



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

UNIDAD ZACATENCO

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

TITULO DE LA TESIS:

**“EFECTO DE LOS NEUROQUÍMICOS DEL BULBO
OLFATORIO SOBRE LOS TROFOZOÍTOS DE
Naegleria fowleri”**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B.T. Paula Gabriela Guzmán Téllez

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

AGOSTO DE 2015

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 IPN.

Este proyecto estuvo bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas y de la asesoría de la Dra. Abigail Betanzos Fernández, del Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi, del Dr. José de Jesús Serrano Luna y del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de CVU 556818) y con el apoyo del fondo SEP-CONACYT 237523



AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Dra. Mineko Shibayama y al Dr. Jesús Serrano Luna por brindarme un espacio en su laboratorio y sus proyectos, por compartir sus conocimientos, experiencias pero sobre todo por su amistad.

Gracias a mis asesores por su disponibilidad y apoyo en el desarrollo de este proyecto, a la Dra. Abigail Betanzos, al Dr. Víctor Tsutsumi y al Dr. Fidel Hernández.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: Nadia Flores, Moisés Castillo, Roberto Cárdenas, Daniel Coronado y Gabriel Maldonado porque siempre estuvieron apoyándome y dando consejos en el desarrollo de este proyecto, por hacer la estancia en el laboratorio más agradable pero sobre todo por convertirse en muy buenos amigos.

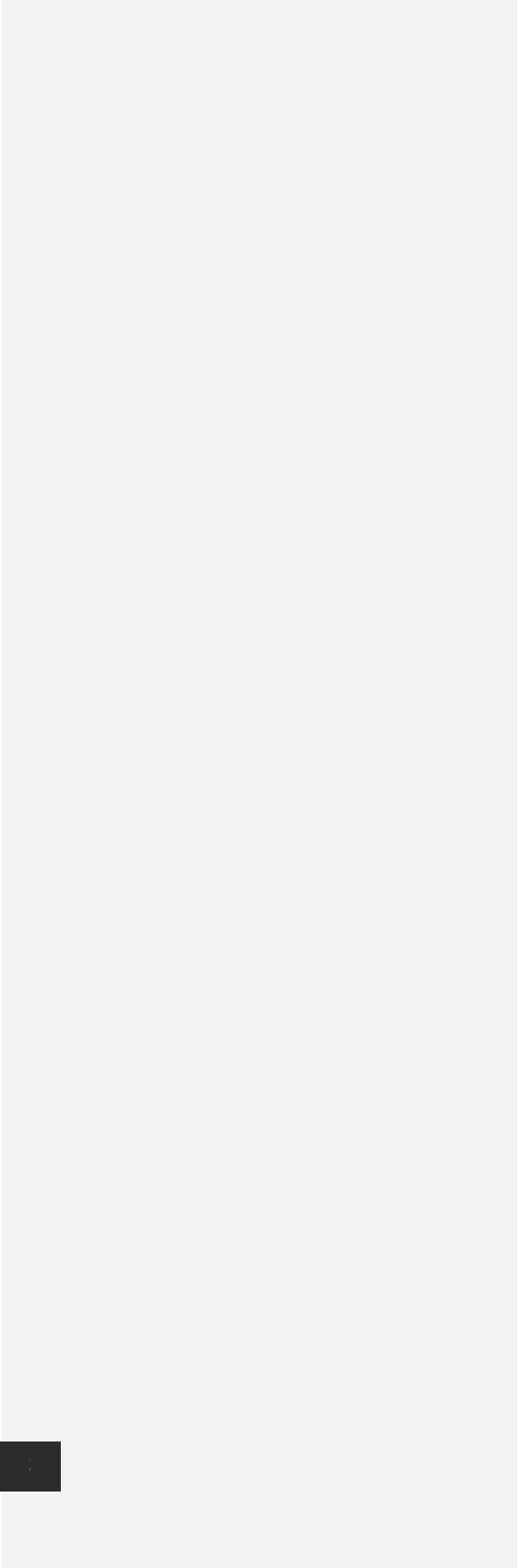
Quiero hacer mención especial a la M. en C. Angélica Silva Olivares por todo su apoyo técnico en el desarrollo del presente proyecto, pero de manera invaluable por su amistad y su paciencia.

Igualmente, a la Q.F.B. Silvia Galindo Gómez, a la Sra. Martha Dueñas y a la Sra. Martha Aguilar. Así como al Sr. Dagoberto Carrasco y al Sr. Víctor Hernández por su invaluable apoyo técnico.

Gracias a mis amigos Nadia Flores Huerta, Verónica Aranda Chan y Héctor Vargas por ser grandes y muy divertidos amigos, siempre estar ahí cuando los necesitaba y por recordarme que todo siempre tiene un lado positivo.

Gracias infinitas a mi familia: papá y mamá porque siempre han estado a mi lado. A mis grandes amores, mis hermanas Georgina y Andrea Guzmán por la paciencia y la

comprensión que siempre han tenido. A todos ustedes gracias por el gran amor y apoyo que me han mostrado toda la vida y particularmente en este último año.



DEDICATORIAS

Quisiera dedicar este proyecto a mi familia, por estar conmigo siempre apoyando en cada momento que los he necesitado, por enseñarme que si me esfuerzo puedo lograr lo que quiero, por el infinito amor que me han demostrado, por entender que a veces no podía estar con ustedes aunque me muriera de ganas por quedarme en casa, por escuchar cientos de veces la misma exposición y siempre tener algo bueno que decir y sobre todo porque sin ustedes nada de esto tendría sentido.

Creo que lo mejor que puedo tener en la vida es su compañía, apoyo, amor y comprensión. Este logro es de todos. Los amo demasiado.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
GENERALIDADES.....	12
AMIBAS DE VIDA LIBRE	12
GÉNERO <i>Naegleria</i>	12
<i>Naegleria fowleri</i>	12
MORFOLOGÍA.....	13
MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	14
MENINGOENCEFALITIS AMIBIANA PRIMARIA (MAP).....	16
EPIDEMIOLOGÍA DE LA MAP.....	17
RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA MAP	18
CUADRO CLÍNICO	18
DIAGNÓSTICO	19
TRATAMIENTO	19
SISTEMA OLFATORIO.....	19
ORGANIZACIÓN ANATÓMICA DEL SISTEMA OLFATORIO Y NEUROEPITELIO OLFATORIO	20
BULBOS OLFATORIOS. FUNCIONES, ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y FISIOLÓGICA	20
NEUROQUÍMICA DE LOS BULBOS OLFATORIOS	22

ANTECEDENTES DIRECTOS.....	26
PAPEL DE LOS NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN EL BULBO OLFATORIO EN PROLIFERACION Y MIGRACIÓN CELULAR.....	26
PARASITOSIS PRESENTES EN LOS BULBOS OLFATORIOS Y CAMBIOS NEUROQUÍMICOS	27
MIGRACIÓN DE <i>N. fowleri</i>	30
EFFECTO DE NEUROQUIMICOS Y PRESENCIA DE RECEPTORES A NEUROTRANSMISORES EN PROTOZOARIOS.....	35
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	40
GENERAL	40
PARTICULARES.....	40
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	41
CULTIVO DE AMIBAS	41
ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO BULBOS OLFATORIOS EN FRESCO Y FIJADOS	41
ENSAYOS DE VIABILIDAD	42
CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO NEUROQUÍMICOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO PURIFICADOS	42
ENSAYOS DE CURVA DOSIS-RESPUESTA UTILIZANDO LOS FACTORES DE CRECIMIENTO (IGF-I Y TGF- α) CON TROFOZOITOS DE <i>N. fowleri</i>	43
ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> EN PRESENCIA DE NEUROQUÍMICOS PURIFICADOS DEL BULBO OLFATORIO	43
RESULTADOS.....	45



ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO BULBOS OLFATORIOS FRESCOS Y FIJADOS.....	45
ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO TAURINA (0.9 Mm).....	49
ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE TAURINA (0.9 mM).....	50
ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO GLUTAMATO (13 μ M).....	53
ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE GLUTAMATO (13 μ M).....	54
ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOITOS DE <i>N. fowleri</i> EN PRESENCIA DE GABA (6 μ M).....	57
ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE GABA (6 μ M).....	58
CURVA DOSIS-RESPUESTA CORRESPONDIENTE A LA INTERACCIÓN DE TROFOZOITOS DE <i>N. fowleri</i> CON EL FACTOR DE CRECIMIENTO IGF-I	61
ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOITOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE IGF-I (1000 ng/ml)	64
CURVA DOSIS-RESPUESTA CORRESPONDIENTE A LA INTERACCIÓN DE TROFOZOITOS DE <i>N. fowleri</i> CON EL FACTOR DE CRECIMIENTO TGF- α (1000 ng/ml)	66
ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOITOS DE <i>N. fowleri</i> UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE TGF- α (1000 ng/ml).....	67
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES.....	78
PERSPECTIVAS.....	79

66



BIBLIOGRAFÍA 80

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. *Naegleria fowleri*: (a) trofozoíto, (b) flagelado y (c) quiste 13

Fig 2. Ciclo biológico de *N. fowleri*. Patogénesis de la MAP. 17

Fig 3. Organización estructural del bulbo olfatorio 21

Fig 4. Trofozoíto de *N. fowleri* en mitosis dentro del neuroepitelio olfatorio 32

Fig 5. Respuesta migratoria de trofozoítos de *N. fowleri* en contacto con extractos de células de mamíferos 33

Fig 6. Montaje de cámara de Boyden para ensayos de migración utilizando insertos Millicel de 8 µm de poro 44

Fig 7. Curva de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* en interacción con bulbos olfatorios frescos y fijados. 46

Fig 8. Ensayos de viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* en curvas de crecimiento en interacción con bulbos olfatorios. 48

Fig 9. Curva de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* incubados con Taurina (0.9 mM) 49

Fig 10. Ensayos de viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados con Taurina (0.9 mM) 50

Fig 11. Gráfica de migración de trofozoítos de *N. fowleri* utilizando como estímulo de migración Taurina (0.9 mM). 51

Fig 12. Membranas de PET correspondiente a los ensayos de migración con Taurina (0.9 mM) 52

Fig 13. Curva de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* en incubados con Glutamato (13 µM) 53

Fig 14. Ensayos de viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* interaccionados con Glutamato (13 µM) 54

Fig 15. Ensayo de migración de trofozoítos de *N. fowleri* utilizando como estímulo de migración Glutamato (13 µM) 55

Fig 16. Membrana de PET correspondiente a los ensayos de migración con Glutamato (13 µM) 56



Fig 17. Curva de crecimiento de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> en interacción con GABA (6 μ M).....	57
Fig 18. Ensayos de viabilidad correspondientes a la interacción de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> con una solución de GABA (6 μ M).....	58
Fig 19. Gráfico de ensayos de migración de <i>N. fowleri</i> utilizando como quimioatrayente GABA (6 μ M).....	59
Fig 20. Membrana de PET correspondiente a los ensayos de migración con.....	60
Fig 21. Curva Dosis-Respuesta de interacción entre trofozoítos de <i>N. fowleri</i> con el factor de crecimiento IGF-I.....	62
Fig 22. Ensayos de viabilidad correspondientes a la curva dosis-respuesta de interacción con IGF-I (1- 1000 ng/ml).....	63
Fig 23. Ensayos de migración de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> utilizando como quimioatrayente IGF-I (1000 ng/ml).....	64
Fig 24. Membrana de PET correspondiente a los ensayos de migración con IGF-I (1000 ng/ml).....	65
Fig 25. Curva de crecimiento dosis-respuesta de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> utilizando el factor de crecimiento TGF- α	66
Fig 26. Ensayos de viabilidad utilizando dosis crecientes de TGF- α en dosis crecientes con trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	67
Fig 27. Ensayo de migración de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> utilizando TGF- α (1000 ng/ml) como quimioatrayente.....	68
Fig 28. Membranas de filtro Millicel de 8 μ m de poro utilizadas en ensayos de migración con TGF- α (1000 ng/ml).....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de viabilidad de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> en curvas de crecimiento con bulbo olfatorio.....	46
--	----

RESUMEN

Naegleria fowleri es un protozooario del grupo de las amibas de vida libre, ampliamente distribuido en cuerpos de agua dulce y considerado el agente etiológico de un cuadro clínico fulminante, denominado meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) el cual se presenta de principalmente en niños y jóvenes con historia reciente de natación. La ruta de infección utilizada por este microorganismo es de tipo olfatoria, migrando a través de los nervios olfatorios hasta establecerse en los bulbos olfatorios; en el modelo murino se ha observado un aumento en el número de trofozoítos en este tejido aproximadamente a las 96 horas post-infección.

Actualmente, se desconoce si algunos de los neuroquímicos presentes en los bulbos olfatorios pueden estar relacionados con el establecimiento de la enfermedad en el sistema nervioso central (SNC), así como en la proliferación de la amiba en este tejido. Por lo que en el presente proyecto se estudió el efecto de GABA, Glutamato, Taurina, IGF-I y TGF- α , que se presentan de manera abundante en este tejido, en interacción directa con los trofozoítos de *N. fowleri*. En un sistema de filtros Transwell se observó la cinética de migración de los trofozoítos (1, 3 y 6 h) en presencia de Glutamato, Taurina, GABA (a concentraciones reportadas como fisiológicas) e IGF-I (1000 ng/mL), y se observó que estos compuestos indujeron la migración. También se observó que los neuroquímicos antes mencionados, y el TGF- α (1000 ng/mL), estimularon la proliferación de los trofozoítos, en comparación con la condición control.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere la probable participación de GABA, Glutamato, Taurina e IGF-I en la migración, y los anteriores mencionados más el TGF- α en la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri* en el bulbo olfatorio durante la infección que produce la MAP.

ABSTRACT

Naegleria fowleri is a protozoan from the group of Free-Living Amoebae, widely distributed in fresh water bodies and considered the etiological agent of a fulminant clinical disease called primary amoebic meningoencephalitis (PAM), which occurs significantly in children and young people with a recent swimming history. The infection appears by the nasal route, migrating through the olfactory nerves to reach the olfactory bulbs; where at 96 h post-infection there was a significant increase in the number of trophozoites in the murine model.

Presently, it is unknown if the neurochemicals present in the olfactory bulbs are involved in the proliferation and establishment of the trophozoites in the brain. Thus, the main objective of the present work was identified the effect of GABA, Glutamate, Taurine, IGF-I and TGF- α , reported as abundantly in this tissue. The interaction of *N. fowleri* with these neurochemicals could be important in the development of this disease. The results show that the interaction of the amoebae with the neurotransmitters in a system of Transwell filters using Millicel inserts of 8 μ m of a period time of 1, 3 and 6 h with Glutamate, Taurine, GABA (concentrations reported as physiological) and IGF-I, can induce migration of trophozoites, considered statistically significant at the different periods of time according to the neurochemical studied. In addition, growth curves of trophozoites from 1, 3, 6 and 9 h of co-incubation with the above mentioned neurochemicals, showed a significant increased number of amoebae compared with the control condition. With all these results, we suggest that the probably involvement of neurochemicals, such as GABA, Glutamate, Taurine and IGF-I in a migration process, as well as TGF- α and the above mentioned neurotransmitters in the proliferation of *N. fowleri* trophozoites, in the olfactory bulbs during infection by PAM.

**INTRODUCCIÓN
GENERALIDADES
AMIBAS DE VIDA LIBRE**

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoarios anfizóicos, distribuidos ampliamente en la naturaleza; capaces de producir diferentes enfermedades en el sistema nervioso central (Visvesvara et al., 2007). Los géneros de importancia médica para el humano y otros animales son: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappina* (Trabelsi et al., 2012).

La cuatro grupos de AVL patógenas para el humano están clasificadas taxonómicamente dentro de dos súper grupos: *Amoebozoa* y *Excavata* (Opperdoes et al., 2011. Trabelsi et al., 2012).

GÉNERO *Naegleria*

Las amibas del género *Naegleria* se caracterizan por experimentar una transformación de amiba a flagelado y se incluyen seis especies principales: *N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. lovaniensis*, *N. gruberi*, *N. jadini* y *N. thornstoni* (Marciano-Cabral, 1988). De todas las especies identificadas, solo *N. fowleri*, es considerada patógena para el humano (Visvesvara et al., 2007). Más de 30 especies del género *Naegleria* han sido descritas en base a la secuencia de los genes para SSrRNA (Pequeña Subunidad Ribosomal del ARN), así como, las secuencias correspondientes a los ITS1 e ITS2 (Espaciador Transcripcional Interno 1 y 2) (De Jonckheere, 2011).

Se ha establecido que el metabolismo del género *Naegleria* es muy versátil, debido a que a pesar de ser organismos aeróbicos pueden presentar características anaeróbicas (Heggie, 2010). Su genoma comprende un plásmido extracromosomal de 14 kb, un genoma mitocondrial de 50 kb; así como al menos 12 cromosomas nucleares lineales con tamaños de 0.7 a 6.5 MB (Fritz-Laylin et al., 2011).

Naegleria fowleri

Naegleria fowleri es una amiba de vida libre distribuida particularmente en cuerpos de agua dulce, tanto naturales como artificiales (Visvesvara et al., 2007). Se han podido establecer ocho tipos de *N. fowleri* diferentes, nombrados del tipo 1 al 8, dependiendo de su secuencia 5.8S rDNA. De los ocho tipos de *N. fowleri* identificados hasta el momento, no se ha encontrado diferencia alguna en la virulencia entre ellos, pero se ha

descrito su presencia específica en ciertas zonas geográficas del mundo (De Jonckheere, 2011).

MORFOLOGÍA

Naegleria fowleri es un protozooario que cuenta con 3 estadios en su ciclo de vida: trofozoito, flagelado y quiste (Fig. 1) (Visvesvara et al., 2007).

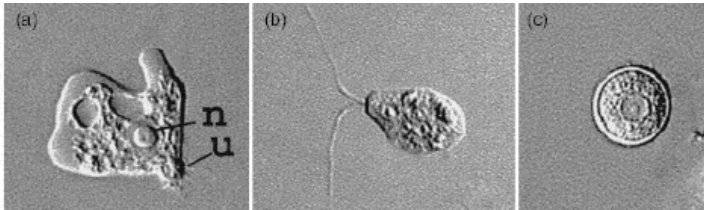


Fig 1. *Naegleria fowleri*: En (a) se observa un trofozoito con su morfología característica, un nucléolo prominente (n) y su uroíde (u). En (b) se muestra un biflagelado piriforme y en (c) un quiste (Visvesvara et al., 2007. FEMS Immunol Med Microbiol 50(1): 1-26. 1000x)

Los trofozoítos son organismos ameboides que miden de 15 a 25 μm (Visvesvara et al., 2007). Tienen movimientos por medio de lobopodios, presenta un gran núcleo central, un nucléolo esférico, prominente y refringente. Cuenta con retículo endoplásmico liso, gran número de ribosomas, un complejo de membranas a manera de Golgi primitivo y las mitocondrias que son los organelos característicos se pueden encontrar en forma de campana, esféricas u ovals (Marciano-Cabral, 1988. Martínez et al., 1971). Los trofozoítos se dividen por fisión binaria por un mecanismo llamado criptomitosis (tipo de división celular en el que no se pierde la envoltura nuclear) (González-Robles et al., 2009).

El trofozoito se transforma a la forma de flagelado cuando la concentración iónica del medio cambia, se agotan los nutrientes, cambia la temperatura o pH (Marciano-Cabral, 1988). Esta forma es usualmente piriforme, mide de 12 a 18 μm de diámetro, y comúnmente es biflagelada aunque puede presentar más flagelos (Oddó, 2006).

