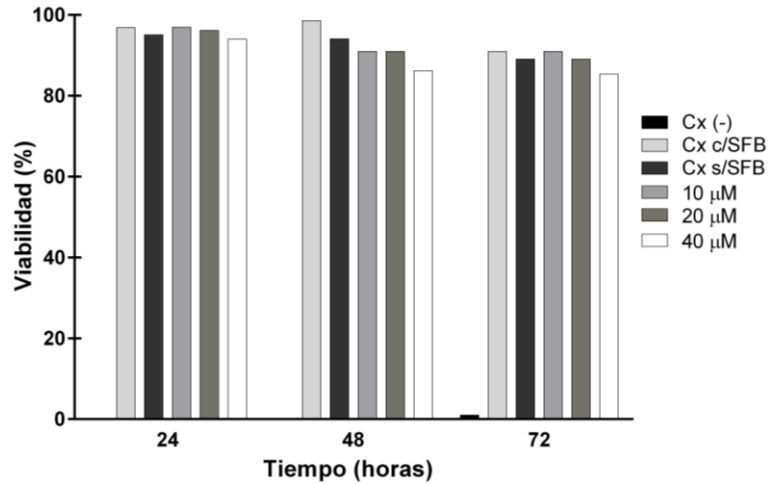


Figura 25. Viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados con el inhibidor Lactacistina durante 24, 48 y 72 horas. Como control negativo se utilizaron amibas fijadas en paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con PBS-Tritón X100 al 0.2%. Los trofozoítos tratados con el inhibidor fueron incubados en medio Bactocastona sin SFB. Los resultados fueron obtenidos mediante el uso del fluorocromo Sytox green y citometría de flujo. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se registraron 20,000 eventos por muestra.

Finalmente, el tratamiento con 40 μM resultó en viabilidades de 94, 86 y 85% para los trofozoítos de *N. fowleri*.

En este caso los trofozoítos también fueron cuantificados, los datos se analizaron estadísticamente y se observó que la única concentración con efecto significativo en la proliferación de las amibas fue la de 40 μM a los tiempos considerados (Figura 26), por lo que esta concentración fue elegida para utilizarse en ensayos posteriores.

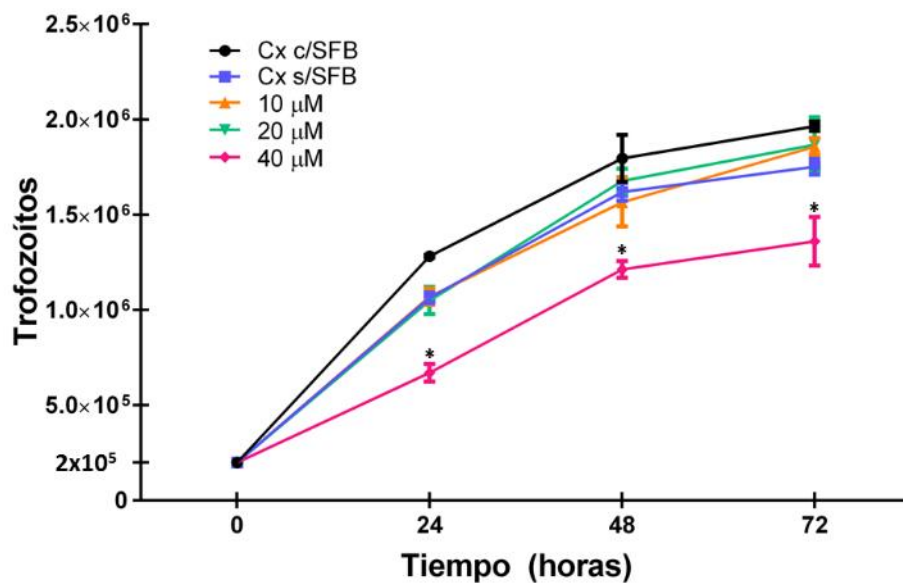


Figura 26. Proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados con Lactacistina. * $P < 0.0001$.

Los resultados indicaron que el inhibidor Lactacistina no tuvo un impacto significativo en la viabilidad de las amibas.

6.4 Efecto del inhibidor MG-132 en la viabilidad y proliferación de los trofozoítos de *N. gruberi* y *N. fowleri*

También se evaluó el efecto del inhibidor MG-132 en la viabilidad de trofozoítos de *N. gruberi* y *N. fowleri*. En este caso, los controles de viabilidad fueron similares a los utilizados en el experimento anterior, ya que como control negativo se usaron trofozoítos fijados y permeabilizados; mientras que los controles positivos fueron amibas incubadas en medio Bactocasitona con o sin SFB.

Al tratar a los trofozoítos de *N. gruberi* durante 24 horas con 10 μM de MG-132, estos presentaron una viabilidad superior al 95%, de manera similar a los controles con y sin SFB (Figura 27). Sin embargo, las amibas tratadas con 25 y 50 μM mostraron una viabilidad de 91 y 90%, respectivamente.

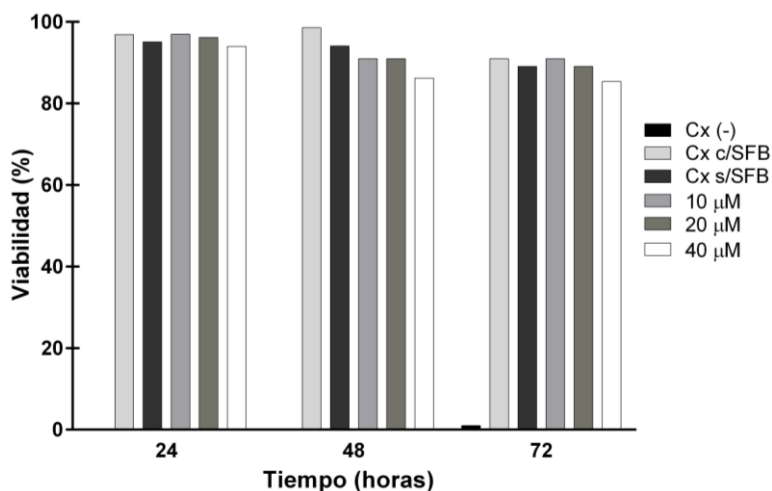


Figura 27. Viabilidad de los trofozoítos de *N. gruberi* co-incubados con el inhibidor MG-132 durante 24, 48 y 72 horas. Como control negativo se utilizaron amibas fijadas en paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con PBS-Tritón X100 al 0.2%. Los trofozoítos tratados con el inhibidor fueron incubados en medio Bactocasitona sin SFB. Los resultados fueron obtenidos mediante el uso del fluorocromo Sytox green y citometría de flujo. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se registraron 20,000 eventos por muestra.

A las 48 horas, la viabilidad de los controles se mantuvo en 98% pero la viabilidad de las amibas incubadas en presencia del inhibidor disminuyó a 92, 86 y 86%, de acuerdo a la concentración utilizada.

Para las 72 horas, la viabilidad de los 3 tratamientos disminuyó observándose porcentajes de 88, 85 y 83% en cada concentración utilizada.

Estos resultados en conjunto con los valores obtenidos al realizar la curva de proliferación (Figura 28), indicaron que las amibas crecidas en presencia del inhibidor MG-132 a las concentraciones de 10, 25 y 50 μM mantuvieron niveles de viabilidad aceptables, sin embargo, el inhibidor tuvo efecto en la proliferación de los trofozoítos solo a los tiempos de 48 y 72 horas, por lo que se decidió utilizar la concentración de 10 μM de MG-132 para experimentos posteriores con *N. gruberi*.