La fase de trofozoito se puede transformar a quiste cuando las condiciones de crecimiento son adversas (Marciano-Cabral, 1988). Estos, son formaciones esféricas que miden de 8 a 12 μm de diámetro, probablemente formados por polisacáridos con enlace β -1-4, como la celulosa; tienen un contorno liso y una densa pared con uno o

dos poros aplanados (Oddó, 2006. Fouque et al., 2012. Chávez-Munguía et al., 2009). El quiste presenta un núcleo con un nucléolo menos pronunciado y una variedad de vacuolas citoplasmáticas, de tipo alimenticias y contráctiles (Marciano-Cabral, 1988).

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

En relación a los mecanismos de patogenicidad propios de *N. fowleri*, la adhesión es claramente el primer paso en la patogénesis de la MAP. Se conoce que la cepa patógena (*N. fowleri*) presenta un mayor nivel de adherencia a componentes de la matriz extracelular que las cepas no patógenas (*N. lovaniensis*). Además, se identificó la formación de estructuras morfológicas características de este proceso, tipo adhesiones focales a través de moléculas tipo integrinas capaces de unirse a la matriz extracelular permitiendo la invasión y el establecimiento de la infección (Jamerson et al., 2012).

Se ha reportado que la actina de los trofozoítos de *N. fowleri* (Nf actina) se encuentra involucrada en diversas funciones celulares (adhesión y motilidad) y formando parte de estructuras como son los pseudópodos y las copas fagocíticas. En trofozoítos tratados con citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de la actina o en estudios de transfección con oligonucleótidos antisentido para este gen, se presenta una alteración en la capacidad de formar copas fagocíticas normales y una disminución en la citotoxicidad *in vitro*, lo que sugiere una reducción en la habilidad de adherencia de los trofozoítos de *N. fowleri* (Sohn et al., 2010).

Dentro del proceso de adhesión, se ha establecido la importancia de la diferencia en la expresión y cantidad de glicoconjugados en la membrana plasmática de este microorganismo, ya que se ha comprobado que los trofozoítos de *N. fowleri* presentan elevados niveles de glicoconjugados de α -D-manosa, α -D-glucosa y residuos terminales de α -L-fucosa, a diferencia de las cepas no patógenas en las que se encuentran en menor cantidad, además de la presencia de glico-conjugados ricos en galactosa (Cervantes-Sandoval et al., 2010).

Otro mecanismo de patogenicidad para *N. fowleri* incluye la fagocitosis, esta es una función básica de las amibas relacionada con la destrucción de las células blanco, ya sea en cultivos celulares o en tejido humano. Se encuentra acoplado a la formación del amebostoma, que la amiba utiliza para deglutir partículas de diferentes tamaños, así

como para lograr un mecanismo adecuado de contacto celular - patógeno (Oh et al., 2005).

Por otra parte, un factor de patogenicidad ampliamente estudiado en *N. fowleri* es la presencia de proteasas. A través de un estudio de caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de extractos totales y de medio condicionado de *N. fowleri*, se encontró mínima actividad del tipo serín proteasa pero elevada actividad de cisteín-proteasas, con rangos de actividad óptimo a condiciones fisiológicas en mamíferos (pH 7.0 y temperatura de 35 °C) lo que indica que estas enzimas pueden estar participando en el daño a los tejidos en el hospedero durante la infección. (Serrano-Luna et al., 2007).

Además, se ha establecido que la cepa patógena de *N. fowleri* tiene la capacidad de degradar proteínas de las uniones estrechas (ZO-1 y Claudina-1) cuando se ponen en contacto con monocapas celulares (MDCK) a través de la acción de cisteín proteasas, lo que probablemente le brinda capacidad de invasión durante los primeros momentos de la infección, utilizando la ruta paracelular de las células del neuroepitelio olfatorio y finalmente, a través de las uniones propias de la barrera hemato-encefálica (Shibayama et al., 2013).

Otro mecanismo por el que podrían estar actuando las proteasas de *N. fowleri* corresponde a la actividad mucinolítica, por la cual estas enzimas degradarían las mucinas presentes en el moco superficial del epitelio nasal, permitiéndole penetrar el epitelio olfatorio y evitar la respuestas innatas del sistema inmune del hospedero (Cervantes-Sandoval et al., 2008).

Diversas investigaciones señalan que *N. fowleri* libera sustancias citolíticas, por ejemplo, enzimas del tipo de las fosfolipasas y fosfatasas ácidas, las cuales contribuyen con la invasión y el daño tisular *in vivo*, y con la citopatogenicidad *in vitro*, sugiriendo que las citotoxinas y las proteasas citolíticas son fundamentales en la destrucción de las células blanco (Oh et al., 2005).

Otras proteínas consideradas dentro de los mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* son la proteína NACM (*Naegleria amoebae cytopathogene material*, proteína de 35 kDa) relacionada con el daño al tejido hospedero y considerada como un inductor de apoptosis del mismo (Dunnebacke et al., 1999). La proteína de choque térmico (HSP70) implicada en el plegamiento y re-naturalización de proteínas, le brinda a la

amiba resistencia a elevadas temperaturas, considerada una característica que la distingue de las variantes no patógenas, además de que existen reportes de su participación en la proliferación de trofozoítos de *N. fowleri* (Song et al., 2008).

Por otra parte, se ha señalado la presencia de gránulos electron-densos (EDG) en el citoplasma y dentro de vacuolas de trofozoítos de *N. fowleri*; probablemente relacionados con un efecto citopático en las células blanco. Se ha corroborado la actividad proteolítica de los mismos; actuando tanto a nivel tisular como en el daño a las proteínas de matriz extracelular (Chávez-Munguía et al., 2014).

Uno de los mecanismos de patogenicidad más estudiados en *N. fowleri*, es la capacidad de formar poros en las membranas de las células que constituyen el tejido infectado. Esta actividad está dada por la presencia de una proteína llamada N-PFP (pore forming protein o proteína formadora de poro) la cual se encuentra unida a la membrana de la amiba y tiene la capacidad de formar canales funcionales de aproximadamente 3.6 a 5.2 nm (Young et al., 1989). Además, se han podido identificar dos glicoproteínas formadoras de poro, naegleriaporo A y B (Zysset-Burri et al., 2014).

Finalmente, se ha considerado la capacidad con la que cuenta *N. fowleri* para evadir la inmunidad humoral y celular del huésped, debido a la remoción de anticuerpos en la membrana celular mediante capping y endocitosis (Toney et al., 1992. Chu et al., 2000).

MENINGOENCEFALITIS AMIBIANA PRIMARIA (MAP)

La meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) es una meningoencefalitis aguda, fulminante, necrotizante y hemorrágica, que puede llevar a la muerte del individuo en un tiempo de aproximadamente siete días, con un rango de fatalidad humana de casi el 100% de los casos; los cuales se presentan principalmente en los meses de verano.

Esta se presenta en individuos saludables, generalmente niños o adultos jóvenes, inmunológicamente intactos, que se exponen al protozoario durante actividades recreativas en cuerpos de agua contaminados (Heggie, 2010).

El trofozoito infecta al humano por vía nasal, siguiendo una ruta de infección de tipo olfatoria, migrando a través de los nervios olfatorios para finalmente alcanzar los bulbos olfatorios dentro del SNC, en donde se induce una respuesta inflamatoria intensa asociada con cambios macroscópicos que incluyen necrosis lítica, hemorragia y

exudados purulentos (Cervantes-Sandoval et al., 2008), así como ablandamiento y edema de los hemisferios cerebrales y congestión de leptomeninges (Fig. 2) (Heggie, 2010).

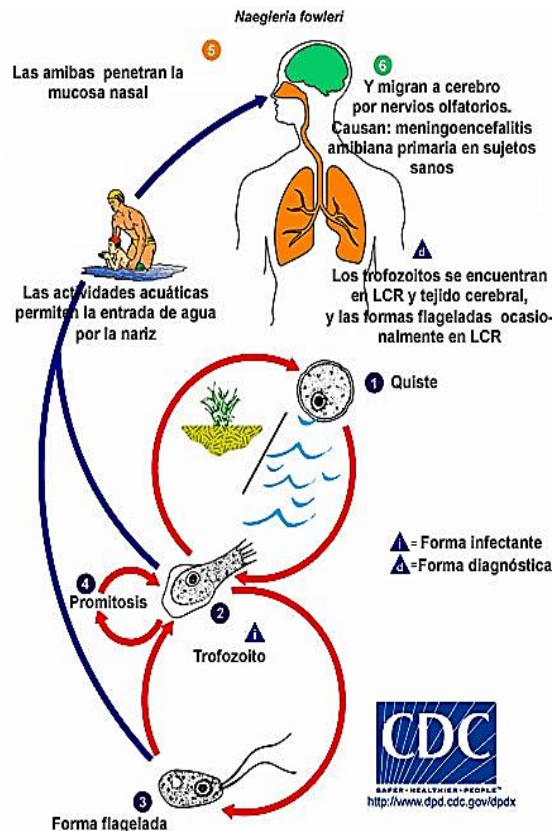


Fig 2. Ciclo biológico de *N. fowleri*. Patogénesis de la MAP. *N. fowleri* tiene tres estadios en su ciclo de vida: (1) Quiste, (2) Trofozoito y (3) Flagelado; siendo el trofozoito la única fase infectiva (i) y de diagnóstico (d) reportada. (CDC.2014)

EPIDEMIOLOGÍA DE LA MAP

La mayoría de los casos de MAP que se han reportado provienen de zonas subtropicales o templadas. A nivel mundial, hasta 2011, se habían reportado tan solo 235 casos de MAP (De Jonckheere, 2011). Para el periodo de 2004 a 2013, en Estados

Unidos se han reportado 34 infecciones, siendo este el país con el mayor número de reportes de la enfermedad a nivel mundial (CDC, 2013).

En México, el primer caso de MAP se detectó en 1978 en Mexicali, Baja California y para 2007, solo se habían reportado 30 casos, principalmente provenientes del noroeste del país (80% de Baja California) (Cervantes-Sandoval et al., 2007). En el año 2013 solo se reportó un caso en el estado de Guanajuato y para 2014 y lo que va en 2015 no se ha reportado ni un caso (Dirección General de Epidemiología, 2014).

RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA MAP

El primer mecanismo de defensa innata que se presenta es la secreción de moco (Cervantes-Sandoval et al., 2010). Seguido de esto, se da la activación de la ruta alterna del complemento y finalmente la aparición de células inflamatorias, principalmente neutrófilos y en mucho menor cantidad macrófagos y eosinófilos (Cervantes-Sandoval et al., 2009). Respecto a la inmunidad humoral, esta no es realmente efectiva ante la infección por *N. fowleri*, sin embargo, tanto anticuerpos de la clase IgA como IgM no específicas, presentes en mucosas, pueden bloquear la adhesión de los trofozoítos en el epitelio de la mucosa olfatoria (Marciano-Cabral et al., 2007).

CUADRO CLÍNICO

En el establecimiento de la MAP el tiempo de aparición de los síntomas desde el contacto inicial a la aparición de la enfermedad es de aproximadamente 5-8 días (Heggie, 2010). Los síntomas en su estado inicial son: fiebre de 39°C a 41°C, sangrados nasales, confusión, positivo a los signos de Kernig y Brudzinski (signos clásicos de irritación en las meninges que se manifiestan como rigidez en la nuca) y una aparición repentina de dolor de cabeza frontal intenso (da Rocha-Azevedo et al., 2009. Heggie, 2010). En un estado avanzado de la enfermedad implican: fotofobia, diplopía, pérdida del sentido del olfato y del gusto, convulsiones, acumulación de líquido en el cerebro, y parálisis de nervios craneales (da Rocha-Azevedo et al., 2009. Heggie, 2010).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la MAP se basa en el análisis microscópico del sedimento de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Como prueba confirmatoria, la prueba de enflagelación que consiste en poner el sedimento de LCR en agua estéril o solución salina fisiológica por 1 a 2 h y posteriormente observar al microscopio para la búsqueda de formas flageladas (Grate, 2006). Otras pruebas para el diagnóstico de la MAP son la inmunofluorescencia indirecta, cultivos de amibas o por ensayos de ELISA. Además a través de técnicas moleculares como PCR punto final o tiempo real (da Rocha-Azevedo et al., 2009).

TRATAMIENTO

A la fecha se sabe que el único fármaco que ha demostrado eficacia en el tratamiento de la MAP es la amfotericina B, sola o en combinación con otros agentes como la azitromicina, rifampicina, fluconazol, miconazol, ketoconazol, cloranfenicol, entre otros (Kim et al., 2008).

Recientemente se identificó al Corifungin, un fármaco perteneciente al mismo grupo de antifúngicos, como una droga candidato para el tratamiento de la MAP (Debnath et al., 2012).

SISTEMA OLFATORIO

El sentido del olfato es una de las principales capacidades quimiosensoras con las que cuentan organismos superiores. Este permite reconocer y discriminar señales químicas en el ambiente. En los mamíferos se encuentra regulando funciones complejas, tales como el comportamiento sexual (reproductivo o maternal), regulación neuroendocrina, reconocimiento de especie, estados emocionales e información social (Carleton et al., 2002).

El sistema olfatorio está formado por el neuroepitelio olfatorio, los nervios olfatorios, los bulbos olfatorios y los tractos olfatorios, junto con la corteza cerebral de asociación y las estructuras subcorticales funcionalmente relacionadas con ellos. En conjunto, las partes del cerebro que procesan las señales olfatorias reciben el nombre de rinencéfalo (Kiernan, 2009).

ORGANIZACIÓN ANATÓMICA DEL SISTEMA OLFATORIO Y NEUROEPITELIO OLFATORIO

El neuroepitelio olfatorio es considerado como un epitelio columnar pseudoestratificado, en este se dan los eventos iniciales de la percepción olfatoria y se encuentra compuesto por tres tipos celulares:

Las **células sustentaculares**, que forman el grueso del epitelio y poseen función fagocítica y de soporte.

Las **células sensoriales o neurosensoriales** son neuronas bipolares especializadas, que funcionan tanto como receptores sensitivos como de conductores de impulso. Se encuentran entre las células sustentaculares y su dendrita se extiende hacia la superficie del epitelio, donde finaliza en la vesícula olfatoria. Cada célula sensorial posee un axón fino terminal que hace sinapsis en el bulbo olfatorio, estos son del tipo amielínico, y se agrupan en haces conocidos como fila olfatoria, rodeados de células de Schwann, dando origen a los nervios olfatorios que penetran la cavidad craneana a través de los agujeros de la placa cribiforme del hueso etmoides y a continuación entran en el bulbo olfatorio.

Por otra parte, las **células basales** se encuentran interdigitando entre las células sensoriales y las sustentaculares, localizadas sobre la membrana basal. Su función es poco conocida pero se cree se diferencian a células sensoriales.

Finalmente, las glándulas olfatorias o de Bowman, que son estructuras especializadas secretoras, se encuentran distribuidas por debajo de todo el epitelio y sobre la lámina propia; estas se encargan de bañar la superficie del mismo, recubriendo la cavidad nasal con una capa de líquido mucoso en las que se disuelven las sustancias odoríferas (Martínez et al., 1973. Kiernan, 2009. Purves et al., 2001).

BULBOS OLFATORIOS. FUNCIONES, ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y FISIOLÓGICA

Los bulbos olfatorios son un par de estructuras anatómicas, de forma ovoide, localizados en la fosa craneal anterior; en posición ventral respecto de la superficie orbitaria del lóbulo frontal, por encima de la placa cribiforme del hueso etmoides (Kiernan, 2009. Huart et al., 2013). Los bulbos están especializados, principalmente, en el procesamiento de las señales moleculares que generan sensaciones de olores

(Shepherd, 2014), así como en el control del comportamiento a través del sistema límbico (Halasz et al., 1983. Corona et al., 2011).

El neuropilo del bulbo olfatorio se encuentra organizado en capas o laminas organizadas de forma esférica (Fig. 3), las cuales se describen a continuación:

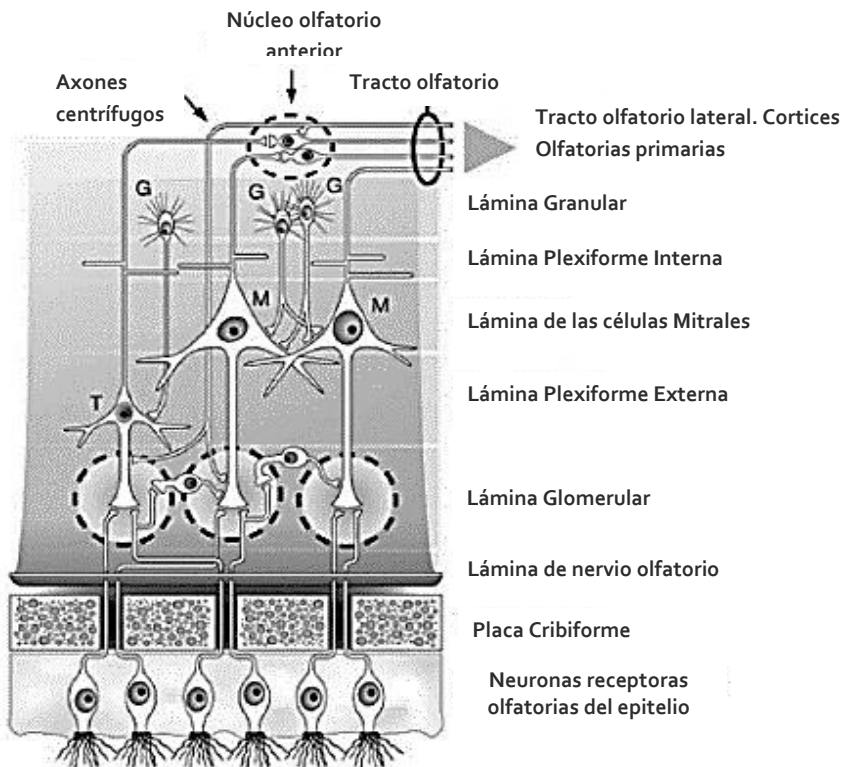


Fig 3. Organización estructural del bulbo olfatorio.
(Doty, 2012. Neurobiol Dis 46(3): 527-552.)

LAMINA DE NERVIOL OLFATORIO: Es la capa más superficial, está compuesta por un conjunto de axones no mielinizados provenientes de los receptores olfatorios. Una característica única es la capacidad de regeneración axonal que se conserva incluso en la etapa adulta (Huart et al., 2013. Shephard, 2014).

LAMINA GLOMERULAR: Los axones olfatorios pertenecientes a la lámina anterior, conforman regiones de neuropilo organizadas en estructuras redondeadas llamadas

glomérulos. Esta capa se encuentra dividida en el neuropilo intraglomerular y el neuropilo extraglomerular (Huart et al., 2013. Shephard, 2014).

LAMINA PLEXIFORME EXTERNA: Se encuentra en la parte final de la capa glomerular. En esta se puede identificar los cuerpos de las células en penacho, así como de las células mitrales organizadas en una hilera delgada en los límites internos de esta capa. (Huart et al., 2013. Shephard, 2014)

LAMINA DE CÉLULAS MITRALES: está compuesta por los cuerpos de las mismas células mitrales, consideradas neuronas olfatorias de segundo orden (Huart et al., 2013. Shephard, 2014).

LAMINA PLEXIFORME INTERNA: contiene axones colaterales de células en penacho, así como axones de fibras centrifugas (que recibe el bulbo olfatorio desde estructuras superiores en el cerebro) del parénquima cerebral y algunos somas de células granulares (Huart et al., 2013. Shephard, 2014).

LAMINA GRANULAR: es una capa muy amplia, presente al fondo del bulbo olfatorio. Esta contiene los cuerpos de las células granulares (GABAérgicas) (Huart et al., 2013. Shephard, 2014)

CÉLULAS GLIALES: conocidas como envoltentes, se encuentran localizadas alrededor de los conjuntos de axones de las células sensoriales olfatorias; se consideran una especie de glía especializada. Entre otras, cumplen la función de dar soporte al crecimiento de los axones de neuronas sensoriales recién diferenciadas (Shepherd, 2014).