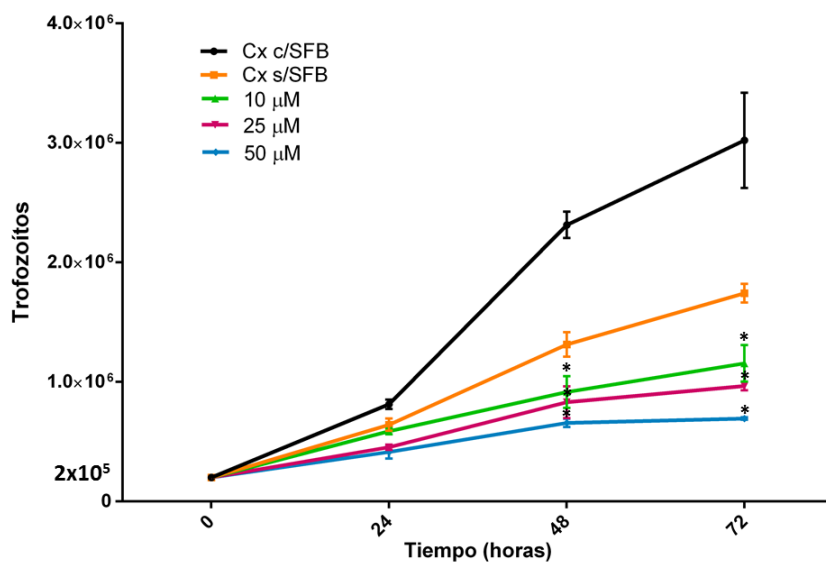


Figura 28. Proliferación de los trofozoítos de *N. gruberi* co-incubados con MG-132. * $P < 0.0001$.

Se realizó también la co-incubación de trofozoítos de *N. fowleri* con MG-132 para determinar el efecto del mismo en la viabilidad de las amibas (Figura 29). Durante los tiempos de 24, 48 y 72 horas, la viabilidad de las amibas control incubadas en medio Bactocasitona con o sin SFB y las amibas tratadas con MG-132 se mantuvo en valores similares o superiores al 91%. Se observó por tanto que las concentraciones probadas del inhibidor no tienen un impacto en la viabilidad de *N. fowleri* durante el transcurso de su co-incubación.

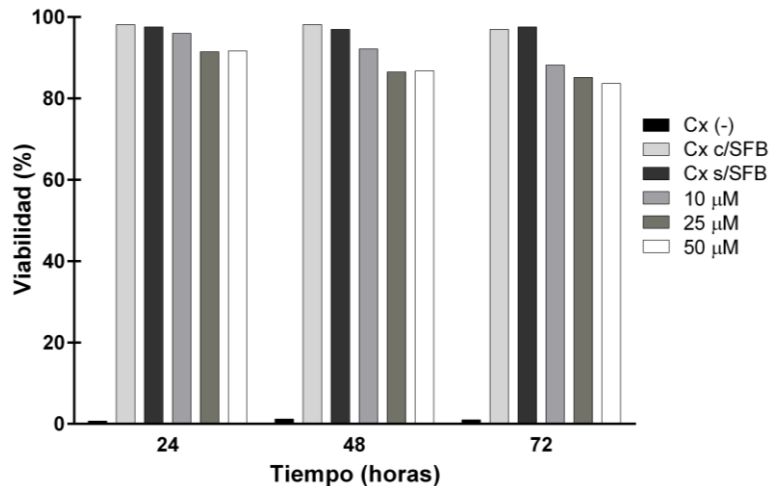


Figura 29. Viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados con el inhibidor MG-132 durante 24, 48 y 72 horas. Como control negativo se utilizaron amibas fijadas en paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con PBS-Tritón X100 al 0.2%. Los trofozoítos tratados con el inhibidor fueron incubados en medio Bactocasitona sin SFB. Los resultados fueron obtenidos mediante el uso del fluorocromo Sytox green y citometría de flujo. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se registraron 20,000 eventos por muestra.

También se realizó la cuantificación de las amibas recuperadas en todos los tratamientos a los tiempos señalados (mediante el uso de una cámara de Neubauer) y se encontró que solo en las concentraciones de 25 y 50 μM tuvieron un efecto negativo en la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri* con respecto al control (Figura 30). Por lo tanto, para futuros ensayos con se determinó utilizar la concentración de 25 μM .

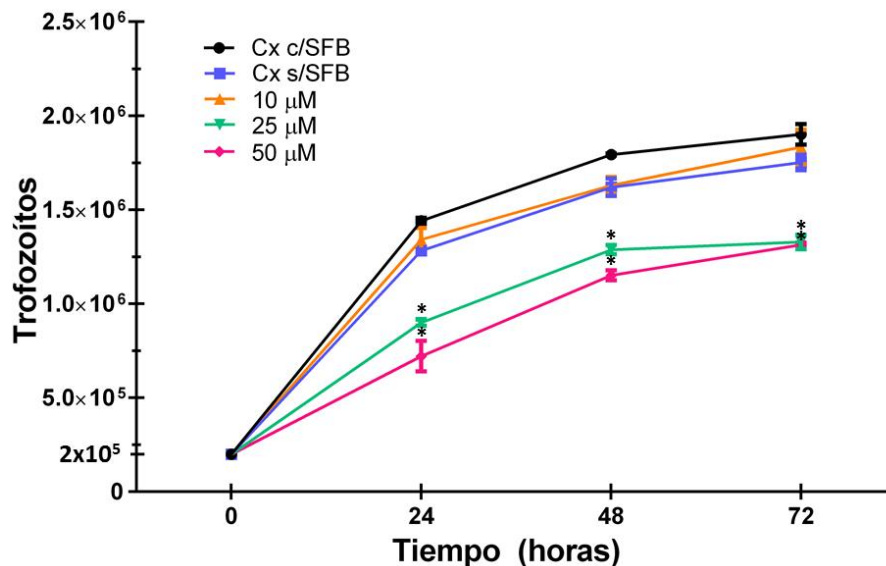


Figura 30. Proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados con MG-132. * $P < 0.0001$.

6.5 Proliferación de *N. gruberi* y *N. fowleri* en co-incubación con los inhibidores del proteosoma

Una técnica bastante empleada para medir proliferación celular es mediante el uso del reactivo MTT. El principio de esta técnica se basa en la reducción del MTT mediante la actividad metabólica de las células (principalmente la actividad de las deshidrogenasas). El MTT es convertido a cristales de formazan, que deben disolverse para determinar la densidad óptica, la cual será directamente proporcional a la cantidad de células vivas presentes en los cultivos.

Se utilizó el reactivo MTT para cuantificar el efecto de los inhibidores en la proliferación de los trofozoítos de ambas especies de *Naegleria*.

Se sembraron 2×10^5 trofozoítos de *N. gruberi* por tratamiento y los resultados obtenidos mostraron que los controles sin inhibidor proliferan gradualmente hasta tener 2 millones de amibas por pozo a las 72 horas (Figura 31), lo que significa que el número de amibas incrementó hasta 10 veces la cantidad original.

Se observó el efecto contrario en las amibas co-incubadas con los inhibidores, ya que los valores obtenidos fueron entre los 200,000 y 300,000 trofozoítos por pozo a los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

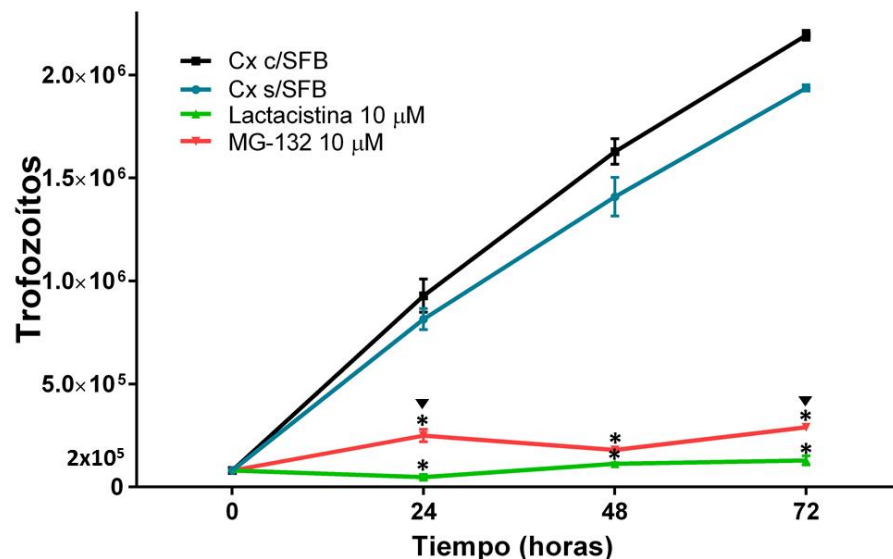


Figura 31. Proliferación de los trofozoítos de *N. gruberi* en presencia de los inhibidores Lactacistina y MG-132. Cada tratamiento se realizó por duplicado. * $P < 0.0001$ del análisis estadístico de los tratamientos con respecto al control sin SFB; $\blacktriangledown P < 0.0001$ del análisis estadístico entre tratamientos.

Además, se realizó el análisis estadístico de la cantidad de amibas tratadas con Lactacistina con respecto al tratamiento con MG-132 a los tiempos de 24, 48 y 72 horas. Se encontró que ambos inhibidores afectan de manera distinta en la proliferación de los trofozoítos y que la Lactacistina tiene un mayor efecto inhibitorio.

Estos resultados indican que el proteosoma 20S participa en la proliferación de *N. gruberi*, ya que los inhibidores de este complejo tienen un efecto amebostático que se mantiene con el transcurso del tiempo; sin embargo el inhibidor Lactacistina tiene un mayor impacto en este proceso biológico.

Por otro lado, se realizó también el ensayo de MTT para establecer el efecto del inhibidor MG-132 en la proliferación de trofozoítos de *N. fowleri* (Figura 32). Se encontró que las amibas incubadas en medio con SFB proliferaron de manera gradual hasta alcanzar números de 3 millones de amibas por pozo. Por otro lado, el control sin SFB llegó hasta los 2.5 millones de amibas a las 72 horas.

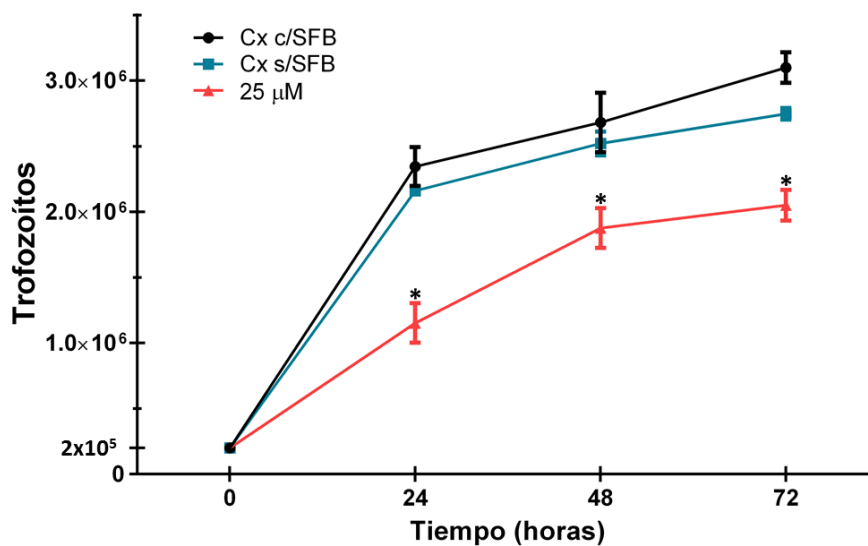


Figura 32. Proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri* en presencia del inhibidor MG-132. Cada tratamiento se realizó por duplicado. * $P < 0.0001$ del análisis estadístico del tratamiento con inhibidor con respecto al control sin SFB.

El inhibidor MG-132 causó un retraso en la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri*, ya que se encontraron números de 1, 1.5 y 2 millones de amibas a los tiempos de 24, 48 y 72 horas de co-incubación.

Los resultados indican que el compuesto MG-132 es capaz de interactuar con el proteosoma 20S de *N. fowleri* y causar una disminución en la proliferación de las amibas.

Como conclusión, los inhibidores Lactacistina y MG-132 a la concentración de 10 μM tuvieron un efecto amebostático en la proliferación de los trofozoítos *N. gruberi*. Por otro lado, el inhibidor MG-132 a la concentración de 25 μM solamente causó un retraso en la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri*.

7. DISCUSIÓN

El año 1995 fue un año importante en el estudio del proteosoma 20S, debido a que se reportó, por una parte, la estructura tridimensional del complejo completo y de cada subunidad (tipo α y β) (Löwe *et al.*, 1995), además, se encontró que las subunidades β tienen actividad del tipo Treonina-proteasa (Seemüller *et al.*, 1995), esto fue reportado en la arquea *T. acidophilum*.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto, muestran similitudes con lo descrito en estos trabajos, entre ellas:

- a) El Proteosoma 20S está compuesto por 7 subunidades α y 7 subunidades β .
- b) Las subunidades α tienen una región de 35 aminoácidos altamente conservada en su extremo amino-terminal.
- c) Las secuencias del proteosoma no tienen similitud con ninguna otra proteasa conocida.
- d) Las subunidades α y β están conformadas por una capa de 5 β -plegadas anti-paralelas a 5 β -plegadas, separadas por un giro de alrededor de 50-80° entre los extremos de dichas estructuras. Las dos capas se encuentran rodeadas por α -hélices y en las subunidades α contienen en el extremo amino-terminal a la estructura denominada hélice H0, encargada de permitir el paso del sustrato al interior del núcleo 20S.
- e) La conformación tridimensional de las subunidades α y β es altamente similar entre ellas, a pesar de que las secuencias de aminoácidos no son parecidas.

En el presente trabajo se encontraron 6 diferentes subunidades tipo α en el organismo *N. gruberi* y 7 α distintas en *N. fowleri*; además de 7 subunidades diferentes del tipo β en cada especie de amibas. Cada subunidad es codificada por un gen independiente, lo cual es una característica del proteosoma 20S de eucariontes (Unno *et al.*, 2002; Groll *et al.*, 2005). A pesar de que no fue posible identificar a la subunidad tipo α_3 de *N. gruberi*, se ha reportado en *S. cerevisiae* que esta subunidad no es indispensable para la función proteolítica del proteosoma (Finley *et al.*, 2012), por lo que el proteosoma 20S de *N. gruberi* podría estar llevando a cabo su función, pero tener un orden inusual, en el que los anillos de subunidades α se encuentren conformados únicamente por 6 subunidades, mientras que los anillos internos contengan 7 subunidades tipo β . Lo anterior difiere con la descripción de Gallastegui y Groll (2010), puesto que determinan que otros organismos eucariontes tienen 7 subunidades α y 7 subunidades β distintas que conforman un complejo $\alpha_1-7, \beta_1-7, \beta_1-7, \alpha_1-7$.

Las secuencias de aminoácidos de las subunidades α mostraron regiones altamente conservadas entre ellas, por ejemplo, la hélice H0 en el extremo amino-terminal, la cual se encarga de la interacción y ensamble de los anillos de las subunidades α , así como las interacciones del proteosoma 20S con los complejos reguladores (Rabl *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2015).

Se encontraron también algunos motivos, como GxxxD, que es un motivo altamente conservado en las subunidades α y β del proteosoma de arqueas y eucariontes (Bartholomeu *et al.*, 2001). Este motivo, junto con el motivo RPxG podrían ser los encargados de regular el tamaño y rigidez para la apertura del poro del núcleo 20S. Estos motivos se encontraron en todas las subunidades α de *N. gruberi* y *N. fowleri*.

Además, las subunidades α de ambas especies cuentan con un residuo de tirosina en el extremo amino-terminal, dicho residuo es indispensable para el ensamble de los anillos de subunidades α de arqueas y eucariontes (Dahan *et al.*, 2001).