NEUROQUÍMICA DE LOS BULBOS OLFATORIOS

El bulbo olfatorio es una estructura muy rica en sustancias neuroactivas, que se encuentran clasificadas de la siguiente manera (Halasz et al., 1983):

Los neuroquímicos dentro del grupo de los aminoácidos son:

GLUTAMATO: corresponde al aminoácido más abundante en el SNC; es un neurotransmisor excitatorio, que en el bulbo olfatorio se encuentra a una concentración de 13 $\mu\text{mol/g}$. La distribución laminar del glutamato es relativamente uniforme en todas las capas del bulbo; siendo ligeramente más altos en la glomerular-plexiforme externa (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014).

TAURINA (Ácido 2-amino-etano-sulfónico): considerado como un neurotransmisor o neuromodulador inhibitorio. Su concentración en el bulbo olfatorio es la más elevada

dentro del SNC, se calcula que en la rata es aproximadamente de 7.33 $\mu\text{mol/g}$. De manera particular, se encuentra enriquecido en los axones de las neuronas primarias olfatorias (Halasz et al., 1983).

ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA): Es un neurotransmisor inhibitor del SNC en mamíferos. En el bulbo olfatorio, algunas células periglomerulares y sus dendritas contienen la enzima descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), encargada de la síntesis de GABA. Además, numerosos estudios lo señalan como el neurotransmisor liberado por las sinapsis dendrodendríticas entre las células mitrales y en penacho. Se ha reportado un contenido de aproximadamente 3 $\mu\text{g/g}$ de GABA dentro del tejido del área olfatoria de ratas Wistar de 6 a 7 semanas de edad y de entre 100-130 g de peso; mientras que en ratones de entre 15 a 60 días de edad, el contenido de este neurotransmisor se encuentra entre 3.85 a 6.05 $\mu\text{mol/g}$ respectivamente (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014).

Otros neuroquímicos y aminoácidos presentes en el bulbo olfatorio se mencionan a continuación: Acetilcolina (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014), Aspartato (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014), Glicina (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014), Ácido DL-homocistéico (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014) y β -alanina (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014).

Los neuroquímicos dentro del grupo de las aminas biogénicas presentes en el bulbo olfatorio son:

SEROTONINA (5-hidroxitriptamina): La triptofano-hidroxilasa, enzima encargada de la biosíntesis de la serotonina, se ha encontrado en el cuerpo celular y fibras centrifugas serotoninérgicas distribuidas principalmente dentro de la lámina glomerular del bulbo olfatorio (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014).

NORADRENALINA: dentro del bulbo olfatorio se encuentra en fibras centrifugas noradrenérgicas distribuidas principalmente dentro de la lámina de células granulares, plexiforme interna y en la lámina glomerular. La acción de la noradrenalina en las células mitrales es de tipo excitatoria y en las células granulares actúa reduciendo la liberación de GABA (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014).

Respecto a los péptidos, hormonas y proteínas específicas del bulbo olfatorio se han encontrado:

CARNOSINA (β -Alanil-L-Histidina): considerada como un neuromodulador con efecto regulatorio en la neurotransmisión generada por el glutamato.

HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH): En el bulbo olfatorio se puede encontrar en células gliales o en las neuronas del bulbo olfatorio (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014).

PROTEÍNA MARCADORA OLFATORIA (OMP): es una proteína ácida, con un peso molecular de 19 kDa, soluble, se presenta abundantemente en las neuronas sensoriales olfatorias maduras. Esta proteína es característica del área olfatoria, pues no se ha encontrado en otra parte del parénquima cerebral. Dentro del bulbo olfatorio se encuentra en las láminas de nervio olfatorio y granular (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014).

Otros neuroquímicos presentes en el bulbo olfatorio son: β -lipotropina, β -endorfina, Vasopresina, Oxitocina, Hormona Liberadora de Hormona Leuteinizante (LHRH), Neurotensina, Angiotensina II, Polipéptido Intestinal Vasoactivo, Somatostatina, Gastrina, Colecistoquinina, Parvalbúmina, Proteína de Unión a Calcio Dependiente de Vitamina D, Encefalinas, Insulina y Substancia P (Halasz et al., 1983. Shepherd, 2014). Respecto a los factores de crecimiento, se sabe que el neuroepitelio olfatorio se encuentra en continua neurogénesis por lo que se han involucrado a los factores de crecimiento y sus receptores como elementos cruciales en este tejido.

FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF): De manera particular, en los bulbos olfatorios puede ejercer un papel en el proceso de mantenimiento de la función bulbar después de la pérdida de estimulación sensorial, así como en la supervivencia de neuronas y fibras colinérgicas centrifugas (provenientes de estructuras superiores cerebrales) (Plendl et al., 1999. Miwa et al., 2002)

FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF): participa en la neurogénesis y supervivencia de interneuronas de los bulbos olfatorios, pues este se encarga de estimular la proliferación en zonas con alto recambio neuronal (Zigova et al., 1998).

FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO (IGF-I): Se ha encontrado que IGF-I es un factor endógeno encargado de regular la diferenciación de células troncales y otros precursores celulares dentro de los bulbos olfatorios, siendo este la única estructura

que expresa IGF-I a niveles elevados a lo largo de la vida, particularmente en la capa de células mitrales (Vicario-Abejon et al., 2003).

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) y FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE α (TGF- α): TGF- α y EGF se encuentran estructuralmente relacionados, por lo que se unen a la misma molécula receptor (EGFR). En el sistema olfatorio se ha podido caracterizar que la familia de EGF es muy potente en promover la proliferación de células olfatorias progenitoras, actuando como mitógenos para las células basales que se diferencian a neuronas olfatorias. Por otro lado, TGF- α ha mostrado ser, al menos dos órdenes de magnitud más potente que EGF estimulando la división de células en el neuroepitelio olfatorio (Plendl, et al., 1999).

Los lípidos son otros componentes presentes de manera importante en los bulbos olfatorios. De este modo se encontró, en bulbos olfatorios de ratas adultas, que dentro de la lámina granular había niveles elevados de fosfatidilcolina (PC), particularmente de especie PC32:0 y PC34:1. En otras laminas se observó que las especies PC32:0 y PC34:1 se encuentran en niveles moderados, mientras que la especie PC36:1 está en niveles mínimos en todas las láminas del bulbo (Mikawa et al., 2009).

Dentro de los neuroquímicos del sistema olfatorio, los glicoconjugados juegan un papel crucial, al encontrarse involucrados en procesos de regeneración, proliferación, formación de sinapsis, procesamiento de la información sensorial, entre otros. Estos se han podido clasificar en los siguientes grupos:

GLICONCONJUGADOS DE UNIÓN A LECTINAS: Dentro de la lámina de células mitrales se han identificado residuos de celobiosa, manosa, xilosa y fucoidan (Plendl et al., 1998).

GLICOPROTEÍNAS: que funcionan como moléculas de adhesión, entre las que se encuentran:

OCAM (antígeno R4B12): glicoproteína de superficie axonal, en los bulbos olfatorios se expresa principalmente en neuronas sensoriales y en la lámina glomerular (Plendl et al., 1998).

LIG-1: es una glicoproteína integral de membrana que se ha identificado en las células gliales dentro de la lámina de nervio olfatorio y se ha relacionado con la función del control de diferenciación de las células olfatorias neurogliales (Plendl et al., 1998).

Rxt1: es una proteína glicosilada, de peso molecular de 97 a 116 kDa, que se expresa selectivamente en el sistema nervioso central. Pertenece al grupo de los transportadores huérfanos y se puede encontrar en poblaciones neuronales GABAérgicas o glutaminérgicas (Plendl et al., 1998).

ANTECEDENTES DIRECTOS

PAPEL DE LOS NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN EL BULBO OLFATORIO EN PROLIFERACION Y MIGRACIÓN CELULAR

Diversas moléculas presentes en el sistema nervioso central (SNC) se han visto involucradas en procesos de regeneración, migración y proliferación neuronal. Los neurotransmisores que se estudiaron en el presente trabajo (Taurina, GABA y Glutamato) fueron seleccionados de acuerdo a que se ha reportado que participan en el desarrollo y proliferación de células neuronales a nivel del bulbo olfatorio; además de que son los más abundantes dentro del sistema olfatorio. (Carleton et al., 2002).

La Taurina (ácido 2-aminoetansulfónico) juega un papel importante en los procesos esenciales en el desarrollo de diferentes áreas del SNC, tales como en la retina, en la estabilización de la membrana de neuronas, en la osmoregulación, entre otros. Se ha sugerido que la Taurina interviene en el desarrollo del cerebro a nivel neonato y en la regeneración neuronal en el adulto, siendo importante además, en la migración de neuroblastos y glioblastos provenientes de la zona subventricular que se establecen en el área de la corteza olfatoria y el sistema olfatorio. Se tiene bien documentada la participación de este neurotransmisor en la inducción de la proliferación de células progenitoras provenientes del giro dentado (circunvolución del cerebro que corresponde a una banda de sustancia gris, por debajo del borde medial del hipocampo y forma parte de un grupo de tejidos neuronales asociadas con la creación de ciertos tipos de memoria, con la formación de hábitos, y con diversas habilidades de aprendizaje) y del hipocampo (Shivaraj et al., 2012).

El Glutamato es el principal neurotransmisor de tipo excitatorio involucrado en la promoción o inhibición de la proliferación, sobrevivencia, migración y diferenciación de células progenitoras neuronales presentes tanto en el cerebro en desarrollo como en las zonas de regeneración neuronal en el adulto, tal es el caso de la corteza olfatoria; actuando tanto a través de receptores de tipo inotrópico (iGluRs) que son canales catiónicos no selectivos que permiten el flujo de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , como de tipo

metabotrópico (mGluRs) pertenecientes a la subfamilia C de receptores acoplados a proteínas G. Se ha sugerido que el Glutamato puede regular la neurogénesis actuando de manera no sináptica, ya sea a través de sus receptores iGluRs o mGluRs expresados en las células progenitoras neuronales y en las células diferenciadas a partir de estas; así como mediante acción paracrina en células vecinas activando moléculas de secreción que afecten la neurogénesis, tal es el caso de los factores neurotróficos. De manera particular, de los receptores tipo mGluRs se ha caracterizado que los de tipo AMPA/KA (receptores ácido α - amino- 3- hidroxil- 5- metil- 4- isoxazolpropiónico/kainato) se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro del adulto, encontrándose altamente expresados en las zonas de elevada regeneración y proliferación, además de afectar la dinámica de calcio intracelular que involucra la movilidad y migración de neuronas (Jansson et al., 2014).

GABA (ácido γ -aminobutírico) es otro neurotransmisor el cual se ha reportado que participa en mecanismos de retroalimentación entre los neuroblastos y células madre (stem) de este tejido, donde los neuroblastos liberan GABA de manera no sináptica, lo que activa receptores de tipo GABA_A, que regulan la activación del ciclo celular, limita la proliferación local y estimula la migración de células dentro del ambiente del bulbo olfatorio (Whitman et. al., 2009). Además, se ha comprobado que existe un mecanismo que regula la integración de neuronas generadas *de novo* en circuitos funcionales pre-existentes en el cerebro del adulto, particularmente de células granulares del hipocampo y del giro dentado y que es regulado por el ambiente de tipo GABA antes de que estas se integren a los circuitos sinápticos GABA- Glutamato. De esta manera, GABA inicialmente lleva a cabo actividad excitatoria en estas nuevas neuronas que les permitiría la regulación de sus sistemas de hiperpolarización-despolarización, que culminará con la formación de las conexiones sinápticas necesarias y el desarrollo de las funciones sensoriales, particularmente las de función olfatoria (Shaoyu et al., 2006).

PARASITOSIS PRESENTES EN LOS BULBOS OLFATORIOS Y CAMBIOS NEUROQUÍMICOS

La ruta de entrada por la vía respiratoria a través del neuroepitelio olfatorio ha despertado interés en los últimos años, debido a la diversidad de microorganismos que son capaces de infectar a través de ella causando alteraciones a nivel cerebral y manifestaciones clínicas particulares (Sjölander et al., 2010).

Ciertos virus como el herpes simple e influenza tipo A son capaces de alcanzar el cerebro a través del neuroepitelio olfatorio, a lo largo de las fibras nerviosas olfatorias, el nervio vago y trigémino.

En el caso de *Neisseria meningitidis*, la vía olfatoria se ha descrito como una nueva ruta de invasión a través de la entrada por los nervios olfatorios hasta llegar al SNC. Utilizando un modelo murino, se encontró que las bacterias podrían estar dentro de la submucosa del neuroepitelio olfatorio, a lo largo de los nervios olfatorios atravesando la placa cribiforme y dentro de los bulbos olfatorios para subsecuentemente encontrarlos en las meninges y en los espacios subaracnoideos. En este estudio, se pudo determinar que el desarrollo de la sepsis meningocócica a través de esta ruta requiere una bacteremia elevada comparada con la ruta sanguínea de diseminación natural (Sjölinder et al., 2010).

Burkholderia pseudomallei, bacteria agente causal de la melioidosis, es un patógeno que coloniza los nervios olfatorios. En estudios recientes, se encontró que durante esta infección se presentan alteraciones con morfología de tipo “dentado” en el neuroepitelio olfatorio y desintegración de la capa neuronal, lo que conlleva a la exposición de la lámina basal del mismo en donde la bacteria se establece. Además, se pudo observar pérdida de los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales, axones olfatorios degenerados y algunos focos de bacterias migrando a través de los nervios olfatorios, hasta cruzar la placa cribiforme y alcanzar la lámina externa de los bulbos olfatorios, en aproximadamente 24 h post-inoculación intranasal. Esta bacteria tiene la capacidad de migrar rápidamente a lo largo de los nervios trigémino y olfatorio, siguiendo la ruta antes descrita, para posteriormente alcanzar el parénquima cerebral y causar la sintomatología propia de la melioidosis cerebral (St John et al., 2014).

Recientemente, se ha evaluado el mecanismo por el cual algunas bacterias utilizan de manera alternativa la infección por vía intranasal; tal es el caso de *Listeria monocytogenes*, la cual puede colonizar los axones del nervio trigémino y ser transportada de manera retrógrada al tronco cerebral, causando encefalitis (St John et al., 2014).

Respecto al daño y a la respuesta del neuroepitelio olfatorio generada por la infección con algunas bacterias que utilizan la ruta de entrada intranasal, se ha observado que estos patógenos acceden a las láminas externas del bulbo olfatorio (lámina del nervio

olfatorio y glomerular) en un tiempo de aproximadamente 6 h; tal es el caso de *Staphylococcus aureus* que al ser instilado intranasalmente estimula la producción de moléculas como IL-6, TNF- α e iNOS, como mecanismos de defensa dentro de la mucosa olfatoria, mientras que la respuesta de tipo celular se establece a partir de macrófagos y células gliales envolventes, además de las células mitrales, que son las principales productoras de IL-6, que también se ha detectado en la lámina plexiforme externa (Herbert et al., 2012). En otros estudios, se encontró que la presencia en el cerebro de la bacteria *S. aureus* puede afectar algunos procesos de neurotransmisión, pues se observó que existen varias alteraciones en los neuroquímicos presentes en la zona del cuerpo estriado; tal es el caso del Glutamato, GABA y Aspartato que en tiempos tempranos de la infección (2 h) experimentan una reducción importante en su concentración probablemente debido a que la bacteria tiene la capacidad de aprovechar estos neurotransmisores en su metabolismo y en tiempos posteriores experimentan un aumento en su concentración extracelular debido a la capacidad de esta bacteria de tomar precursores de estos del medio y sintetizarlos *de novo*, lo que explicaría las afecciones a los procesos de excitación e inhibición neuronal que llevan a la aparición de convulsiones, comunes en este tipo de infección (Hassel et al., 2014).

Un parásito al que recientemente se ha relacionado con la presencia y daño en los bulbos olfatorios es *Plasmodium berghei* pues se ha descrito que es la primera estructura cerebral que resulta afectada durante el curso de la malaria, es decir, cinco días post-infección en el modelo murino se desarrollan micro hemorragias dentro de los capilares que irrigan a los bulbos olfatorios, además dentro de estas oclusiones se pueden encontrar también parásitos y el reclutamiento de células T CD8⁺ que llegan a alcanzar el parénquima del bulbo, contribuyendo con el establecimiento de la enfermedad; aunque su mecanismo espacio-temporal es poco conocido, se sabe que la consecuencia es la pérdida del olfato durante los primeros momentos de la infección antes de la aparición de la sintomatología típica de la enfermedad (Zhao et al., 2014).

Además, dentro del grupo de las amiba de vida libre, *Acanthamoeba spp.* tiene la capacidad de infectar el SNC resultando en la enfermedad denominada encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), la cual es fatal y se presenta principalmente en individuos inmunocomprometidos. Cabe destacar, que las vías de entrada de este microorganismo incluyen la ruta a través del neuroepitelio olfatorio, migrando a lo largo

de las fibras nerviosas olfatorias para finalmente invadir los bulbos olfatorios, aunque esta vía es poco común y no se encuentra bien caracterizada para esta amiba; también se conoce otra ruta, que es la entrada por el tracto respiratorio, lo que genera la invasión amibiana a los pulmones, seguido de los vasos sanguíneos alveolares y finalmente la diseminación sanguínea que le permitirá cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al SNC (Khan, 2007).

La amiba de vida libre *Balamuthia mandrillaris*, descrita como un microorganismo oportunista, causante de una encefalitis granulomatosa similar a la EAG por *Acanthamoeba spp.* denominada encefalitis amibiana por *Balamuthia* (EAB) afecta tanto a individuos sanos como a pacientes con algún compromiso inmunológico. Esta patología puede presentar también como vía de infección la ruta intranasal, pues después de la instilación por esta vía, se adhiere a la mucosa e invade el neuroepitelio olfatorio migrando a través del plexo nervioso de la submucosa o por la lámina propia, posiblemente a través de los filamentos neuronales atravesando la placa cribiforme para entrar directamente a los bulbos olfatorios invadiendo el SNC, de una manera similar a la ruta seguida por *N. fowleri*. Aunque esta vía no se considera la única ruta por la que este microorganismo accede al cerebro (se ha observado a través de rutas como la intravenosa, intratecal y cutánea). Se ha reportado un modelo animal en ratones C57BL/10 rag1^{-/-} (RAG-1) de edades entre 8 y 12 semanas para el estudio *in vivo* del desarrollo de esta enfermedad (Kiderlen et al., 2004. Lorenzo-Morales et al., 2013).

MIGRACIÓN DE *N. fowleri*

En el reporte de 1969 a cargo del Dr. Rodney Carter, se realizó la primera descripción completa de la patogenicidad, cultivo, morfología, virulencia y modelo experimental de *N. fowleri*.

Dentro de este trabajo, se detalla por primera vez en el modelo experimental de ratón los cambios morfológicos que aparecen en la cavidad nasal a diferentes tiempos después de la instilación con esta amiba. Se demostró que en los primeros momentos de la infección, la amiba puede ser encontrada dentro de la cavidad nasal; pero que 36 h después se observa que algunos trofozoítos han penetrado entre las células de la mucosa nasal aparentemente intacta. A las 72 h, la invasión focal es más evidente y se puede encontrar asociada a un ligero exudado inflamatorio, que a las 84 h post-

infección se convierte en un foco de inflamación agudo muy intenso dentro de la cavidad nasal, además de que es posible determinar que los trofozoítos ya se han diseminado hasta alcanzar los bulbos olfatorios; a las 96 h se generan cambios invasivos y necróticos irreversibles que se extienden hasta el resto de los hemisferios cerebrales, que alrededor de las 132 h post-infección generan la muerte de los animales. De esta manera, se propuso por primera vez que la ruta de establecimiento que sigue esta infección hasta el cerebro es a través de la vía olfatoria; y que probablemente infecta al hombre a través de la contaminación con este protozoario por la cavidad nasal (Carter, 1970).