Previamente se reportó un residuo de treonina altamente conservado en el extremo amino-terminal de la subunidad α_3 de *T. acidophilum* y *S. cerevisiae*, que participa en la regulación de la apertura y cierre del poro del núcleo catalítico (Gille *et al.*, 2003). Los resultados *in silico* demostraron que *N. fowleri* cuenta con esta subunidad y el residuo de treonina, sin embargo, a pesar de que la especie *N. gruberi* no cuenta con la

secuencia correspondiente a la subunidad α_3 , sí cuenta con un residuo de treonina en el extremo amino-terminal de la subunidad α_2 , por lo que esta subunidad podría estar llevando a cabo la función de compuerta en el proteosoma 20S.

En 2008, Rabl y colaboradores utilizaron varios sustratos para determinar la interacción del proteosoma 20S con un regulador heterólogo del proteosoma 19S en la arquea *T. acidophilum* (llamado PAN) y así lograron establecer que los residuos glicina-34, lisina-66, leucina-81 y valina-82 son esenciales para la unión del proteosoma 20S con los complejos reguladores de tipo ATPasas. Estos residuos se encuentran presentes en las subunidades α de *N. gruberi* y *N. fowleri*, por lo que el análisis sugiere que el proteosoma 20S de estas especies puede interactuar con complejos reguladores que participan en la regulación de la selectividad, entrada y salida de sustratos al núcleo proteolítico. Por lo tanto, la función de las subunidades α es de estructura y regulación de la actividad del núcleo 20S (Bochtler *et al.*, 1999) y no se conoce que lleven a cabo una actividad proteolítica (Lee y Goldberg, 1998).

Cinco subunidades β , son sintetizadas como zimógenos, ya que durante el ensamble del proteosoma 20S, la región amino-terminal de la proteína es eliminada para dejar expuesto un residuo de treonina en el nuevo extremo amino terminal de las subunidades β catalíticas (β_1 , β_2 y β_5) (Arendt y Hochstrasser, 1997). Esta característica convierte a las subunidades catalíticas en enzimas de la familia de las hidrolasas Ntn o hidrolasas con el nucleófilo de treonina en el extremo amino-terminal (Chen y Hochstrasser, 1996). En las secuencias de las subunidades β de *N. gruberi* y *N. fowleri*, se encontró que las secuencias de β_1 -2, β_4 -7 son sintetizadas como zimógenos, y que el extremo amino-terminal es procesado durante el ensamble del proteosoma, quedando expuesto un residuo de treonina según la predicción realizada; este resultado es contrario a lo descrito por Unno y colaboradores (2002), ya que describen que en *Bos taurus* la subunidad β_4 es la única que mantiene un residuo de metionina en la posición 1 una vez ensamblado el proteosoma. El encontrar también un propéptido en la subunidad β_5 de ambas especies resulta importante, ya que se ha descrito que el propéptido de esta subunidad es esencial en la maduración del proteosoma y es crucial para la supervivencia de la célula (Gallastegui y Groll, 2010).

Previamente se determinó que en el proteosoma 20S de organismos eucariontes, la subunidad $\beta 1$ tiene actividad del tipo caspasa; $\beta 2$ posee actividad tipo tripsina, mientras que $\beta 5$ posee actividad tipo quimiotripsina (Heinemeyer *et al.*, 1997). Esta especificidad es brindada por los residuos arginina-45, ácido glutámico-53 y metionina-45 en las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$, respectivamente (Löwe *et al.*, 1995; Groll *et al.*, 2004). Estos 3 residuos fueron encontrados en las subunidades β catalíticas de *N. gruberi* y *N. fowleri*, lo cual concuerda con lo reportado por Wilk y Orłowski (1980), quienes mediante el uso de sustratos fluorogénicos describieron que en eucariontes la “endopeptidasa de alto peso molecular (700 kDa) (proteosoma 20S) posee 3 distintos tipos de actividad proteolítica: tipo peptidil-glutamil hidrolasa, tipo tripsina y tipo quimiotripsina”, esto utilizando proteosomas aislados a partir de pituitaria de bovino. Mientras que, en 1989, Dahlmann y colaboradores purificaron y determinaron que el proteosoma 20S de la arquea *T. acidophilum* posee únicamente actividad de tipo quimiotripsina. Por lo tanto, las especies de *Naegleria* mostraron 3 posibles tipos de actividad catalítica, puesto que están clasificados en el reino Eukarya.

Además, en ambas especies de *Naegleria* se encontraron los residuos treonina-1, lisina-33, glicina-128, serina-129 y glicina-130 que están altamente conservados y son indispensables para la actividad enzimática de las subunidades catalíticas (Löwe *et al.*, 1995).

Nuevamente se encontró el motivo GxxxD, lo que sugiere que las subunidades α y β de ambas especies, provienen de un ancestro en común (Löwe *et al.*, 1995), debido a que existen residuos, motivos y dominios altamente conservados en el proteosoma 20S de arqueas y eucariontes (Fort *et al.*, 2015). Además, los proteosomas no solo se originan de un gene ancestral común, sino que su naturaleza también ha evolucionado y el complejo se ha ajustado para las cubrir las demandas de cada organismo (Gallastegui y Groll, 2010). Nuestros resultados demostraron que *Naegleria* comparte características con el proteosoma de otras especies, y a su vez tiene secuencias propias de cada subunidad.

Lo anterior fue corroborado mediante la elaboración de un árbol filogenético sin raíz, en donde se encontró que las subunidades α y β de *N. gruberi* y *N. fowleri* comparten

características propias que las clasifican en el mismo grupo que sus subunidades ortólogas en otros protozoarios.

Por otro lado, los modelamientos estructurales predijeron que las subunidades α y β de ambas especies de *Naegleria*, presentan una conformación clásica de 2 capas de estructuras β plegadas al centro, rodeadas por α hélices en los extremos, lo cual concuerda con lo descrito por Löwe y colaboradores desde 1995.

Además de los hallazgos *in silico*, existe evidencia experimental directa e indirecta sobre la existencia del proteosoma 20S en otros protozoarios como: *D. discoideum* (Schauer *et al.*, 1993), *E. histolytica* (Scholze *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997; Makioka *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2002), *T. cruzi* (González *et al.*, 1996; De Diego *et al.*, 2001; Bartholomeu *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2009), *P. berghei* (Gantt *et al.*, 1998; Rivo *et al.*, 2013), *P. falciparum* (Gantt *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000; Sessler *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015), *P. yoelii* (Gantt *et al.*, 1998), *G. lamblia* (Emmerlich *et al.*, 1999; Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2012), *E. invadens* (González *et al.*, 1999; Makioka *et al.*, 2002), *L. mexicana* (Robertson, 1999), *L. donovani* (Christensen *et al.*, 2000), *C. parvum* (Chung *et al.*, 2000), *T. gondii* (Shaw *et al.*, 2000; Paugam *et al.*, 2001), *T. brucei* (Hua *et al.*, 1996; Lomo *et al.*, 1997; Mutomba *et al.*, 1997; To y Wang, 1997; Huang *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 1999a; Yao *et al.*, 1999b; Radwanska *et al.*, 2000; Nkemgu-Njinkeng *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), *L. chagasi* (Silva-Jardim *et al.*, 2004), *L. major* (Dubessay *et al.*, 2006), *T. foetus* (Pereira-Neves *et al.*, 2015; Pereira-Neves *et al.*, 2016) y *A. castellanii* (Siddiqui *et al.*, 2016).

Mediante el uso de inhibidores, se ha descrito que el proteosoma 20S tiene participación en procesos biológicos como son la proliferación, diferenciación, actividad proteolítica y capacidad infectiva de algunos parásitos protozoarios.