Por otra lado, en un reporte de 1971 se concluye que la ruta de infección que sigue *N. fowleri* es a través de la vía nasal con marcada destrucción de los bulbos olfatorios, algunos focos hemorrágicos, necrosis tanto de la sustancia gris como en la sustancia blanca y presencia de abundante exudado inflamatorio. En este mismo estudio, se sugiere que aparentemente la invasión al parénquima de la sustancia blanca cerebral se da a través de una vía directa con separación de los cilindros axonales y células gliales (Martínez et al., 1971).

Posteriormente, se caracterizó el proceso de invasión al neuroepitelio olfatorio por la amiba y los cambios producidos a nivel ultraestructural. En estos estudios se encontró que aparentemente la amiba penetraba la mucosa olfatoria a través de una invasión directa a las células sustentaculares y se sugirió una ruta alterna de invasión a través de abrir las uniones estrechas presentes entre las células sustentaculares; lo que le permitiría una rápida diseminación en la lámina propia del neuroepitelio olfatorio, aunque se señala que de las dos vías anteriormente mencionadas, la primera sería la más importante para alcanzar el acceso a la mucosa olfatoria, bulbos olfatorios y al resto del parénquima cerebral, en donde encontraría las condiciones necesarias que le permitieran su crecimiento y multiplicación rápidamente (Fig 4) (Martínez et al., 1973).

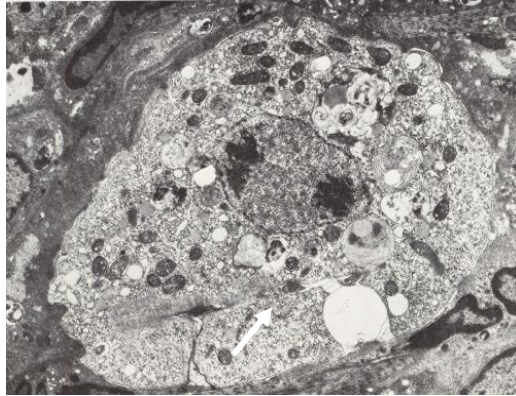


Fig 4. Trofozoíto de *N. fowleri* en mitosis dentro del neuroepitelio olfatorio. Se observa su morfología ameboidea característica y el núcleo (flecha) muestra material electrondenso polarizado que sugiere división celular. 4,520 x. Martínez et

En este trabajo, se señala que una vez que las amibas atravesaron la mucosa olfatoria, migran hacia el SNC vía los nervios olfatorios no mielinizados y a través de los espacios mesaxonales en estos nervios (Martínez et al., 1973).

Por otra parte se caracterizó la movilidad de *N. fowleri* y de especies no patógenas como *N. gruberi*, *N. australiensis* y *N. lovaniensis*, en contacto con células neuronales (B-103, neuroblastoma de rata) y no neuronales (Vero, riñón de mono verde africano; HeLa, carcinoma cervical humano; HEP-2, epiteloma laringe humano y L929, fibroblastos de ratón) utilizando un inóculo de 9×10^5 trofozoítos en un sistema de cámaras de Boyden con filtro ciego. Los resultados señalan que todos los tipos celulares mencionados son capaces de promover la migración de trofozoítos de *N. fowleri* hacia la cámara inferior que contiene extractos de estas, aunque de manera específica, las células nerviosas generaron mayor respuesta que los otros tipos celulares. Además, se determinó que *N. fowleri* presenta una mayor respuesta de quimiocinésis a partir de extractos provenientes de células nerviosas en comparación con extractos de células Vero, pues se necesitó una concentración mayor de proteína para estimular una respuesta equivalente a la obtenida con las células B-103 (Fig 5) (Cline et al., 1986).

Comentado [F1]: Ya no puedes usar y colaboradores porque ya estableciste usar et al

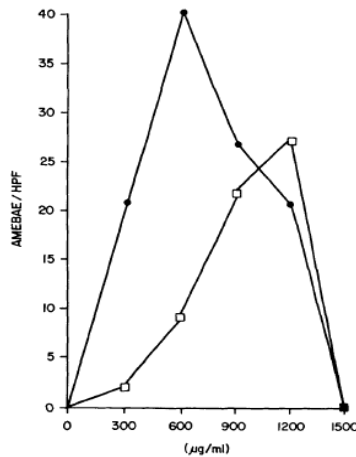


Fig 5. Respuesta migratoria de trofozoítos de *N. fowleri* en contacto con extractos de células de mamíferos. Se graficó el número de amibas por campo presentes en la cámara inferior de la cámara de Boyden que contenía los extractos celulares. Con (●) curva correspondiente a extractos de células B-103 y con (□) la curva correspondiente a extractos de células Vero. (Cline et al., 1986. J Protozool 33(1): 10-13)

Estos datos sugieren que existe cierta especificidad de *N. fowleri* para responder a las células nerviosas, por lo que la velocidad de locomoción de la amiba puede estar contribuyendo en la patogénesis de la enfermedad; ya que las cepas recuperadas de ratón respondieron de manera más vigorosa a las células nerviosas que las cultivadas axénicamente (control) o las especies no patógenas, que no mostraron este fenómeno. En este trabajo los autores concluyeron, que es probable que *in vivo* este tropismo y el incremento en la velocidad de migración de la amiba en presencia de células nerviosas, sea un factor importante en la llegada de los trofozoítos al SNC y su posible división (Cline et al., 1986).

En otro estudio en donde se utilizó un marcaje radioactivo en los trofozoítos de *N. fowleri* (con uridina [³H]) dentro de un sistema de cámaras de Boyden con filtro ciego y como quimioatrayente extractos de células B103, se demostró que las cepas altamente virulentas de *N. fowleri* responden de manera quimiotáctica a este estímulo, aunque en poblaciones con elevada cantidad de amibas la respuesta que se presenta es de tipo quimiocinética (Brinkley et al., 1992).

La migración de trofozoítos de *N. fowleri* desde la mucosa nasal hasta el SNC se estudió por microscopía de luz en el modelo del ratón durante los primeros momentos post-infección con un inóculo de 1×10^6 trofozoítos a intervalos de 24, 32 y 48 h post-inoculación. Se observó que que la fila olfatoria no mielinizada, formada por los nervios olfatorios de las células sensoriales, sirven como rutas de acceso para la amiba hacia el SNC provenientes de la cavidad nasal. En este estudio además se demostró el movimiento de la amiba a través de los plexos nerviosos submucosales, la fila olfatoria y dentro de los espacios porosos de la placa cribiforme hasta alcanzar los bulbos olfatorios en el cerebro antes de que se presente un daño tisular importante. En los primeros momentos de la infección (48 h post-inoculación) no se observó inflamación o amibas dentro de las meninges, lo que confirmó que la infección temprana sucede primero dentro del SNC y posteriormente se mueve hacia las meninges, de acuerdo con la secuencia cronológica de la sintomatología presente en los pacientes. En este estudio se confirma que la ruta mesaxonal es probablemente la vía natural para que se produzca la migración de los trofozoítos hasta el SNC (Jarolim et al., 2000).

Un reporte más detallado de las primeras horas post-infección, con un inóculo de 1×10^6 trofozoítos de *N. fowleri*, se llevó a cabo en el modelo murino utilizando técnicas inmunohistoquímicas a 8, 12, 24, 30 y 96 h post-infección. A las 8 h post-infección se encontró que las amibas estaban en contacto con la superficie de la lámina mucosa del neuroepitelio olfatorio, además de que algunas amibas fueron capaces de moverse a través de esta lámina sin generar daños en la integridad de la misma. Se observó también que algunos de los trofozoítos son eliminados al encontrarse embebidos en moco, como primera línea de defensa inmunológica. A las 24 h post-inoculación el neuroepitelio olfatorio no mostró evidencia de daño o ulceraciones aparentes; lo que sugiere que es hasta los tiempos tardíos de la infección que las proteasas de los trofozoítos juegan un papel determinante como factores de invasión; además en este tiempo se observaron amibas en la lámina propia. A las 30 h post-infección, se pudo observar a algunos trofozoítos migrando a través de la placa cribiforme a lo largo de toda la fila olfatoria sin evidencia de que estas se encontraran multiplicándose. El daño tisular fue mínimo durante los tiempos que van de 8 a 30 h post-inoculación, pero en tiempos más largos (96 h), las amibas se encontraron rodeadas de células inflamatorias. A este tiempo también fue posible encontrar a las amibas ya dentro de

los bulbos olfatorios de manera importante, y probablemente proliferando, también se observaron numerosas células inflamatorias y daño severo en el tejido circundante; este daño pudo ser causado tanto por la amiba como por la respuesta inmunológica establecida en el SNC (Rojas-Hernández et al., 2004).

Para determinar la importancia de la respuesta inflamatoria en el establecimiento y daño causado durante la MAP, se inocularon 2.5×10^4 trofozoítos de *N. fowleri* por vía nasal, y se analizaron los cambios histopatológicos que ocurren en el parénquima cerebral debido a la inflamación y la presencia de la amiba.

Los resultados sugieren que los trofozoítos alcanzan el SNC a las 72 h post-inoculación, y que a partir de las 96 h se puede observar un incremento considerable en el número de estos, sugiriendo que dentro del SNC se encuentran una serie de componentes, como neuroquímicos y factores de crecimiento, implicados en el tropismo de la amiba a los bulbos olfatorios que le pueden proporcionar los elementos necesarios para poder proliferar y establecerse en los mismos. Respecto a la inflamación, a las 72 h post-institución, no se encontraron células inflamatorias presentes o daño aparente en el parénquima cerebral, a pesar de que el número de trofozoítos fue elevado, sin embargo, a las 96 h post-inoculación se observó la presencia de focos de inflamación con predominio de eosinófilos y neutrófilos rodeando a las amibas, aunque esta respuesta no es eficiente para la eliminación de *N. fowleri*. La señalización generada por estas células inflamatorias (citocinas y quimiocinas) es posible que incremente la inflamación en el cerebro lo que conlleva al daño tisular. Toda esta respuesta inflamatoria se presentó principalmente en la parte frontal de la corteza cerebral, pues en áreas posteriores, a pesar de la presencia de las amibas no se encontró inflamación o daño aparente (Cervantes-Sandoval et al., 2008).

EFFECTO DE NEUROQUIMICOS Y PRESENCIA DE RECEPTORES A NEUROTRANSMISORES EN PROTOZOARIOS

En los últimos años, se ha estudiado con mayor interés la presencia y función de proteínas homólogas a receptores de neurotransmisores, de manera particular, GABA y Glutamato en diferentes protozoarios, de los que destacan *Trypanosoma cruzi*, *Paramecium primaurelia* y *Dictyostelium discoideum*.

En el caso de *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, se ha sugerido la presencia de un posible receptor a Glutamato que se encontraría involucrado en la

sobrevivencia y diferenciación de fases de este parásito (metacicloogénesis). Esto se realizó utilizando fármacos antagonistas de receptores del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) a este como la amantadina y la memantina; de esta manera se observó que al incubar con estos fármacos disminuyó la viabilidad de los protozoarios, además, que se encontraron marcadores de daño tipo apoptosis en los mismos. El mecanismo que se propone por el cual se aprovecharía en la metacicloogénesis este tipo de aminoácidos (Glutamato y relacionados) es a través del re-establecimiento de los niveles de ATP intracelular requeridos para tener la suficiente energía que se requiere en este proceso (Damasceno et al., 2014).

En el caso de *P. primaurelia*, se ha relacionado la presencia de receptores metabotrópicos para GABA (GABA_BR) en la regulación del comportamiento de nado en reversa, propio de este protozoario y regulado por la actividad ciliar, a través del control de canales de calcio presentes en la membrana celular. Utilizando técnicas de inmunofluorescencia y western blot se pudo comprobar la presencia en la membrana de *Paramecium* de receptores tipo GABA_BR, además, la función de estos receptores se estudió utilizando inhibidores específicos y se observó la regulación del comportamiento ciliar para nado de respuesta reversa lo que sugiere control en la actividad de los canales de calcio; aunado a esto se comprobó que este protozoario tiene la capacidad de sintetizar y liberar GABA al medio a través de la despolarización de la membrana (Ramoino et al., 2003).

En el caso de la amiba de vida libre *D. discoideum* se ha estudiado el papel de moléculas que en mamíferos están asociadas a la transmisión sináptica (de manera particular receptores para GABA, Glutamato y ATP), y se les ha encontrado relacionadas en la diferenciación celular y homeostasis en este microorganismo. A través de análisis bioinformático, se demostró que en el genoma de la amiba se encuentran 17 genes que codifican para receptores transmembranales con homología a receptores metabotrópicos para GABA y Glutamato. Además, a la fecha se han caracterizado 2 miembros de esta familia, que en *D. discoideum* fueron denominados GrIE y GrIJ; el primero relacionado a la fase de desarrollo y agregación de la amiba, así como en la quimiotaxis de la misma, mientras que GrIJ se encuentra relacionada con la formación de esporas viables y cuerpos fructíferos normales (Fountain, 2010).

Con todos estos estudios *in vitro* e *in vivo*, se puede sugerir que *N. fowleri* requiere de factores presentes en el sistema nervioso como son los neurotransmisores específicamente de tipo aminoacídico (Taurina, Glutamato y GABA) o factores de crecimiento para poder sobrevivir y proliferar en el SNC. Estos le pueden brindar a los trofozoítos los nutrientes necesarios para poder dividirse y establecerse a nivel del bulbo olfatorio, por lo que es de interés en este trabajo determinar el efecto de la co-incubación de *N. fowleri* con algunos de estos neurotransmisores y factores de crecimiento.

JUSTIFICACIÓN

La MAP es un cuadro clínico fulminante que afecta principalmente a niños y jóvenes con historia reciente de natación en cuerpos de agua contaminados con *N. fowleri*. Esta se inicia con la entrada de los trofozoítos por la mucosa nasal, sigue una ruta de infección por la vía olfatoria hasta alcanzar los bulbos olfatorios. En trabajos anteriores, se observó que en el modelo murino de la MAP, los trofozoítos llegan a los bulbos olfatorios a partir de las 72 h post-institución y a partir de las 96 h el incremento en el número de trofozoítos presentes en este tejido es considerable. Esto sugiere que en el bulbo olfatorio se encuentran neuroquímicos y factores de crecimiento implicados en la migración y proliferación celular de las amibas, por lo que en el presente trabajo se analizará el papel de algunos de los neurotransmisores y factores de crecimiento presentes en los bulbos olfatorios (Taurina, GABA, Glutamato, IGF-I y TGF- α) en interacción directa con los trofozoítos de *N. fowleri*.

HIPÓTESIS

La co-incubación con neuroquímicos (Glutamato, GABA y Taurina) y factores de crecimiento (IGF-I y TGF- α) favorecerá la migración, proliferación y establecimiento de los trofozoítos de *N. fowleri* en los bulbos olfatorios.

OBJETIVOS GENERAL

Evaluar el efecto de neuroquímicos y factores de crecimiento presentes en los bulbos olfatorios en contacto con trofozoítos de *Naegleria fowleri*.

PARTICULARES

1. Evaluar si los bulbos olfatorios (BO) frescos inducen la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri*.
2. Determinar la participación de los neuroquímicos (GABA, Glutamato y Taurina) y de los factores de crecimiento (TGF- α e IGF-I) solos y en combinación en los fenómenos de proliferación y migración en un sistema *in vitro*.
3. Identificar el patrón diferencial de proteínas de trofozoítos de *N. fowleri* en interacción con los neuroquímicos y factores de crecimiento en los cuales se haya observado mayor proliferación y migración.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

CULTIVO DE AMIBAS

La cepa patógena, *N. fowleri* ATCC 30808, se utilizó en todos los experimentos. Los trofozoítos se cultivaron de manera axénica en medio Bactocasitona al 2% (m/v), (BD. 225930) suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) (Microlab. SU440).

Los trofozoítos se incubaron a 37°C y fueron utilizados durante la fase logarítmica de crecimiento (48 horas).

ANIMALES DE LABORATORIO

Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c, de cuatro semanas de edad y con peso aproximado de 20 g; a los cuales se les extrajeron los bulbos olfatorios para ser utilizados en los ensayos de curvas de crecimiento con tejido fresco en interacción con trofozoítos de *N. fowleri*. El manejo de los animales se llevó a cabo según el protocolo aprobado por el comité institucional que se apega a lo establecido en la norma nacional (NOM-062-ZOO-1999). Los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico y manejados de acuerdo a la guía del Panel de Eutanasia 2000 AVMA.

ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO BULBOS OLFATORIOS EN FRESCO Y FIJADOS

Se realizó un ensayo de curvas de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* al interactuar con un par de bulbos olfatorios disecados como se mencionó anteriormente. El experimento se realizó por duplicado y en condiciones de esterilidad.

Para este ensayo, se utilizó un inóculo de 5×10^5 trofozoítos que se colocaron en tubos de vidrio de aproximadamente 15 mL los cuales se llenaron con 3 mL de medio de Bactocasitona al 2% (BD. 225930) suplementado con SFB (Microlab. SU440) como tubos que solo llevaron medio de cultivo. Tras la obtención de los bulbos olfatorios, se realizaron lavados con solución de PBS 1X estéril, posteriormente se disgregaron suavemente y a los tubos con medio se les añadió el tejido macerado. Los tubos se incubaron a 37 °C en una cinética correspondiente a intervalos tiempo de 3, 6, 9 y 12 h. Pasado el tiempo de interacción, se realizó el conteo de amibas recuperadas en cada tubo (enfriando los tubos en agua-hielo) utilizando una cámara de Neubauer y además se realizaron ensayos de viabilidad utilizando el método de exclusión de colorante con

azul tripano. A los resultados obtenidos se les realizó el análisis estadístico utilizando la prueba de T de student con un valor de significancia estadística de $P \leq 0.05$.

Los controles utilizados para este experimento correspondieron a tubos con medio de Bactocasitona al 2% (BD. 225930), suplementados con SFB (Microlab. SU440) así como con medio sin SFB, a los que se les añadió el mismo inóculo de amibas. Además se utilizó un tubo con medio sin SFB correspondiente a bulbos olfatorios fijados por calor (control de bulbos olfatorios) usando un sistema de baño María en el que ya cuando el agua está hirviendo, se colocó el tejido recién obtenido por 5 minutos al calor (en tubos Eppendorf), para evitar cualquier efecto tóxico que podría presentarse por el procesamiento de la fijación. Este ensayo se realizó en condiciones de esterilidad y por duplicado.

ENSAYOS DE VIABILIDAD

Se realizaron ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri* post-interacción con los bulbos olfatorios o con el neuroquímico correspondiente utilizando el colorante de exclusión azul tripano a partir de una solución stock al 2% (m/v) en PBS 1X a pH 7.2 estéril.

Los tubos en los que se realizó la interacción se enfriaron de 15 a 20 minutos en hielo para así poder recuperar el total de las amibas de cada muestra. Posteriormente el contenido se colocó en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 1,500 rpm (375 g) durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió el paquete celular; se tomaron 9 μ l del mismo para colocarse en un portaobjetos con 3 μ l del colorante azul tripano. Finalmente, se tomaron fotografías en el microscopio óptico Nikon eclipse 80 i a diferentes aumentos.

CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO NEUROQUÍMICOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO PURIFICADOS

Se realizaron curvas de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* al interactuar con neuroquímicos y factores de crecimiento en las siguientes concentraciones:

- Taurina (0.9 mM) (SIGMA)
- GABA (6 μ M) (Santacruz)
- Glutamato (13 μ M) (SIGMA)
- TGF α (1.0 ng/ml – 1000 ng/ml) (PeproTech)

- IGF-I (1.0 ng/ml - 1000 ng/ml) (PeproTech)

Estos fueron disueltos en solución de PBS fisiológico y estéril. Para este estudio, se utilizó un inóculo inicial de 5×10^5 trofozoítos de *N. fowleri*; a los tubos de cultivo se les añadió 3 mL de la solución del neuroquímico correspondiente y se incubaron a 37°C en una cinética de 1, 3 y 6 h post-incubación. Pasado este tiempo, se realizó el conteo de amibas utilizando la cámara de Neubauer y finalmente se realizó el análisis estadístico (previamente descrito) de los resultados obtenidos. Como condición control de estos experimentos se utilizó un tubo con el mismo inóculo de amibas en un volumen de 3 mL de PBS, que se sometió al mismo procesamiento que las condiciones problema. Todos estos ensayos se realizaron en condiciones de esterilidad y por triplicado.

ENSAYOS DE CURVA DOSIS-RESPUESTA UTILIZANDO LOS FACTORES DE CRECIMIENTO (IGF-I Y TGF- α) CON TROFOZOITOS DE *N. fowleri*

Se realizaron ensayos de curva dosis-respuesta utilizando los factores de crecimiento IGF-I y TGF- α (PeproTech) en concentraciones crecientes que fueron desde 1, 10, 100 y 1000 ng/mL; todos los neuroquímicos fueron disueltos en PBS 1X y en condiciones de esterilidad partiendo de una solución stock inicial de 1 μ g/10 μ l.

Las interacciones se realizaron en tubos de vidrio de 15 ml en los que se colocó un inóculo inicial de 5×10^5 trofozoítos de *N. fowleri* con la concentración deseada de cada factor y se llevó a un volumen total de 3 ml con medio de Bactocasitona al 2% (BD. 225930) sin SFB. Se siguió en una cinética de co-incubación de 3, 6 y 9 h. Posteriormente, se realizó el conteo utilizando el hematocitómetro y los ensayos de viabilidad se realizaron con el colorante de exclusión azul tripano.

Como condición control en estos experimentos, se utilizaron tubos con medio de Bactocasitona al 2% sin SFB. Los experimentos se realizaron de manera independiente y por triplicado. Se realizó el estudio de significancia estadística mencionado anteriormente.

ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* EN PRESENCIA DE NEUROQUÍMICOS PURIFICADOS DEL BULBO OLFATORIO

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando insertos Millicell de 8 μ m de poro (MILLIPORE. Cat. #PIEP15R48) suspendidos en placas de 12 pozos. Se utilizó un inóculo inicial de 5×10^5 trofozoítos de *N. fowleri*, en medio Bactocasitona sin SFB

(para el caso de los factores de crecimiento) o en PBS 1X estéril (para el caso de los neuroquímicos). El inóculo de las amibas se colocó en la parte superior del inserto y se llevó a un volumen final de 1 mL. En la parte inferior, dentro del pozo de la placa se colocaron 2 ml de la solución correspondiente a cada concentración del neuroquímico o factor de crecimiento como estímulo de migración.

Se incubaron a 37°C, por tiempos de 1, 3 y 6 h. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes de cada cámara (tanto superior como inferior), se centrifugaron a 1500 rpm (375 g) por 10 minutos y se realizó el conteo de células presentes en cada cámara utilizando un hematocitómetro; así como ensayos de viabilidad con el método de exclusión de azul tripano.

Por otra parte, en cada tiempo de la cinética se utilizó un inserto Millicel al cual se le cortó la membrana de PET, esta se fijó utilizando 1 mL de metanol por 10 minutos y se tiñó utilizando 1 mL del colorante azul de toluidina al 0.5%; a continuación se analizó la cara superior e inferior de la membrana. Además, se realizaron ensayos de viabilidad y se tomaron fotografías en microscopía de campo claro a diferentes aumentos para ambos casos. Se realizó el análisis

estadístico correspondiente de los resultados obtenidos de la manera antes mencionada y se construyeron gráficos de migración para cada neuroquímico o factor de crecimiento utilizado. Estos experimentos se realizaron por triplicado y en dos ensayos independientes.

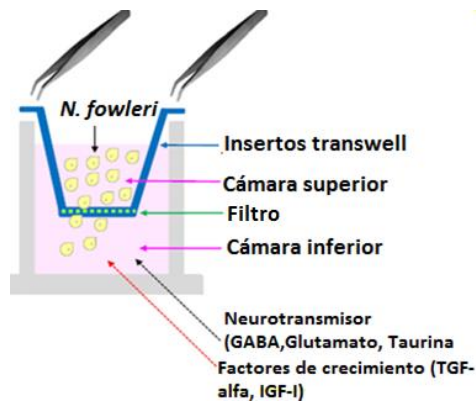


Fig 6. Montaje de cámara de Boyden para ensayos de migración utilizando insertos Millicel de 8 μ m de poro

RESULTADOS

ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO BULBOS OLFATORIOS FRESCOS Y FIJADOS

Para conocer el posible efecto de los componentes de los bulbos olfatorios sobre los trofozoítos de *N. fowleri* se llevó a cabo la co-incubación de un inóculo inicial de 5×10^5 trofozoítos en contacto con bulbos olfatorios frescos obtenidos de ratón en tubos que contenían 3 ml de medio de Bactocasitona al 2% suplementado con SFB o sin suero. Los controles de este experimento correspondieron a la condición de cultivo (medio con SFB), medio sin SFB y a bulbos olfatorios fijados por calor y colocados en el medio de cultivo.

Los resultados mostraron que desde las 3 h post-interacción en los tubos problema (con bulbos olfatorios en fresco) el número de trofozoítos fue mayor en comparación con cualquiera de las condiciones control utilizadas. Esta diferencia en el número de amibas fue más evidente a partir de las 6 h post-incubación y para las 12 h estos mostraron una tendencia de crecimiento mayor; que en el análisis estadístico correspondiente resultó ser significativo en comparación con las condiciones control. Cabe destacar, que este es un resultado importante ya que incluso en la interacción correspondiente a bulbos olfatorios con medio y sin SFB, el número de trofozoítos en todos los tiempos trabajados fue mayor que en la condición de cultivo estándar utilizada en el laboratorio (Fig. 7).

Durante el desarrollo de este experimento, se realizaron ensayos de viabilidad en todos los casos (tanto para la condición control como para los problemas) utilizando el método de exclusión del colorante azul tripano. Se visualizaron al menos cuatro campos y se contaron las amibas para determinar el porcentaje de viabilidad en cada caso. Los resultados obtenidos mostraron que en todos los tiempos trabajados se mantuvo la viabilidad de los trofozoítos en porcentajes superiores al 95% (Tabla 1). También se pudo observar que las amibas conservaron su morfología característica en todos los casos (Fig. 8).

Cabe señalar que para las condiciones en las que se utilizó el tejido de bulbo olfatorio, se pueden observar restos celulares positivos a azul tripano que probablemente se dañaron durante la disgregación del tejido.

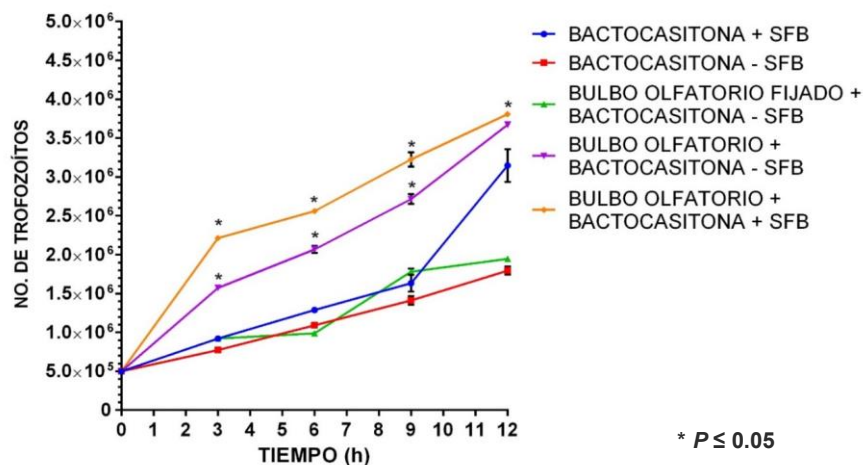


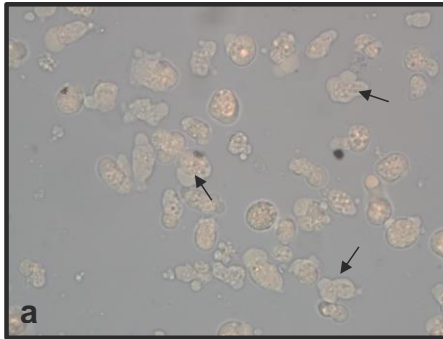
Fig 7. Curva de crecimiento de trofozoitos de *N. fowleri* en interacción con bulbos olfatorios frescos y fijados. El número de trofozoitos de *N. fowleri* presentes en cada condición a las 3, 6, 9 y 12 h post-incubación se registró por medio de una cámara de Neubauer. El análisis estadístico indica que las curvas correspondientes a bulbo olfatorio en fresco más medio con SFB (amarilla), y de bulbo olfatorio en fresco más medio sin SFB (morado) muestran un número mayor de trofozoitos durante toda la cinética que cualquiera de las condiciones control utilizadas ($*P \leq 0.05$). Cada conteo se realizó por duplicado y se trabajó con triplicados de cada condición.

GRUPO \ TIEMPO	3 h	6 h	9 h	12 h
CONTROLES				
<i>Nf</i> + Bactocasitona 2%+ SFB	99%	99%	99%	99%
<i>Nf</i> + Bactocasitona 2% sin SFB	99%	99%	99%	99%
<i>Nf</i> + Bactocasitona 2% sin SFB + BO FIJADO	98%	98%	98%	98%
PROBLEMAS				
<i>Nf</i> + Bactocasitona 2% sin SFB + BO FRESCO	99%	99%	98%	98%
<i>Nf</i> + Bactocasitona 2% + SFB + BO FRESCO	99%	99%	98%	98%

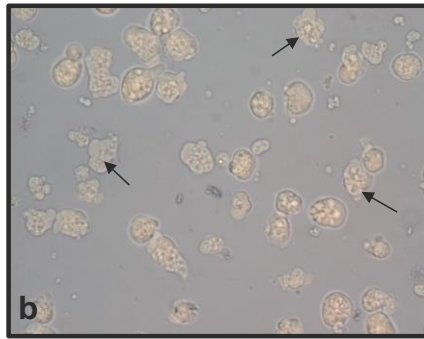
Tabla 1. Porcentajes de viabilidad de trofozoitos de *N. fowleri* con bulbos olfatorios utilizando la técnica de exclusión de azul tripano. La viabilidad de los trofozoitos correspondientes a cada condición se determinó por conteo de células negativas a azul tripano en 4 campos diferentes por muestra en el microscopio óptico. *Nf*, *Naegleria fowleri*. BO, bulbo olfatorio. SFB, suero fetal bovino.

VIABILIDAD DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* CO-INCUBADOS CON BULBO OLFATORIO

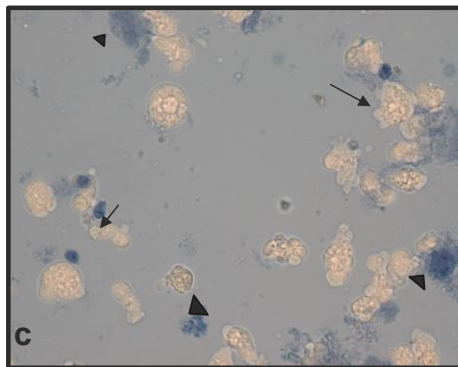
Nf + Bactocasitona 2% + SFB 10%



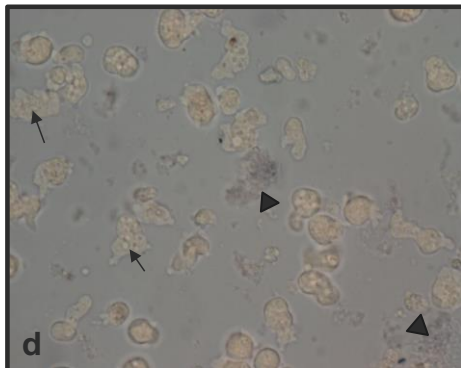
Nf + Bactocasitona 2% sin SFB



Nf + Bactocasitona 2% sin SFB + BO fijado



Nf + Bactocasitona 2% + SFB + BO



Nf + Bactocasitona 2% sin SFB + BO

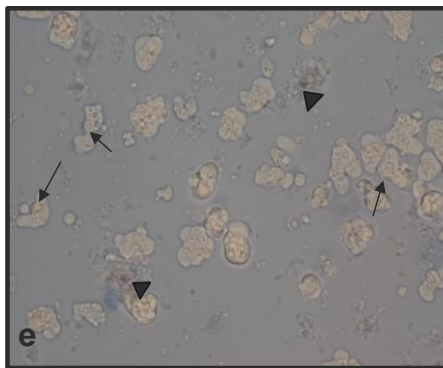


Fig 8. Ensayos de viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* en curvas de crecimiento en interacción con bulbos olfatorios. Viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* utilizando la técnica de exclusión de azul tripano. En todos los casos se mantuvo alrededor del 98%. La morfología amibiana (flechas) no se ve afectada en ninguna de las condiciones, mientras que en los paneles (c), (d) y (e) en los que se colocó tejido de bulbo olfatorio; algunas células propias del tejido presentan positividad al colorante (cabezas de flecha). En todas las imágenes se muestra el máximo tiempo de interacción que fue de 12 h. 60x.

ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO TAURINA (0.9 mM)

En este experimento se realizó la construcción de curvas de crecimiento con un número inicial de 5×10^5 trofozoítos de *N. fowleri* cultivados con una solución de Taurina 0.9 mM, disuelta en PBS 1X estéril. Esto se realizó en una cinética de 1, 3 y 6 h.

Como se puede observar en la curva correspondiente, en el caso de la condición problema (PBS 1X + Taurina 0.9 mM) el número de trofozoítos aumentó en comparación con la condición control (solo PBS). Cabe señalar que incluso bajo las condiciones control, el número de trofozoítos aumentó durante todos los tiempos de co-incubación.

Respecto al problema, se puede observar que al realizar el análisis estadístico fue significativamente mayor el número de trofozoítos en el tiempo de 6 h post-incubación en comparación con la condición control ($P \leq 0.05$), sin embargo, es importante resaltar que al tiempo de 3 h se observó un mayor número de amibas en esta condición que en el control (Fig 9).

Durante el desarrollo de este experimento, se realizaron los ensayos de viabilidad correspondientes a cada tiempo de la cinética y en cada condición utilizada; el resultado obtenido es que en todos los casos la viabilidad resultó mayor al 95%. Las amibas mostraron su morfología característica en ambos casos (Fig 10).

N. fowleri + Taurina (0.9 mM)

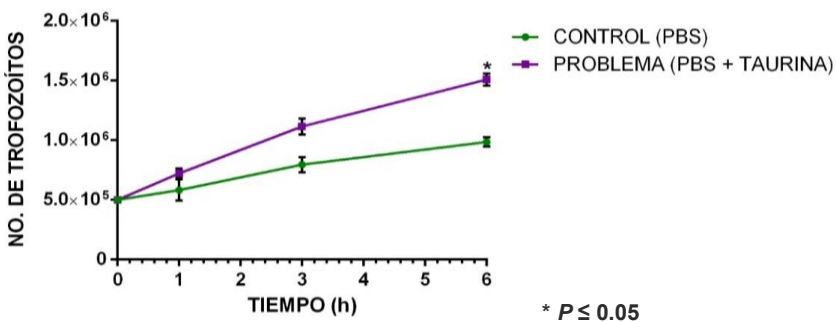


Fig 9. Curva de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* incubados con Taurina (0.9 mM). Trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados con Taurina en PBS. En la curva de

crecimiento se observa como la Taurina induce mayor estímulo de proliferación, debido al aumento en el número de amibas durante la cinética de 1, 3 y 6 h. Se determinó una significancia estadística hasta las 6 horas post-incubación ($*P \leq 0.05$).

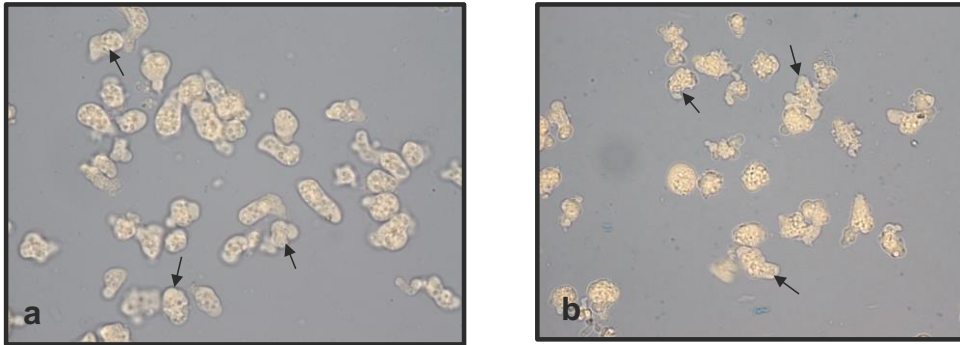


Fig 10. Ensayos de viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados con Taurina (0.9 mM). La viabilidad fue mayor al 95% tanto en el caso del problema (a) con Taurina 0.9 mM como en el control (b) con PBS 1X en todos los tiempos de la incubación (1, 3 y 6 h). La morfología que se observa en ambos casos es típica de la ameba (flechas). Las imágenes fueron tomadas en microscopía de campo claro y corresponden al tiempo de 6 h de co-incubación. 60x.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE TAURINA (0.9 mM)

Para el desarrollo de este experimento se utilizó un sistema de cámara de Boyden, utilizando insertos Millicel que cuentan con una membrana de PET de 8 μm de poro, el sistema cuenta con dos cámaras separadas por la presencia del inserto. En la cámara superior se colocó un inóculo de 5×10^5 trofozoítos de *N. fowleri* en PBS 1X estéril a 1 ml de volumen final, mientras que en la cámara inferior se colocaron 2 ml de una solución 0.9 mM de Taurina como estímulo de migración para la ameba, siguiendo una cinética de 1, 3 y 6 h.

Los resultados obtenidos señalan que, desde la primera hora de interacción en este sistema, en la cámara inferior que contiene a la Taurina 0.9 mM se encontró un número significativamente mayor de trofozoítos en comparación con la cámara inferior de la condición control. Esta diferencia en la migración en presencia de Taurina (problema) se mantuvo a las 3 y 6 h, además que se observó un incremento en el número inicial de amibas presentes respecto al inóculo inicial colocado en todas las condiciones del experimento (Fig. 11). La viabilidad en todas las condiciones experimentales se

mantuvo superior al 95% para ambas cámaras. Finalmente, se cortaron, fijaron y tiñeron las membranas de los filtros correspondientes a los tiempos de 1 y 6 h en los que se observó que al primer tiempo de interacción, los trofozoítos en ambas condiciones se mantenían adheridos a la membrana o comenzando a pasar por los poros de la misma; en las imágenes mostradas tanto en el control como en el problema hay un número elevado de trofozoítos adhiriéndose a esta membrana. Por otra parte, en las imágenes correspondientes a 6 h post-interacción se observó en el control un número menor de trofozoítos adheridos a la membrana o pasando por los poros, mientras que en el problema no se pudieron encontrar trofozoítos en la misma cara, lo que nos indica que la mayoría de las amibas se encontraron en la cámara inferior (Fig 11).