En el presente trabajo, mediante el tratamiento de trofozoítos de *N. gruberi* con Lactacistina y MG-132 a la concentración de 10 μ M se observó un efecto amebostático a los tiempos de 24, 48 y 72 horas. Un efecto similar fue reportado por González y colaboradores (1999) y por Makioka y colaboradores (2002), ya que encontraron que la Lactacistina, β -lactona y MG-132 a la concentración de 10 μ M tuvieron un efecto amebostático en trofozoítos de *E. invadens* y *E. histolytica*. Además, De Diego y colaboradores (2001) reportaron que el uso de Lactacistina a la concentración de 30 μ M

detiene la proliferación de tripomastigotes de *T. cruzi* e induce el arresto del ciclo celular en las fases G2+M y G1+S. Además, el tratamiento con Lactacistina a 3 μ M inhibe la síntesis de ácidos nucleicos en trofozoítos *P. falciparum*, lo que se traduce en la inhibición de la proliferación (Gantt *et al.*, 1998).

Por otro lado, el tratamiento con MG-132 a 25 μ M en los trofozoítos de *N. fowleri* representó solamente un retraso en la proliferación de las amibas. Un resultado similar fue reportado por Robertson en 1999, ya que encontró que en cultivos de amastigotes de *L. mexicana*, el uso de Lactacistina y MG-132 a 5 μ M causa una reducción en la proliferación del microorganismo. Los resultados también concuerdan con Silva-Jardim y colaboradores (2004), quienes encontraron que en *L. chagasi*, se observó una disminución en la división celular al tratar a promastigotes con 50 μ M de Lactacistina. Por lo anterior no se descarta la posibilidad de que los trofozoítos de *N. fowleri* requieran de concentraciones más elevadas de los inhibidores para producir un efecto amebostático.

Además de la evidencia experimental, los resultados *in silico* demostraron que *N. gruberi* y *N. fowleri* cuentan con los aminoácidos treonina-21, glicina-46 y alanina-49 de las subunidades β 1 y β 2. Se sabe que estos aminoácidos permiten la interacción con Lactacistina (Fenteany *et al.*, 1995; Groll, 2004). Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que la Lactacistina actúe de manera muy específica con las dos especies de *Naegleria*, causando efecto en la proliferación de los trofozoítos.

Por otro lado, Di Giovanni y colaboradores (2016) encontraron que MG-132 tiene efecto inhibitorio con las 3 subunidades catalíticas, lo cual indicaría que el proteosoma 20S de ambas especies de *Naegleria* cuenta con estos tipos de actividad y por tanto es posible su interacción con el inhibidor.

En conclusión, el efecto de los inhibidores en la proliferación de *N. gruberi* y *N. fowleri* se puede atribuir a la participación del proteosoma en este proceso, puesto que la Lactacistina no inhibe ningún otro tipo de proteasa conocida y su efecto en un organismo puede relacionarse directamente con una función del proteosoma (Fenteany *et al.*, 1995).

Por otra parte, mediante microscopía confocal se logró localizar al proteosoma 20S de *N. gruberi* y *N. fowleri* solamente en el citoplasma de las amibas. Dicho resultado

concuera con lo reportado para *T. gondii* (Paugam *et al.*, 2001), *E. histolytica* (Sánchez *et al.*, 2002) y *T. foetus* (Pereira-Neves *et al.*, 2015), ya que en estos organismos se encontró una distribución citoplásmica y perinuclear del proteosoma. Sin embargo, en la amiba de vida libre *D. discoideum* se logró observar al proteosoma 20S en el citoplasma y núcleo de las células (Schauer *et al.*, 1993).

Previamente se reportó que el proteosoma 20S a nivel nuclear regula la concentración de una cinesina en promastigotes de *L. major* (Dubessay *et al.*, 2006). Lo anterior fue obtenido mediante el uso de MG-132 como estímulo. Estos resultados pueden sugerir que algún estímulo de estrés promueva la translocación del proteosoma 20S al núcleo de *N. gruberi* y *N. fowleri*. Dicho fenómeno sería posible, debido a que se ha reportado que el núcleo 20S completo más algunos componentes como importina β , Hsp90 y las subunidades Rpn1 y Rpn2 (del proteosoma 19S) favorecen la translocación al núcleo a través de los complejos del poro nuclear (CPN) (Savulescu *et al.*, 2011). Además, el CPN permite el paso de partículas de hasta 390 Å (Pante y Kann, 2001) mientras que el proteosoma 20S tiene una longitud de 190 Å.

Se ha reportado que, en eucariontes superiores el proteosoma se encarga de degradar proteínas localizadas en el núcleo, como ciclinas (mitóticas y de G1), cinasas dependientes de ciclinas (CDK), inhibidores (p27); c-Jun, c-Fos, c-Mos, E2A, p53; cinasas asociadas a receptores, DNA-topoisomerasa y ornitina-descarboxilasa (Lee y Goldberg, 1998). Por lo anterior, resultaría de vital importancia la ubicación del proteosoma en el núcleo de *N. gruberi* y *N. fowleri*.

Por otra parte, se ha descrito la reducción en la capacidad infectiva de esporozoítos de *P. falciparum* pre-tratados con 3 μ M de Lactacistina, además de alterar su morfología normal. También, mediante el uso de una vacuna de DNA dirigida a una subunidad tipo α de *L. donovani*, se observó que las lesiones en ratones infectados fueron de menor tamaño (Gantt *et al.*, 1998). Por lo anterior, el proteosoma 20S resulta un blanco farmacológico importante para el diseño experimental y racional de drogas como tratamiento contra la MAP causada por *N. fowleri*.

8. CONCLUSIONES

- 8.1 *Naegleria gruberi* y *Naegleria fowleri* poseen en su genoma las secuencias que codifican para las subunidades α y β del proteosoma 20S.
- 8.2 Ambas especies de *Naegleria* presentan al proteosoma con una localización citoplásmica.
- 8.3 El proteosoma 20S de *N. gruberi* y *N. fowleri* participa en la proliferación de las amibas.
- 8.4 El proteosoma 20S de *N. fowleri* podría ser blanco atractivo para el diseño racional de drogas contra la MAP.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar el papel del proteosoma 20S en el enquistamiento de *N. fowleri*.
- Purificar el proteosoma 20S de *Naegleria fowleri*.
- Realizar electroforesis de 2 dimensiones para determinar los componentes del complejo.
- Especificar si los inhibidores del proteosoma arrestan el ciclo celular de *N. fowleri* y determinar en qué fases sucede este evento.
- Determinar mediante espectrometría de masas las secuencias correspondientes a cada subunidad α y β .
- Establecer el tipo de actividad proteolítica del proteosoma mediante el uso de sustratos fluorogénicos.
- Co-localizar a nivel ultraestructural las subunidades tipo α y β para determinar la ubicación específica del complejo.
- Determinar el efecto de inhibidores del proteosoma utilizados como tratamiento en un modelo *in vivo* de MAP.
- Analizar *in silico* los demás componentes del sistema ubiquitina-proteosoma en el genoma de *N. fowleri*.
- Utilizar anticuerpos anti-ubiquitina y anti-subunidades que conforman el proteosoma 19S para determinar si *N. fowleri* cuenta con el proteosoma 26S *in vitro*.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. 2015. "Molecular Biology of the Cell". Sixth Edition. Garland Science. New York, United States of America. p. 157-159; 357-360.

Aldape K., Huizinga H., Bouvier J. y McKerrow J. 1994. "Naegleria fowleri: Characterization of a Secreted Histolytic Cysteine Protease". *Experimental Parasitology* 78:230-241.

Arendt C.S. y Hoschtrasser M. 1997. "Identification of the Yeast 20S Proteasome Catalytic Centers and Subunit Interactions Required for Active-Site Formation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:7156-7161.

Arrigo A.P., Tanaka K., Goldberg A.L. y Welch W.J. 1988. "Identity of the 19S 'Prosome' Particle with the Large Multifunctional Protease Complex of Mammalian Cells (The Proteasome)". *Nature* 331(6152):192-194.

Bartholomeu D.C., Batista J.A., Vainstein M.H., Lima B.D. y de Sá M.C. 2001. "Molecular Cloning and Characterization of a Gene Encoding the 29-kDa Proteasome Subunit from *Trypanosoma cruzi*". *Molecular and Genetic Genomics* 265:986-992.