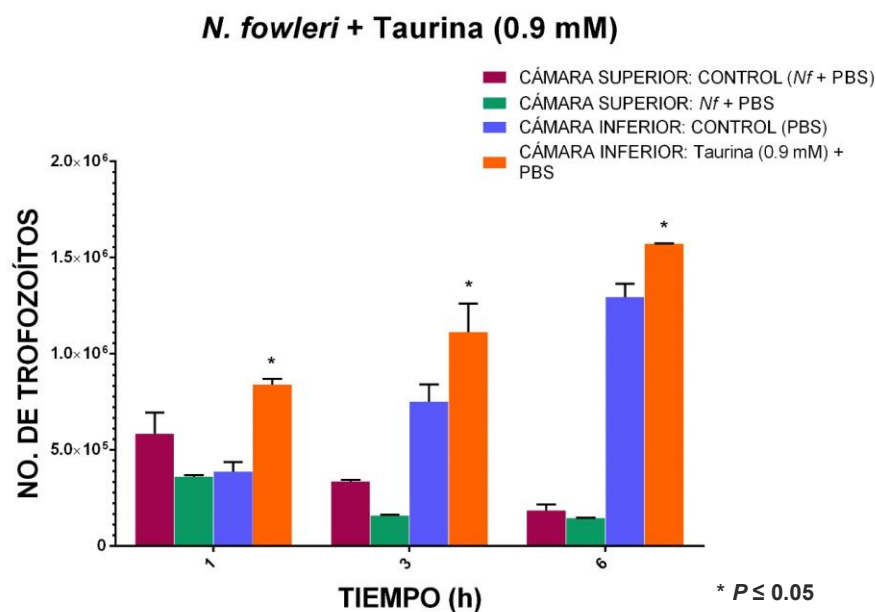


Fig 11. Migración de trofozoítos de *N. fowleri* utilizando como estímulo de migración Taurina (0.9 mM). Cinética (1, 3 y 6 h) donde se observa que la respuesta de migración es significativamente mayor ($* P \leq 0.05$) en todos los casos de interacción con el problema (Taurina 0.9 mM) que con el control (PBS). Los conteos se realizaron en la cámara superior e inferior del sistema de filtros Transwell- Millicel y se

compararon con la condición control, en la que no se colocó ningún estímulo de migración.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE *N. fowleri* + Taurina (0.9 mM)

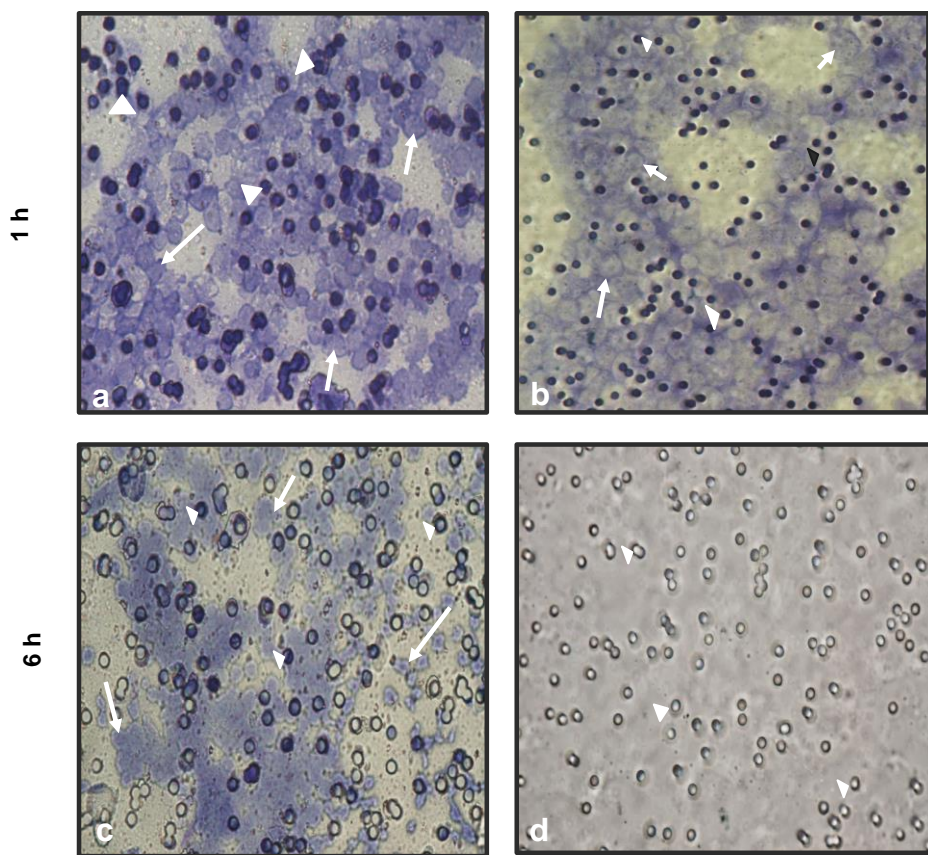


Fig 12. Membranas de PET correspondiente a los ensayos de migración con Taurina (0.9 mM). Se observa que en (a) y (b) correspondiente al tiempo de 1 h de interacción y a la condición control (PBS) y problema (Taurina 0.9 mM), respectivamente, se encuentra un número elevado de amibas (flechas) adheridas al

filtro o pasando a través de los poros del mismo (cabezas de flecha); mientras que para (c) y (d) del tiempo de 6 h, en el caso del filtro del control (c) se encuentran aún amibas adheridas (flechas) y pasando por los poros (cabezas de flecha), no así en el caso del problema en el que sobre el filtro prácticamente no hay amibas adheridas o pasando a través de él. 40x.

ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO GLUTAMATO (13 μ M)

En este experimento se partió de un inóculo de 5×10^5 trofozoítos de *N. fowleri*, los cuales fueron co-incubados con Glutamato (13 μ M) en PBS 1X estéril. Se construyó la curva de crecimiento correspondiente a 1, 3 y 6 h post-incubación y el análisis estadístico.

Los resultados obtenidos, muestran que la interacción de la solución de Glutamato con los trofozoítos de *N. fowleri* inducen un crecimiento significativo desde la primera hora de interacción, siendo más evidente a partir de las 3 h de co-incubación, tendencia que se mantuvo a las 6 h.

De este experimento, se realizaron los ensayos de viabilidad utilizando el principio de exclusión de azul tripano, en el que en todos los casos se encontró una viabilidad superior al 95%, siendo esta la concentración del neurotransmisor que se trabajó en los siguientes ensayos.

N. fowleri + Glutamato (13 μ M)

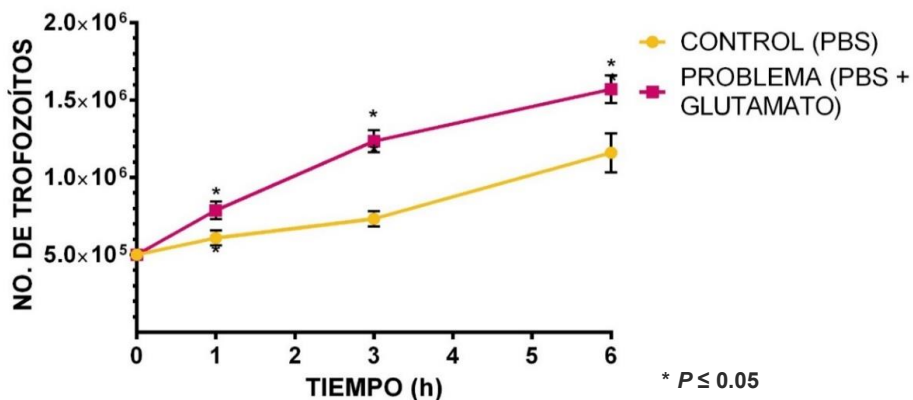


Fig 13. Curva de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* incubados con Glutamato (13 μM). Gráfico correspondiente a diferentes tiempos post-incubación (1, 3 y 6 h). En presencia de Glutamato el número de trofozoítos aumentó de manera significativa en comparación con los encontrados en la condición control (* $P \leq 0.05$).

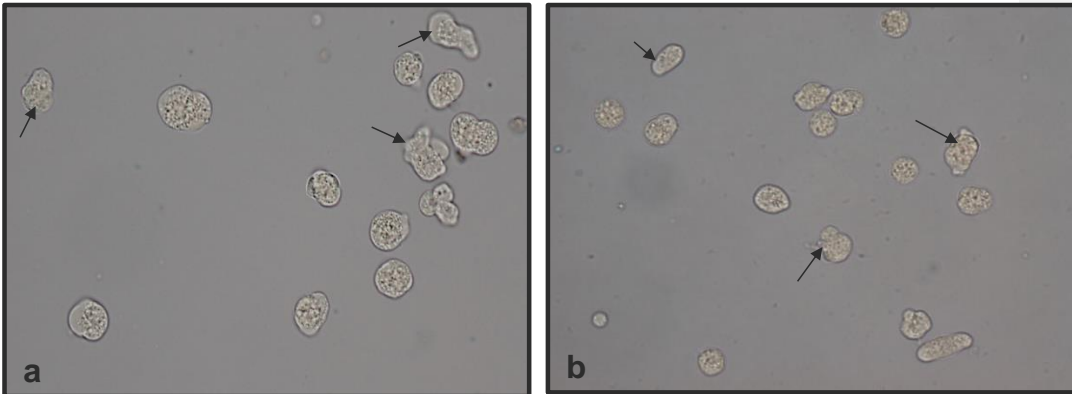


Fig 14. Viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* incubados con Glutamato (13 μM). Los trofozoítos de *N. fowleri* mantuvieron una viabilidad mayor al 95% al co-incubarse con una solución 13 μM de Glutamato. En (a) se observa la viabilidad de las amibas en la condición problema (Glutamato) a un tiempo de 6 h, mientras que en (b) se muestra la viabilidad de los trofozoítos del control (PBS) en el mismo tiempo de co-incubación. En ambos casos, las amibas (flechas) conservan su morfología normal durante todos los tiempos trabajados en el experimento. 60x.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE GLUTAMATO (13 μM)

Para analizar el efecto del Glutamato como quimioatrayente sobre los trofozoítos de *N. fowleri* se trabajó el sistema de la cámara de Boyden utilizando como estímulo de migración una solución 13 μM de Glutamato, siguiendo una cinética de 1, 3 y 6 h.

Los resultados muestran que en el caso de la condición problema el número de trofozoítos presentes en la cámara inferior desde la primera hora post-interacción resultó mayor que en el control. El análisis estadístico mostró significancia hasta las 6 h post- incubación (Fig. 15).

En el experimento se observó que en el tiempo de 1 h post-interacción tanto en el filtro control como en el correspondiente al problema, la cantidad de trofozoítos adheridos a la membrana es similar en ambas condiciones; a diferencia de lo observado en los filtros correspondientes a las 6 h post-interacción en los que se encontró que en el caso

del filtro control aún se encuentran algunas amibas pasando a través de los poros del filtro y adheridos a la membrana, no así para el filtro correspondiente a la condición con Glutamato en el que en la membrana la cantidad de amibas es mínima, y por tanto prácticamente no se observan trofozoítos de *N. fowleri* (Fig.16).

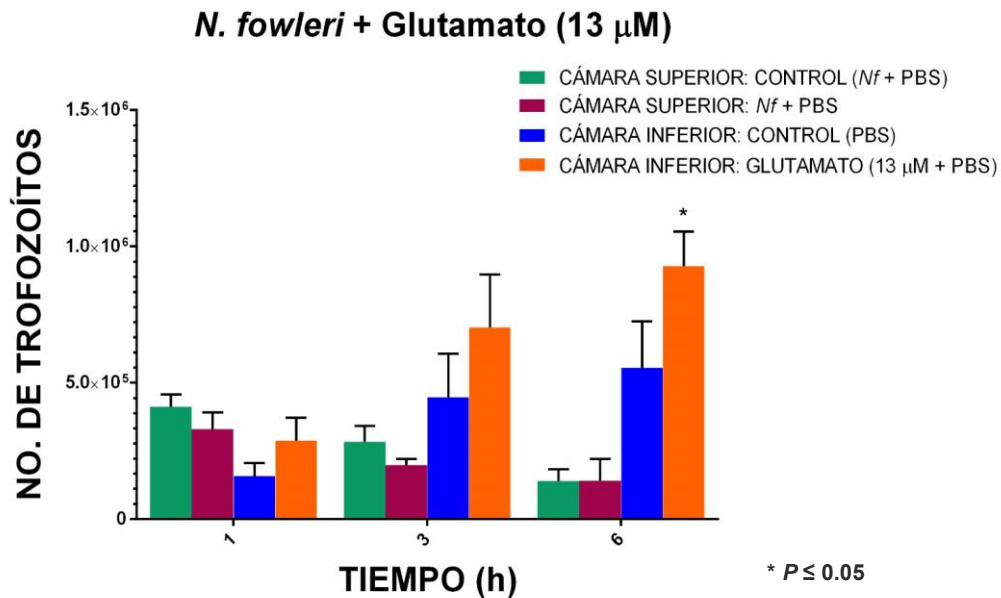


Fig 15. Ensayo de migración de trofozoítos de *N. fowleri* utilizando como estímulo de migración Glutamato (13 μ M). La respuesta de migración de los trofozoítos de *N. fowleri* se estudió en el sistema de la cámara de Boyden en presencia de Glutamato (13 μ M) en una cinética de 1, 3 y 6 h. Con este neurotransmisor se observó que la migración amibiana fue significativa solo a las 6 h post-interacción. La significancia

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE *N. fowleri* + Glutamato (13 μ M)

estadística fue de * $P \leq 0.05$.

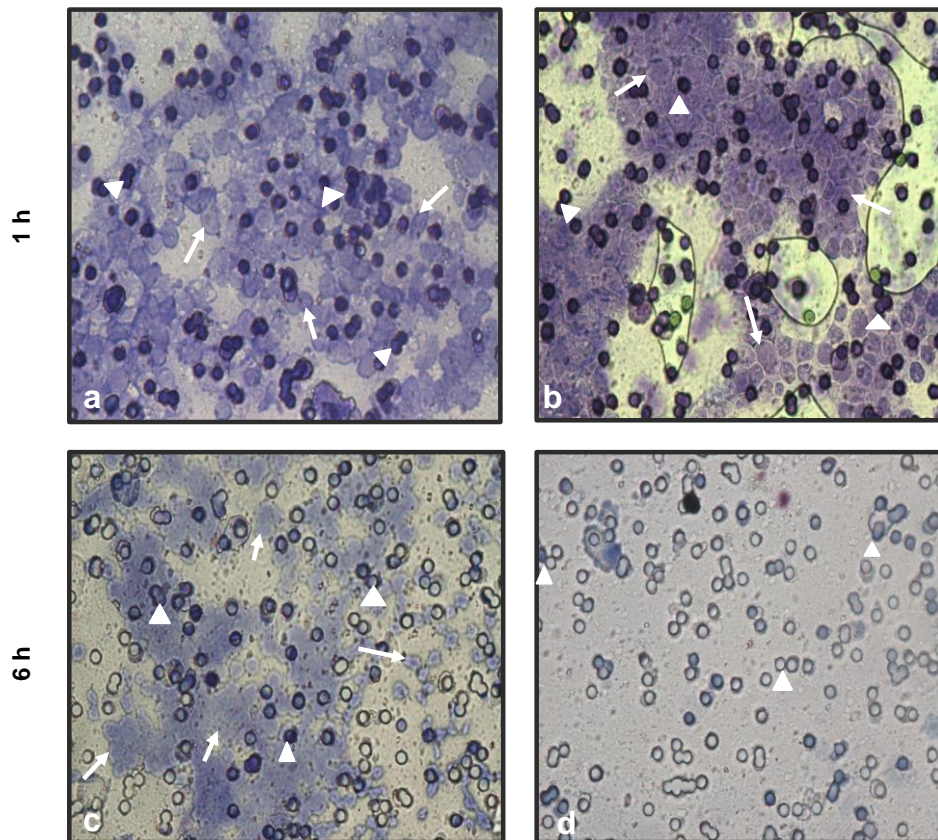


Fig 16. Membrana de PET correspondiente a los ensayos de migración con Glutamato (13 μM). En (a) y en (b) se muestran los filtros control y problema de 1 h respectivamente; se observó un número elevado de trofozoítos adheridos a las membranas (flechas) o pasando por los poros de 8 μm (cabezas de flecha). Para (c) del control y (d) del problema a las 6 h, se observó que en (c) aún se encuentran trofozoítos sobre la membrana, mientras que para (d) el número de amibas adheridas o atravesando el filtro es prácticamente nulo. 40x.

ENSAYO DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE TROFOZOITOS DE *N. fowleri* EN PRESENCIA DE GABA (6 μ M)

El crecimiento y viabilidad de los trofozoitos de *N. fowleri* en presencia del neurotransmisor GABA (6 μ M) fue evaluado siguiendo una cinética de 1, 3 y 6 h post-incubación. Los resultados obtenidos mostraron que durante la primera hora de incubación, la cantidad de trofozoitos tanto en la condición problema como en el control se mantiene semejante; no así para los tiempos de 3 y 6 h, en los que la cantidad de amibas se consideró que aumentó significativamente comparada con los controles (Fig. 17). En todos los casos la viabilidad, tanto de los problemas como de los controles, se mantuvo superior al 95% (Fig. 18).

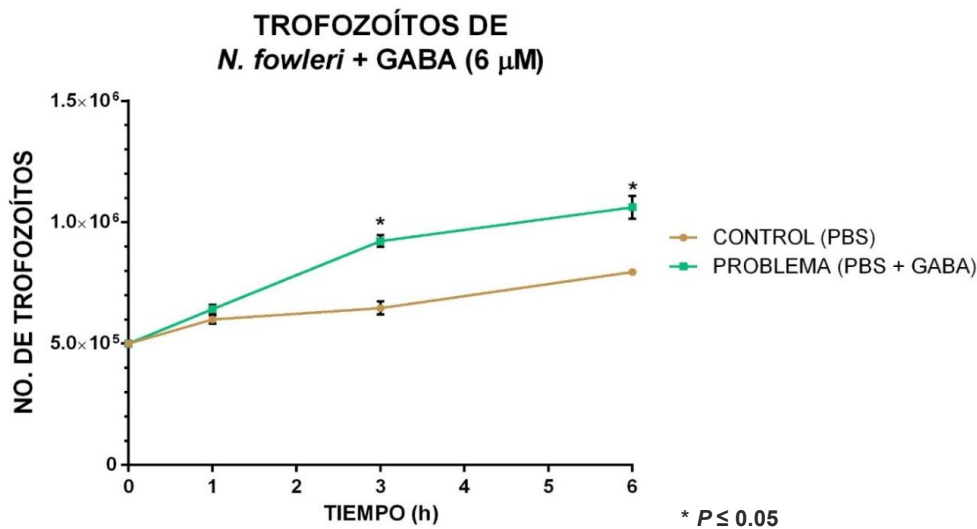


Fig 17. Curva de crecimiento de trofozoitos de *N. fowleri* en interacción con GABA (6 μ M). El gráfico muestra el número de trofozoitos de *N. fowleri* en una cinética de interacción a tiempos de 1, 3 y 6 h. Se observa que con este neurotransmisor el número de amibas es mayor con respecto al control y fue estadísticamente significativo a las 3 y 6 h post- incubación (* $P \leq 0.05$).

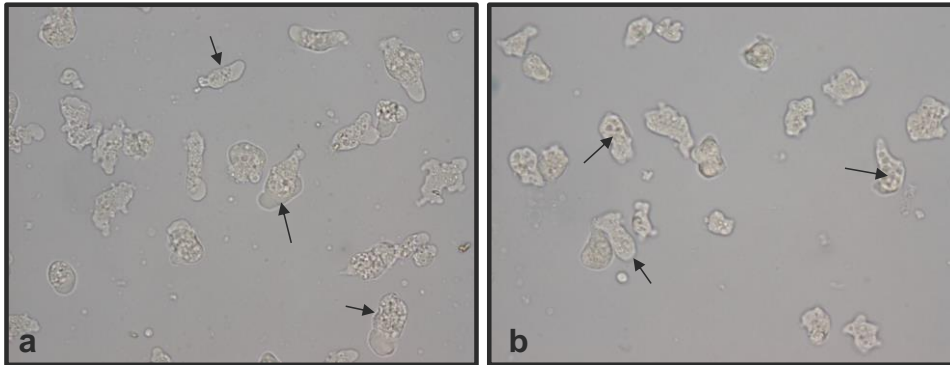


Fig 18. Ensayos de viabilidad correspondientes a la interacción de trofozoítos de *N. fowleri* con una solución de GABA (6 μ M). La viabilidad fue mayor al 95% en todas las condiciones trabajadas. En (a) correspondiente al problema se observaron a las amibas (flechas) mostrando una morfología característica de *N. fowleri* a las 6 h post-incubación; en (b) el control presentó las mismas condiciones. 60x.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO COMO QUIMIOTATRAYENTE GABA (6 μ M)

Los experimentos correspondientes a la migración con GABA se realizaron en las cámaras de Boyden siguiendo la misma cinética de interacción (1, 3 y 6 h). Los resultados obtenidos muestran que se encontró una respuesta de movimiento significativamente mayor hacia la cámara inferior en comparación del control, a partir de los tiempos de 3 y 6 h (Fig. 19). Los ensayos de viabilidad correspondientes a cada una de las cámaras, en todos los tiempos fue superior al 95%.

En las membranas correspondientes a los tiempos de 1 y 6 h post-interacción, se puede observar que con respecto al tiempo de 1 h, no existen diferencias considerables en la presencia de trofozoítos en ambas condiciones, no así para el tiempo de 6 h, en el que se observa una mínima presencia de amibas en el caso del filtro de la condición problema en comparación con la control (Fig. 20).

N. fowleri + GABA (6 μ M)

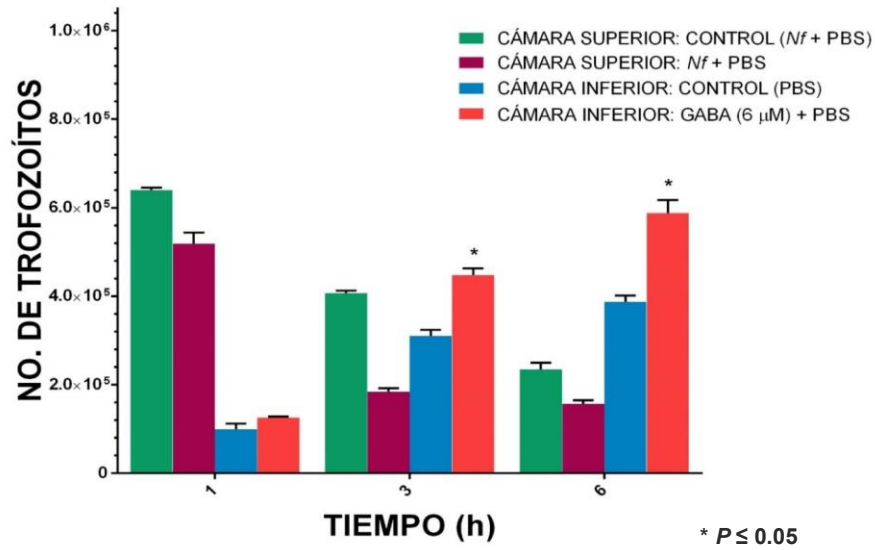


Fig 19. Ensayos de migración de *N. fowleri* utilizando como quimioatrayente GABA (6 μ M). Se llevó a cabo una cinética de 1, 3 y 6 h, en la que se observó que la migración amibiana fue significativa solo a las 3 y 6 h post-incubación en las cámaras de Boyden. La significancia estadística fue de $*P \leq 0.05$.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE *N. fowleri* + GABA (6 μM)

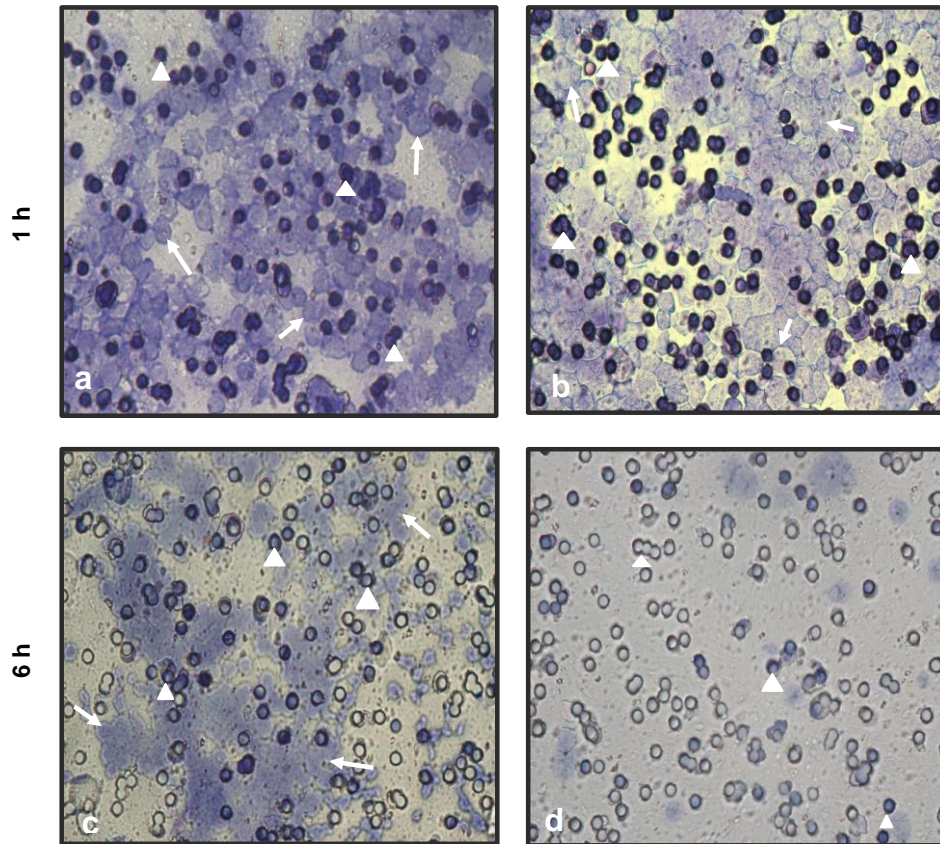


Fig 20. Membrana de PET correspondiente a los ensayos de migración con GABA (6 μM). En (a) control y (b) problema se observan al tiempo de 1 h gran cantidad de amibas sobre el filtro (flecha) o cruzando por los poros (cabezas de flecha). Mientras que en (c) control, a las 6 h post-interacción hay amibas adheridas o atravesando la membrana, no así en (d) problema, en donde prácticamente no se encuentran trofozoítos sobre esta.

CURVA DOSIS-RESPUESTA CORRESPONDIENTE A LA INTERACCIÓN DE TROFOZOITOS DE *N. fowleri* CON EL FACTOR DE CRECIMIENTO IGF-I

Para realizar los experimentos correspondientes al factor de crecimiento IGF-I, fue necesario elaborar una curva dosis-respuesta en la que se determinó la concentración necesaria para observar efecto del mismo sobre los trofozoítos de *N. fowleri*, de acuerdo a las concentraciones reportadas en la literatura (Vicario- Abejón et al., 2003).

Se partió de la concentración de 1 ng/ml de este factor y se trabajaron concentraciones crecientes de 10, 100 y 1000 ng/ml en interacción con el medio de Bactocasitona al 2% sin SFB. Cabe mencionar que los factores de crecimiento estudiados en este proyecto se trabajaron en el medio de cultivo en donde crecen las células a estudiar, tal como lo señalan las referencias correspondientes (Vicario- Abejón et al., 2003).

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que solo a partir de las concentraciones correspondientes a 100 y 1000 ng/ml se obtuvo una respuesta estadísticamente significativa en el aumento en el número de trofozoítos, y este fenómeno se presentó a partir de las 6 h post-incubación en la concentración de 1000 ng y a las 9 h para 100 y 1000 ng/ml. Cabe resaltar que para las concentraciones menores, no se obtuvo un crecimiento considerable en ninguno de los tiempos correspondientes a la cinética trabajada (Fig 21).

Se realizaron los ensayos de viabilidad en cada concentración y por cada uno de los tiempos trabajados. En todos los casos los resultados correspondieron a una viabilidad por arriba de 95%. En la Fig 22. se muestran las imágenes correspondientes al tiempo de 9 h y en cada una de las concentraciones señaladas, así como del experimento control.

N. fowleri + IGF- I

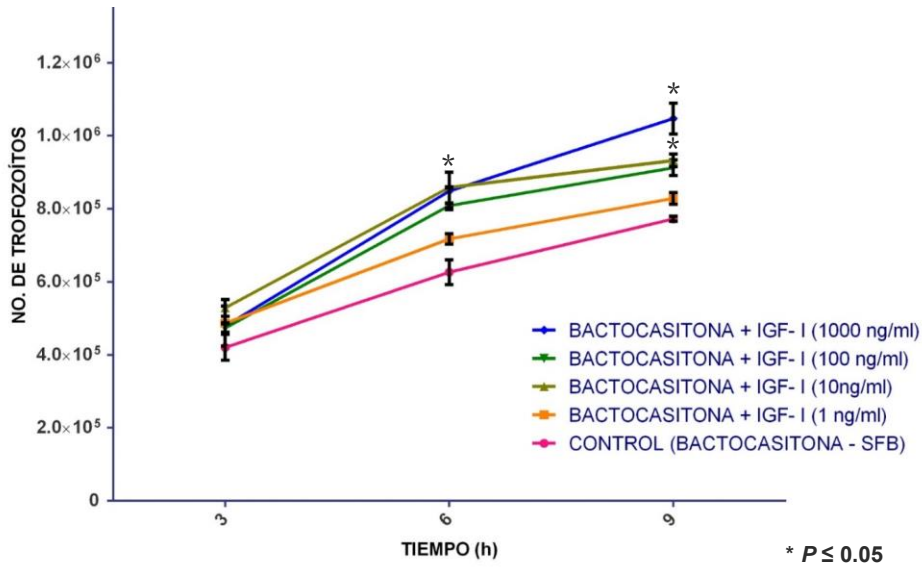


Fig 21. Curva Dosis-Respuesta de interacción entre trofozoítos de *N. fowleri* con el factor de crecimiento IGF-I. Gráfico que muestra el efecto en el crecimiento de los trofozoítos de *N. fowleri* al interactuar con dosis crecientes del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) de 1 hasta 1000 ng/ml, en una cinética de crecimiento de 3, 6 y 9 h. Se observa, que hasta las dosis de 100 y 1000 ng/ml se presentó una respuesta de crecimiento de los trofozoítos de *N. fowleri* de manera significativa en comparación con el control (* $P \leq 0.05$).

VIABILIDAD DE *N. fowleri* + IGF-I (1-1000 ng/ml)

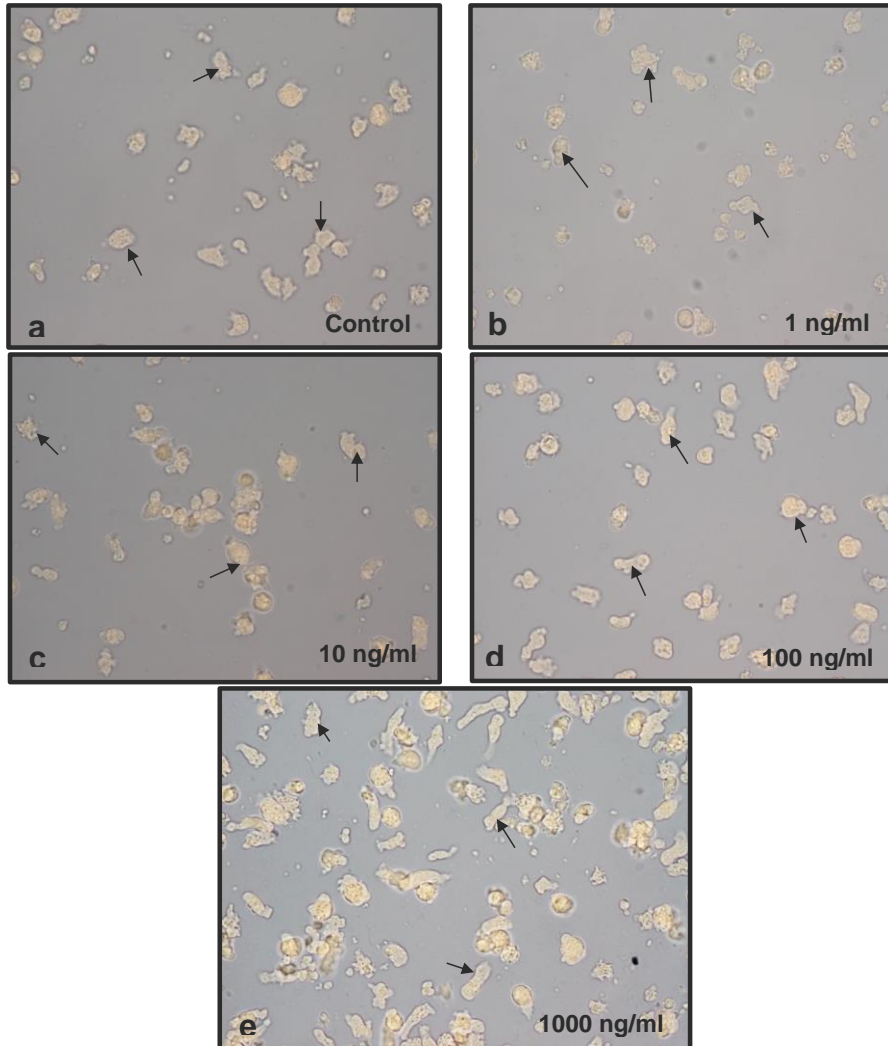


Fig 22. Ensayos de viabilidad correspondientes a la curva dosis-respuesta de interacción con IGF-I. Tiempo de 9 h post-incubación de trofozoítos de *N. fowleri* con dosis crecientes del factor IGF-I (1-1000 ng/ml). La incubación se realizó utilizando medio de Bactocasitona al 2% sin SFB, se observó que durante todos los tiempos y condiciones la viabilidad y morfología amibiana se mantuvo superior al 95%. 40x.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOITOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE IGF-I (1000 ng/ml)

En este ensayo se utilizó el sistema antes descrito de cámaras de Boyden, utilizando como estímulo de migración una solución de IGF-I (1000 ng/ml) disuelto en medio de Bactocasitona al 2% sin SFB en una cinética de 1, 3 y 6 h post-incubación.

En la Fig. 23 correspondiente a los resultados se observó que hasta las 6 h post-interacción con el IGF-I (1000 ng/ml) se obtiene una respuesta de migración considerada como estadísticamente significativa. Cabe resaltar, que durante los tiempos anteriores (1 y 3 h) la respuesta de migración no se modificó de manera importante respecto a la condición control, lo que nos indica que probablemente este factor no es un buen inductor de la migración amibiana en tiempos tempranos.

En la Fig. 24. se muestran las membranas de PET de los filtros utilizados en el desarrollo de este experimento en tiempos de 1 y 6 h

N. fowleri + IGF- I (1000 ng/ml)

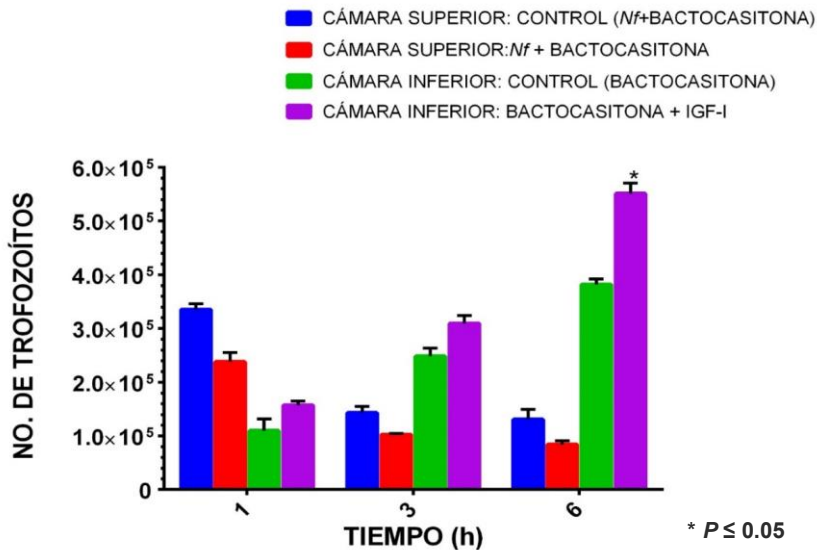


Fig 23. Ensayos de migración de trofozoitos de *N. fowleri* utilizando como quimioatrayente IGF-I (1000 ng/ml). En la figura se muestra el comportamiento en una cinética que corresponde a tiempos de 1, 3 y 6 h post-interacción en un sistema de cámaras de Boyden. Se observa que la respuesta de migración considerada

significativa es a las 6 h post-interacción y con dosis del IGF-I a 1000 ng/ml (* $P \leq 0.05$).

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE *N. fowleri* + IGF-I (1000 ng/ml)

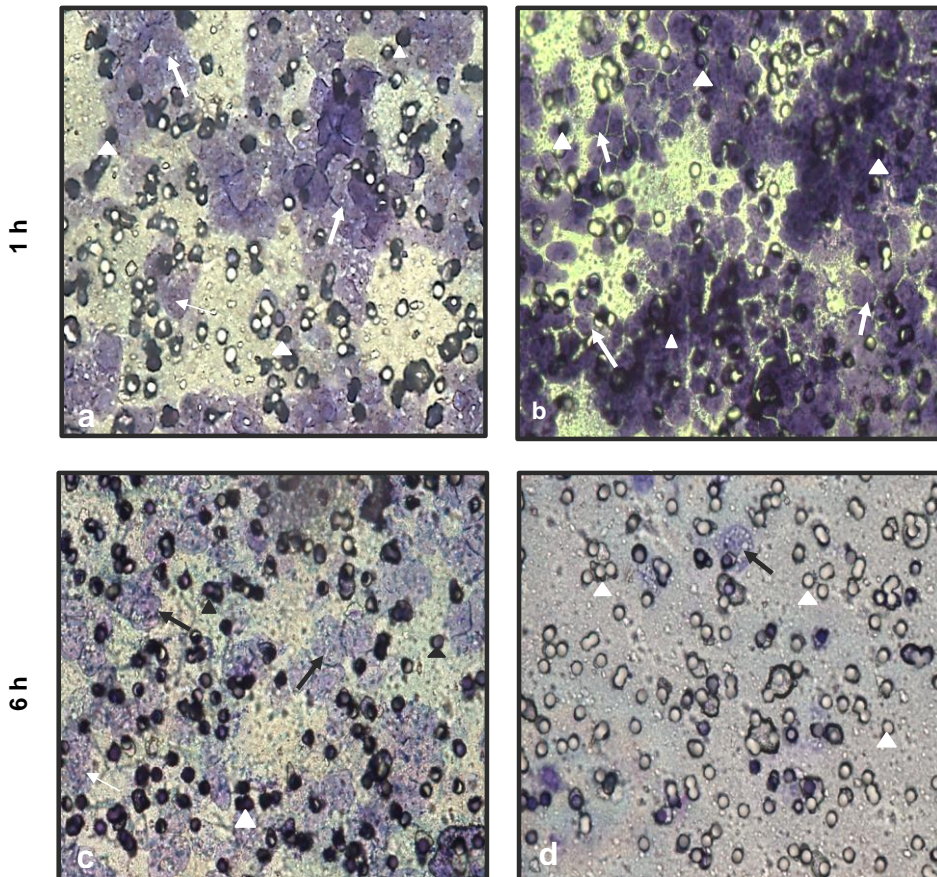


Fig 24. Membrana de PET correspondiente a los ensayos de migración con IGF-I (1000 ng/ml). Trofozoítos de *N. fowleri* en interacción de migración con IGF- I. En (a) y (b) se muestran las membranas correspondientes al tiempo de 1 h. Se observa un número importante de amibas sobre la membrana (flechas) o cruzando los poros (cabezas de flechas) sin diferencias entre la condición control (a) con respecto a la problema (b). En (c) y (d) las imágenes correspondientes a 6 h post-interacción, el control (c) muestra amibas aun adheridas a la membrana o cruzando por los poros en mayor cantidad que en (d) correspondiente al filtro de la condición problema. 40x.