Bochtler M., Ditzel L., Groll M., Hartmann C. y Huber R. 1999. "The Proteasome". *The Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 28:295-317.

Borissenko L., y Groll M. 2007. "20S Proteasome and its Inhibitors: Crystallographic Knowledge for Drug Development". *Chemical Reviews* 107:687-717.

Bradford M.M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding". *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Carter, R. F. 1969. "Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria* sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis". *Journal of Clinical Pathology* 22(4):470-474.

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". *The Journal of Pathology* 100(4):217-244.

Certad G., Abraham A. y Georges E. 1999. "Cloning and Partial Characterization of the Proteasome S4 ATPase from *Plasmodium falciparum*". *Experimental Parasitology* 93:123-131.

Chen P. y Hochstrasser M. 1996. "Autocatalytic Subunit Processing Couples Active Site Formation in the 20S Proteasome to Completion of Assembly". *Cell* 83:961-972.

Christensen C.B.V., Jørgensen L., Jensen A.T.R., Gasim S., Chen M., Kharazmi A., Theander T.T. y Andresen K. 2000. "Molecular Characterization of a *Leishmani donovani* cDNA Clone with Similarity to Human 20S Proteasome a-type Subunit". *Biochimica et Biophysica Acta* 1500:77-87.

Chung P.A., Johnson J., Khramtsov N.K. y Upton S.J. 2000. "Cloning and Molecular Characterization of a Gene Encoding a *Cryptosporidium parvum* Putative 20S Proteasome β -Type Subunit". 11(3-4):309-314.

Cope J.R., Ratard R.C., Hill V.R., Sokol T., Causey J.J., Yoder J.S., Mirani G., Mull B. y Mukerjee K.A. 2015. "First Association of a Primary Amebic Meningoencephalitis Death with Culturable *Naegleria fowleri* in Tap Water from a U.S. Treated Public Drinking Water System". *Clinical Infectious Disease* 60(8).

Dahan J., Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P. y Suty L. 2001. "Cryptogein Affects Expression of alpha3, alpha6 and beta1 20S Proteasome Subunits Encoding Genes in Tobacco". *Journal of Experimental Botany* 52:1947-1948.

Dahlmann B., Kopp F., Kuehn L., Niedel B., Pfeifer G., Hegerl R. y Baumeister W. 1989. "The Multicatalytic Proteinase (Prosome) is Ubiquitous from Eukaryotes to Archaeobacteria". *FEBS Letters* 251(1-2):125-131.

Debnath A., Tunac J.B., Galindo-Gómez S., Silva-Olivares A., Shibayama M. y McKerrow J.H. 2012. "Corifungin, a New Drug Lead against *Naegleria*, Identified from a High-Throughput Screen". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(11): 5450-5457.

de Diego J.L., Katz J.M., Marshall P., Gutiérrez B., Manning J.E., Nussenzweig V. y González J. 2001. "The Ubiquitin-Proteasome Pathways Plays an Essential Role in Proteolysis during *Trypanosoma cruzi* Remodeling". *Biochemistry* 40:1053-1062.

De Jonckheere J F. 2002. "A Century of Research on the Amoebflagellate Genus *Naegleria*". *Acta Protozoologica* 41:309-342.

De Jonckheere J.F. 2011. "Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoebflagellate *Naegleria fowleri*". *Infection, Genetics and Evolution* 11:1520-1528.

De Jonckheere J.F. 2014. "What we do know about the genus *Naegleria*?". *Experimental Parasitology* 145:S2-S9.

Diamond L.S., Harlow D.R. y Cunnick C.C. 1978. "A New Medium for the Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72:431-432.

- Gallastegui N. y Groll M. 2010. "The 26S Proteasome: Assembly and Function of a Destructive Machine". *Trends in Biochemical Sciences* 35(11):634-642.
- Gantt S., Myung J., Briones M., Li W., Corey E., Omura S., Nussenzweig V., Sinnis P. 1998. "Proteasome Inhibitors Block Development of Plasmodium spp.". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Oct:2731-2738.
- Gille C., Goede A., Schlöetelburg C., Preissner R., Kloetzel P. M., Göbel U. B. y Frömmel C. 2003. "A Comprehensive View of Proteasomal Sequences Implications for the Evolution of the Proteasome". *Journal of Molecular Biology* 326:1437-1448.
- González J., Ramalho-Pinto F.J., Frevert U., Ghiso J., Tomlinson S., Scharfstein J., Corey E.J. y Nussenzweig V. 1996. "Proteasome Activity is Required for the Stage-Specific Transformation of a Protozoan Parasite". *Journal of Experimental Medicine* 184:1909-1918.
- González J., Bai G., Frevert U., Corey E.J. y Eichinger D. 1999. "Proteasome-Dependent Cyst Formation and Stage-Specific Ubiquitin mRNA Accumulation in *Entamoeba invadens*". *European Journal of Biochemistry* 264:897-904.
- Gräwert M.A. y Groll M. 2010. "Eukaryotic 20S Proteasome". *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3684-3691.
- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D. y Huber R. 1997. "Structure of the 20S Proteasome from Yeast at 2.4 Å Resolution". *Nature* 386:463-471.
- Groll M., Bajorek M., Kohler A., Moroder L. y Rubin D. M. 2000. "A Gated Channel into the Proteasome Core Particle". *Nature Structural and Molecular Biology* 7:1062-1067.
- Groll M. 2004. "Inhibitors of the Eukaryotic 20S Proteasome Core Particle: A Structural Approach". *Biochimica et Biophysica Acta* 1695:33-44.
- Groll M., Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T. y Huber R. 2005. "Molecular Machines for Protein Degradation". *ChemBioChem* 6:222-256.
- Gutiérrez B., Osorio L., Motta M.C., Huima-Byron T., Erdjument-Bromage H., Muñoz C., Sagua H., Mortara R., Echeverría A., Araya J. y González J. 2009. "Molecular Characterization and Intracellular Distribution of the Alpha 5 Subunit of *Trypanozoma cruzi* 20S Proteasome". *Parasitology International* 58:367-374.
- Han K.L., Lee H.J., Shin M.H., Shin H.J., Im K.I. y Park S.J. 2004. "The Involvement of an Integrin-like Protein and Protein Kinase C in Amoebic Adhesion to Fibronectin and Amoebic Cytotoxicity". *Parasitology Research* 94:53-60.

- Hanna J. y Finley D. 2007. "A Proteasome for all Occasions". *FEBS Letters* Jun 581(15):2854-2861.
- Harris J.R. 1968. "Release of Macromolecular Protein Component from Human Erythrocyte Ghosts". *Biochimica et Biophysica Acta* 150:534-537.
- Heinemeyer W., Krimmer F.M, Stachon U. y Wolf D.H. 1997. "The Active Sites of the Eukaryotic 20S Proteasome and their Involvement in Subunit Precursor Processing". *Journal of Biological Chemistry* 272:25200-25209.
- Heink S., Ludwig D., Kloetzel P.M. y Kruger E. 2005. "IFN-gamma-induced Immune Adaptation of the Proteasome System is an Accelerated and Transient Response". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:9241–9246.
- Hendil K. B., Kriegenburg F., Tanaka K., Murata S., Lauridsen AM. B., Johnsen A. H. y Harmann-Petersen R. 2009. *Journal of Molecular Biology* 394:320-328.
- Herbst R., Ott C., Jacobs T., Marti T., Marciano-Cabral F. y Leippe M. 2002. "Pore-forming Polypeptides of the Pathogenic Protozoon *Naegleria fowleri*". *Journal of Biological Chemistry* 277(25): 22353-22360.
- Hicke, L. 2001. "Protein Regulation by Monoubiquitin". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:195–201.
- Hua S.B., To W.Y., Nguyen T.T., Wong M.L. y Wang C.C. 1996. "Purification and Characterization of Proteasomes from *Trypanosoma brucei*". *Molecular and Biochemical Parasitology* 78:33-46.
- Huang L., Shen M., Chernushevich I., Burlingame A., Wang C.C. y Robertson C.D. 1999. "Identification and Isolation of The Proteasome Subunits and their Encoding Genes from *Trypanosoma brucei*". *Molecular and Biochemical Parasitology* 102:211-223.
- Huber E.M., Basler M., Schwab R., Heinemeyer W., Kirk C.J., Groettrup M. y Groll M. 2012. "Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity". *Cell* 148:727-738.
- Jamerson M.; da Rocha-Azevedo B.; Cabral G.A. y Marciano-Cabral F. 2012. "Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-Pathogenic *Naegleria lovaniensis* Exhibit Differential Adhesión to, and Invasion of, Extracelular Matrix Proteins". *Microbiology* 158;791-803.
- Jerlström-Hultqvist J., Stadelmann B., Birkestedt S., Hellman U. y Svärd S. 2012. "Plasmid Vectors for Proteomic Analysis in *Giardia*: Purification of Virulence Factors and Analysis of the Proteasome". *Eukaryotic Cell* 11(7):864-873.

Jung T. y Grune T. 2008. "The Proteasome and its Role in the Degradation of Oxidized Proteins". *IUBMB Life* 60(11):743-752.

Kisselev A.F. y Goldberg A.L. 2001. "Proteasome Inhibitors: From Research Tools to Drug Candidates". *Chemistry and Biology* 8:739-758.

Kopp F., Steiner R., Dahlmann B., Kuehn L., Reinauer H. 1986. "Size and Shape of the Multicatalytic Proteinase from Rat Skeletal Muscle". *Biochimica et Biophysica Acta* Aug 872(3):253-260.

Lee D.H. y Goldberg A.L. 1998. "Proteasome Inhibitors: Valuable New Tools for Cell Biologists". *Trends in Cell Biology* 8:397-403.

Lee J., Kim J. H., Sohn H. J., Yang H. J., Na B. K., Chwae Y. J., Park S., Kim K. y Shin H. J. 2014. "Novel Cathepsin B and Cathepsin B-like Cysteine Protease of *Naegleria fowleri* Excretory-Secretory Proteins and their Biochemical Properties". *Parasitology Research* 113(8):2765-2776.

Li G.-D., Li J.-L, Mugthin M. y Ward S.A. 2000. "Molecular Cloning of a Gene Encoding a 20S Proteasome β Subunit from *Plasmodium falciparum*". *International Journal for Parasitology* 30:729-733.

Lomo P., Coetzer T. y Lonsdale-Eccles J. 1997. "Characterization of a Multicatalytic Proteinase Complex (20S Proteasome) from *Trypanosoma brucei brucei*". *Immunopharmacology* 36:285-293.

Löwe J, Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W. y Huber R. 1995. "Crystal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution". *Science* 268(5210):533–539.

Luciani F., Kesmir C., Mishto M., OrGuil M. y de Boer R.J. 2005. "A Mathematical Model of Protein Degradation by the Proteasome. *Biophysical Journal* 88:2422–2432.

Lupas A., Koster A.J. y Baumeister W. 1993. "Structural Features of 26S and 20S Proteasomes". *Enzyme Protein* 47(4-6): 252-273.

Lupas A. y Baumeister W. 1998. "The 20S Proteasome: Ubiquitin and the Biology of the Cell". *Springer*. Pp 127-146.

Makioka A., Kumagai M., Ohtomo H., Kobayashi S. y Takeuchi T. 2002. "Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*". *Parasitology Research* 88:454-459.

Marciano-Cabral F. 1988. "Biology of *Naegleria* spp.". *Microbiological Reviews*. Mar; 52(1):114-133.

Marciano-Cabral F. y Cabral G.A. 2007. "The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection". *FEMS Immunology Medical Microbiology* 51:243-259.

Martínez-Castillo M., Cárdenas-Zúñiga R., Coronado-Velázquez D., Debnath A., Serrano-Luna J. y Shibayama M. 2016. "*Naegleria fowleri* after 50 Years: Is it a Neglected Pathogen?". *Journal of Medical Microbiology*.

Moore B.S., Eustáquio A. y McGlinchey R. 2008. "Advances in and Applications of Proteasome Inhibitors". *Current Opinion in Chemical Biology* 12:434-440.

Mutomba M.C., To W.Y., Hyun W.C. y Wang C.C. 1997. "Inhibition of Proteasome Activity Blocks Cell Cycle Progression at Specific Phase Boundaries in African Trypanosomes". *Molecular and Biochemical Parasitology* 90:491-504.

Nandi D., Tahiliani P., Kumar A. y Chandu D. 2006. "The Ubiquitin-Proteasome System". *Journal of Biosciences* 31(1):137-155.

Nkemgu-Njinkeng J., Rosenkranz V., Wink M. y Steverding D. 2002. "Antitrypanosomal Activities of Proteasome Inhibitors". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(6):2038-2040.

NCBI: National Center for Biotechnology Information. "Taxonomy Browser". <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5761> Consultado: 7 de julio de 2017.

Oddó D. 2009. "Infecciones por Amebas de Vida Libre. Comentarios Históricos, Taxonomía y Nomenclatura, Protozoología y Cuadros Anátomo-Clínicos". *Revista Chilena de Infectología* 23(3):200-214.

Omura S., Fujimoto T., Otaguro K., Matsuzaki K., Moriguchi R., Tanaka H. y Sasaki Y. 1991. "Lactacystin, a Novel Microbial Metabolite, Induces Neurite-Genesis of Neuroblastoma Cells". *The Journal of Antibiotics* 44(1):113-116.

Panté N. y Kann M. 2002. "Nuclear Pore Complex is Able to Transport Macromolecules with Diameters of About 39 nm". *Molecular Biology of the Cell* 13:425-434.

Parlati F., Lee S.J., Aujay M., Suzuki E., Levitsky K., Lorens J.B., Micklem D.R., Ruurs P., Sylvain C., Lu Y., Shenk K.D. y Bennet M.K. 2009. "Carfilzomib can Induce Tumor Cell Death Through Selective Inhibition of the Chymotrypsin-like Activity of the Proteasome". *Blood* 114(16):3439-3447.

Pathare G. R., Nagy I., Bohn S., Unverdorben P., Hubert A., Körner R., Nickell S., Lasker K., Sali A., Tamura T., Nishioka T., Förster F., Baumeister W. y Bracher A. 2012. "The Proteasomal Subunit Rpn6 is a Molecular Clamp Holding the Core and Regulatory

Subcomplexes Together". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:149-154.

Paugam A., Creuzet C., Dupouy-Camet J. y Roisin M.P. 2001. "Evidence for the Existence of a Proteasome in *Toxoplasma gondii*: Intracellular Localization and Specific Peptidase Activities". *Parasite* 8:267-273.

Paugam A., Bulteau A., Dupouy-Camet J., Creuzet C. y Friguet B. 2003. "Characterization and role of protozoan parasite proteasomes". *TRENDS in Parasitology* Feb 19(2):55-59.

Pereira-Neves A., Gonzaga L., Menna-Barreto R.F.S. y Benchimol M. 2015. "Characterisation of 20S Proteasome in *Tritrichomonas foetus* and Its Role during the Cell Cycle and Transformation into Endoflagellar Form". *PLoS ONE* 10(6).

Pereira-Neves A., Menna-Barreto R. y Benchimol M. 2016. "The Fungal Metabolite Gliotoxin Inhibits Proteasome Proteolytic Activity and Induces an Irreversible Pseudocystic Transformation and Cell Death in *Tritrichomonas foetus*". *Parasitology Research* 115:3057-3069.

Rabl J., Smith D.M., Yu Y., Chang S.C., Goldberg A.L. y Cheng Y. 2008. "Mechanism of Gate Opening in the 20S Proteasome by the Proteasomal ATPases". *Molecular Cell* 30:360-368.

Ramos M.A., Stock R.P., Sánchez-López R., Olvera F., Lizardi P. y Alagón A. 1997. "The *Entamoeba histolytica* Proteasome α -subunit Gene". *Molecular and Biochemical Parasitology* 84:131-135.

Ramos P. C., Hockendorff J., Johnson E.S., Varshavsky A. y Dohmen R.J. 1998. "Ump1p is Required for Proper Maturation of the 20S Proteasome and Becomes its Substrate Upon Completion of the Assembly". *Cell* 92: 489–499.

Raule M., Cerruti F. y Cascio P. 2015. "Comparative Study of the Biochemical Properties of Proteasomes in Domestic Animals". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 166:43-49.

Rivo Y.B., Alkarimah A., Ramadhani N.N., Cahyono A.W., Laksmi D.A., Winarsih S. y Fitri L.E. 2013. "Metabolite Extract of *Streptomyces hygroscopicus* Hygroscopicus Inhibit the Growth of *Plasmodium berghei* Through Inhibition of Ubiquitin-Proteasome System". *Tropical Biomedicine* 30(2):291-300.

Robertson C. 1999. "The *Leishmania mexicana* Proteasome". *Molecular and Biochemical Parasitology* 103:49-60.

- Radwanska M., Couvreur B., Dumont N., Pays A., Vanhamme L. y Pays E. 2000. "A Transcrip Encoding a Proteasome Beta-Subunit and Zinc Finger Protein in *Trypanosoma brucei brucei*". *Gene* 000:43-50.
- Sánchez R., Alagón A. y Stock R.P. 2002. "*Entamoeba histolytica*: Intracellular Distribution of the Proteasome". *Experimental Parasitology* 102:187-190.
- Sánchez C., Liu C.H., Mayer S., Nurhasanah A., Cyrklaff M., Mu J., Ferding M., Stein W. y Lanzer M. 2014. "A HECT Ubiquitin-Protein Ligase as Novel Candidate Gene for Altered Quinine and Quinidine Responses in *Plasmodium falciparum*". *PLOS Genetics* 10(5):1-21.
- Savulescu A.F. y Glickman H.M. 2011. "Proteasome activator 200: the heat is on". *Molecular and Cellular Proteomics* 10(5).
- Scaglia M., Gatti S., Brustia R., Chichino G. y Rondanelli E. G. 1991. "Phagocytosis of Human Erythrocytes by *Naegleria* is not Related to Species Pathogenicity. A Phase-Contrast Cinemicrographic Study". *Microbiologica* 14(1):45-53.
- Schardinger F. 1899. "Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (Gymnamoeba) *Amoeba Gruberi*.
- Schauer T.M., Nesper M., Kehl M., Lottspeich F., Müller-Taubenberger A., Gerisch G. y Baumeister W. 1993. "Proteasome from *Dictyostelium discoideum*: Characterization of Structure and Function". *Journal of Structural Biology* 111:135-147.
- Scholze H., Frey S., Cejka Z. y Bakker-Grunwald T. 1996. "Evidence for the Existence of Both Proteasomes and a Novel High Molecular Weight Peptidase in *Entamoeba histolytica*". *The Journal of Biological Chemistry* 271(11):6212-6216.
- Schmidt M., Haas W., Cosas B., Santamaria P. G. Gygi S., Walz T. y Finley D. 2005. "The HEAT Repeat Protein Blm10 Regulates the Yeast Proteasome by Capping the Core Particle". *Nature Structural and Molecular Biology* 12:294-303.
- Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R. y Baumeister W. 1995. "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A Threonine Protease". *Science* 268:579-582.
- Sessler N., Krug K., Nordheim A., Mordmüller B. y Macek B. 2012. "Analysis of the *Plasmodium falciparum* Proteasome Using Blue Native PAGE and Label-free Quantitative Mass Spectrometry". *Amino Acids* 43:1119-1129.'
- Shaw M., He C., Roos D. y Tilney L. 2000. "Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*". *Parasitology* 121:35-47.

- Shibayama M., Serrano-Luna J., Rojas-Hernández S., Campos-Rodríguez R. y Tsutsumi V. 2003. "Interaction of Secretory Immunoglobulin A Antibodies with *Naegleria fowleri* Trophozoites and Collagen Type I. *Canadian Journal of Microbiology* 49(3): 164-661.
- Siddiqui R. y Khan N.A. 2014. "Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: An Old Enemy Presenting New Challenges". *PLoS Neglected Tropical Diseases* Aug 8(8).
- Siddiqui R., Saleem S. y Khan N.A. 2016. "The Effect of Peptidic and Non-Peptidic Proteasome Inhibitors on the Biological Properties of *Acanthamoeba castellanii* Belonging to the T4 Genotype". *Experimental Parasitology* 168:16-24.
- Silva-Jardim I., Horta M.F. y Ramalho-Pinto F.J. 2004. "The *Leishmania chagasi* proteasome: Role in Promastigotes Growth and Amastigotes Survival Within Murine Macrophages". *Acta Tropica* 91:121-130.
- Smith D. M., Chang S. C., Park S., Finley D., Cheng Y. y Goldberg A. 2007. "Docking of the Proteasomal ATPases' Carboxyl Termini in the 20S Proteasome's α Rings Opens the Gate for Substrate Entry". *Molecular Cell* 27(5):731-744.
- To W. y Wang C. 1997. "Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*". *FEBS Letters* 404:253-262.
- Unno M., Mizushima T., Morimoto Y., Tomisugi Y., Tanaka K., Yasuoka N. y Tsukihara T. 2002. "The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution". *Structure* 10:609-618.
- Visvesvara G.S., Moura H. y Schuster F.L. 2007. "Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*". *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 50:1-26.
- Visvesvara G.S. 2010. "Free-Living Amebae as Opportunistic Agents of Human Disease". *Journal of Neuroparasitology*.
- Wang C.C., Bozdech Z., Liu C.-L., Shipway A., Backes B.J., Harris J.L. y Bogoy M. 2003. "Biochemical Analysis of the 20S Proteasome of *Trypanosoma brucei*". *The Journal of Biological Chemistry* 278(18):15800-15808.
- Wang L., Delahunty C., Fritz-Wolf K., Rahlfs S., Prieto J.H., Yates J.R. y Becker K. 2015. "Characterization of the 26S Proteasome Network in *Plasmodium falciparum*". *Scientific Reports* 5.
- Wilk S. y Orlowski M. 1980. "Cation-Sensitive Neutral Endopeptidase: Isolation and Specificity of the Bovine Pituitary Enzyme". *Journal of Neurochemistry* 35(5):1172-1182.

Woelk T., Sigismund S., Penengo L. y Polo S. 2007. "The Ubiquitination Code: A Signalling Problem". *Cell Division* 2(11).

Yao Y., Huang L., Krutchinsky A., Wong M.L., Standing K., Burlingame A. y Wang C.C. 1999a. "Structural and Functional Characterizations of the Proteasome-Activating Protein PA26 from *Trypanosoma brucei*". *The Journal of Biological Chemistry* 274(48):33921-33930.

Yao Y., Toth C., Huang L., Wong M.L., Dias P., Burlingame A., Coffino P. y Wang C.C. 1999b. " α 5 Subunit in *Trypanosoma brucei* Proteasome Can Self-Assemble to form a Cylinder of Four Stacked Heptamer Rings". *Biochemistry Journal* 344:349-358.

Yoder J.S., Straif-Bourgeois S., Roy S. L., Moore T. A., Visvesvara G. S., Ratard R. C., Hill V. R. y Wilson J. D., Linscott, A. J., Crager R., Kozak N.A., Sriram R., Narayanan J., Mull B., Kahler A.M., Schneeberg C., da Silva A.J., Poudel M., Baumgarten K.L., Xiao L. y Beach M.J. 2012. "Primary amebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water". *Clinical Infectious Diseases* 55(9):79-85.

Zwickl P., Voges D. y Baumeister W. 1999. "The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis". *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 354:1501-1511.