CURVA DOSIS-RESPUESTA CORRESPONDIENTE A LA INTERACCIÓN DE TROFOZOITOS DE *N. fowleri* CON EL FACTOR DE CRECIMIENTO TGF- α (1000 ng/ml)

Se realizó un ensayo de curva de crecimiento utilizando diferentes dosis del factor TGF- α ; estas corresponden a 10, 100 y 1000 ng/ml, siguiendo una cinética correspondiente a 3, 6 y 9 h de co-incubación, el neuroquímico fue disuelto en medio de Bactocasitona al 2% sin SFB.

Los resultados obtenidos, se muestran en la Fig. 25. Las concentraciones en las que se puede considerar significativamente mayor el número de trofozoítos presentes respecto al control fue en las de 100 y 1000 ng/ml y únicamente en los tiempos de 9 h.

Se observó que a menor concentración del IGF- I la tendencia de la curva de crecimiento fue similar en todos los tiempos. Se realizaron los ensayos de viabilidad, los cuales fueron mayores al 95%, tal como se puede observar en la Fig. 26.

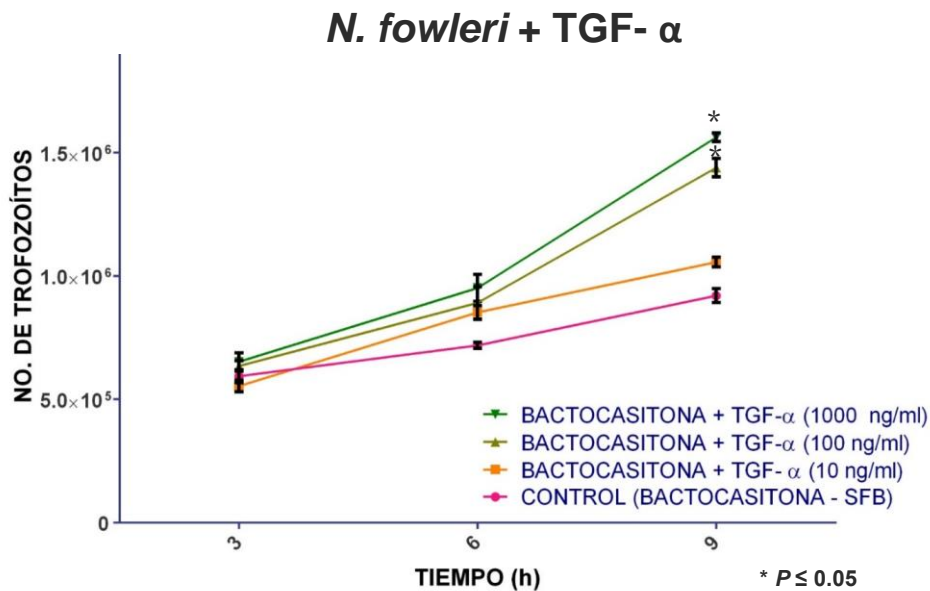


Fig 25. Curva de crecimiento dosis-respuesta de trofozoítos de *N. fowleri* utilizando el factor de crecimiento TGF- α . Respuesta dosis-dependiente del TGF- α con trofozoítos de *N. fowleri* co-incubados a 10, 100 y 1000 ng/ml (3, 6 y 9 h). Se puede observar que solo se encontró un crecimiento significativo respecto al control a las 9 h a concentraciones de 100 y 1000 ng/ml (* $P \leq 0.05$).

CURVA DOSIS RESPUESTA DE *N. fowleri* + TGF- α

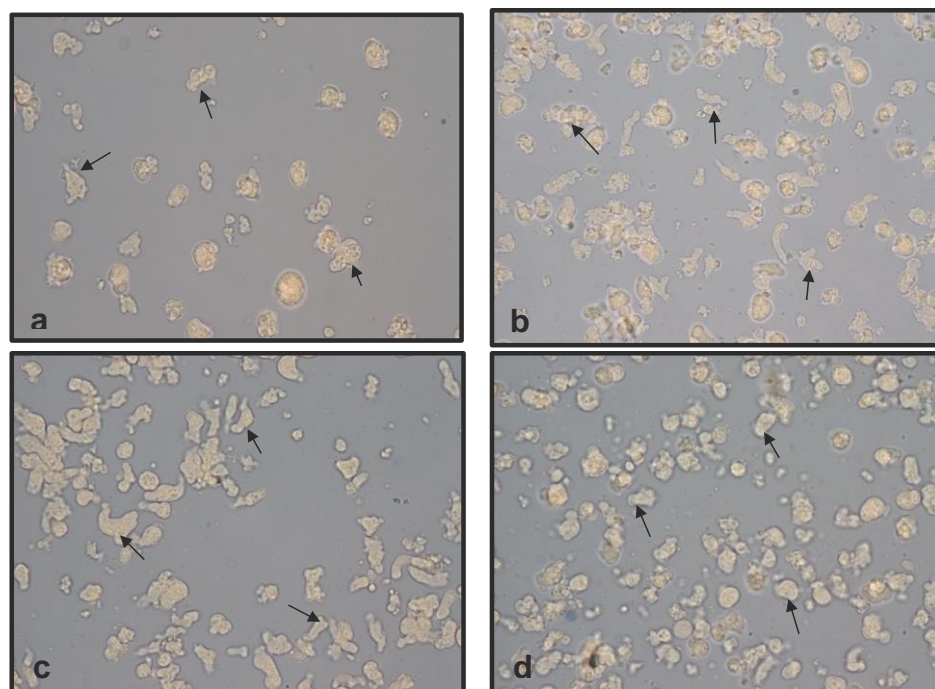
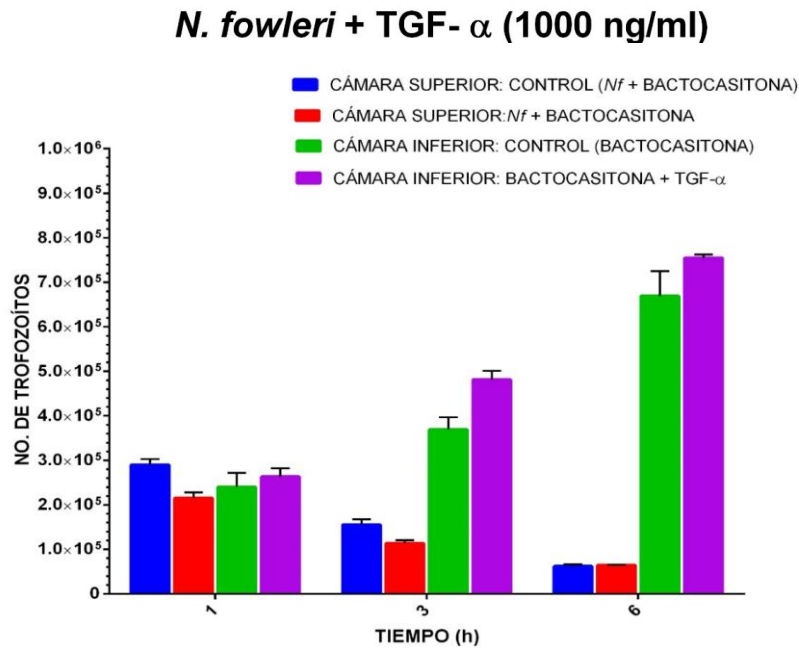


Fig 26. Ensayos de viabilidad utilizando dosis crecientes de TGF- α con trofozoítos de *N. fowleri*. Estas corresponden a 9 h post-incubación: (a) control, (b) 10 ng/ml, c) 100 ng/ml y d) 1000 ng/ml; la viabilidad fue superior al 95% durante todo el experimento y en todas las condiciones trabajadas. 40x.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE TROFOZOITOS DE *N. fowleri* UTILIZANDO COMO QUIMIOATRAYENTE TGF- α (1000 ng/ml)

Para realizar estos ensayos, se utilizó el mismo sistema de migración a base de cámaras de Boyden a partir de la concentración de 1000 ng/ml. Se encontró que al realizar el conteo del número de amibas presentes en la cámara inferior, en ninguno de los tiempos estudiados la respuesta de migración fue significativamente mayor en los problemas; lo que puede sugerir que el TGF- α no es un buen inductor de migración (en los tiempos y concentraciones trabajados) para *N. fowleri*.

En la Fig. 28, se presentan las membranas de los filtros utilizados en este experimento. Se puede observar que tanto en los casos de los controles como en la interacción con TGF- α , en los tiempos de 1 y 6 h, se encuentran imágenes similares que sugieren que las amibas siguen el mismo comportamiento de migración en ambas condiciones.



No hay resultados estadísticamente significativos

Fig 27. Ensayo de migración de trofozoítos de *N. fowleri* utilizando TGF- α (1000 ng/ml) como quimioatrayente. Resultados correspondientes a la interacción en una cinética de 1, 3 y 6 h. Se observa que en el caso de este factor, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en el número de trofozoítos en la cámara inferior de la condición problema respecto a la condición control.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE *N. fowleri* + TGF- α

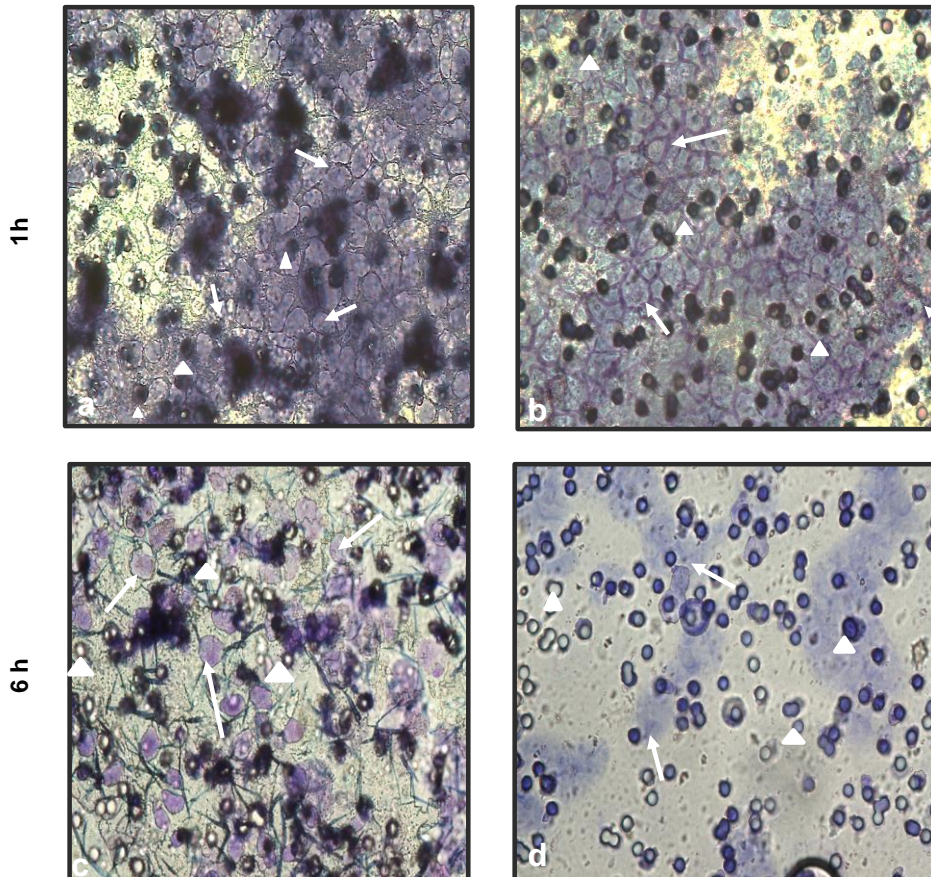


Fig 28. Membranas de filtro Millicel de 8 μ m de poro utilizadas en ensayos de migración con TGF- α . A tiempos de 1 h tanto en los filtros del control (a) como en el problema (b) son similares, habiendo una gran cantidad de estos adheridos a la membrana (flechas) o atravesando los poros (cabezas de flechas); a diferencia de (c) y (d) donde el control (c) al tiempo de 6 h post-interacción aún se observan trofozoitos adheridos a la membrana y cruzando los poros y no así para (d) el problema, en donde la cantidad de trofozoitos presente es mínima, aunque el conteo y análisis estadístico realizado, no demostró diferencias significativas entre estos. 40x.

DISCUSIÓN

Las amibas de vida libre son un grupo de protozoarios ubicuos, ampliamente distribuidos en la naturaleza; algunos de ellos asociados a infecciones que afectan principalmente al SNC en humanos y otros animales (Trabelsi et al., 2012). Debido a la habilidad que tienen estos microorganismos de subsistir en la naturaleza y ocasionalmente invadir a hospederos adoptando un comportamiento tipo parásito, se les ha llamado también como amibas anfitriónicas (Visvesvara et al., 2007).

Dentro de este grupo de microorganismos se encuentra *N. fowleri* el agente causal de una enfermedad fulminante capaz de afectar al hombre, conocida como meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), la cual se presenta principalmente en niños y adultos jóvenes con historia reciente de natación. La infección con este microorganismo se adquiere por la cavidad nasal, a partir de donde las amibas son capaces de migrar a través de células propias del neurepitelio olfatorio, como son las células sustentaculares o cruzando por los nervios olfatorios hasta llegar a la placa cribiforme, por la cual penetran para acceder dentro del espacio subaracnoideo, lo que les permite llegar al SNC vía el aparato olfatorio; estableciéndose inicialmente en los bulbos olfatorios, siendo este tejido el más afectado en el desarrollo de la enfermedad, en el caso del humano, al igual que en el modelo experimental del ratón (Visvesvara et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente, el sistema olfatorio es la vía de infección más importante para la MAP. La anatomía básica de este sistema está ampliamente estudiada en los mamíferos. Se conoce que la detección de las moléculas odoríferas inicialmente se realiza en el epitelio olfatorio de la cavidad nasal. Este tejido se encuentra formado por diversas estirpes celulares, entre las que se encuentran las neuronas sensoriales, células sustentaculares y células basales. El procesamiento final de los olores se lleva a cabo en una estructura conocida como el bulbo olfatorio principal, el cual recibe proyecciones de las neuronas sensoriales y se encarga de enviar la información hacia otros sitios del cerebro (Carleton et al., 2002).

El bulbo olfatorio, como tal, es una de las pocas estructuras dentro del SNC de los mamíferos que se encuentra en continua regeneración y recambio de las neuronas que lo conforman. Las células progenitoras de este sistema se originan en la zona

subventricular del ventrículo lateral de donde migran hasta alcanzar los bulbos olfatorios. Una vez ahí, los precursores celulares se establecen en las láminas granulares o periglomerulares en donde inician su diferenciación y proliferación hacia diferentes linajes de las neuronas locales.

En células eucariontes unicelulares, particularmente protozoarios tales como *Paramecium primaurelia* o *Dictyostelium discoideum*, los cuales son organismos que no producen patologías en el SNC, se ha demostrado que los neurotransmisores pueden ser empleados como moléculas reguladoras de la comunicación célula-célula, lo que sugiere que estos compuestos forman parte de la evolución a sistemas de comunicación tan complejos como los que se presentan dentro del SNC (Corrado et. al., 2002).

Actualmente, se desconoce si neuroquímicos presentes en el SNC interactúan con protozoarios que se establecen en cerebro, de manera particular en los bulbos olfatorios. Un estudio realizado por Zhao y colaboradores (2014), establece la importancia de la interacción de este tejido y su vascularización en el establecimiento de la malaria cerebral producida por *P. berghei* en el modelo del ratón; en donde se encontró que el bulbo olfatorio sirve como un ambiente propicio para el establecimiento de este parásito, al inicio de la malaria cerebral permitiendo la comunicación entre moléculas del cerebro y el sistema inmunológico.

De acuerdo al trabajo de Cervantes-Sandoval y colaboradores (2008), se encontró que en el caso de los trofozoítos de *N. fowleri*, éstos alcanzan los bulbos olfatorios alrededor de las 72 h post-institilación, sin que su presencia afecte la arquitectura normal del tejido cerebral o bien en este tiempo tampoco se presentaron células inflamatorias en el órgano. A las 96 h post-infección, se observa que el número de trofozoítos dentro de este tejido se incrementa considerablemente sin que esto genere daño aparente en el parénquima cerebral. Estos resultados sugirieron que a las 96 h post-institilación dentro de los bulbos olfatorios el número de amibas aumentó y que para esto se encuentren implicados factores propios del tejido cerebral. Por estas razones, en este trabajo, se estudió el papel de algunos de los neuroquímicos presentes en los bulbos olfatorios, los cuales probablemente interactúen con los trofozoítos en *N. fowleri*,

Comentado [F2]: Con??

Comentado [F3]: Quite "mayor importancia" importancia en base a que??
Quieres decir "mas abundantes"???? ponlo

ejerciendo alguna función dentro de los procesos de proliferación o migración que se han observado en el modelo *in vivo*.

En base a los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* crecidos en Bactocasitona al 2% con SFB o sin suero y con material de bulbos olfatorios frescos se observó que a partir de tiempos muy tempranos de incubación (3 h) hay mayor número de amibas que en todas las condiciones control utilizadas, lo cual sugiere fuertemente que en este tejido se encuentran sustancias que favorecen la proliferación de *N. fowleri*. Es importante señalar que el mayor crecimiento se obtuvo cuando las amibas permanecieron en contacto con el extracto de tejido del bulbo olfatorio incluso aún en ausencia de SFB.

Hasta la fecha, no se había realizado ningún estudio de este tipo, por lo que cabe señalar que a partir de este resultado se pudo establecer la importancia de determinar si los neurotransmisores purificados que se presentan en concentraciones elevadas en los bulbos olfatorios pueden generar un estímulo de proliferación.

Comentado [F4]: ???

La Taurina es un neuroquímico con funciones moduladoras y de señalización clave en esta zona del SNC, está involucrada en fenómenos de proliferación de células propias del bulbo y corteza olfatorios (Shivaraj et al., 2012), por lo que se decidió ver su efecto en concentraciones fisiológicas sobre los trofozoítos de *N. fowleri*. La taurina efectivamente estimuló la proliferación de las amibas. Cabe señalar, que con este neuroquímico es necesario elaborar curvas de crecimiento a mayores tiempos de co-incubación para determinar si esta respuesta de crecimiento se mantiene en tiempos prolongados, y para establecer en que punto de la cinética de crecimiento el estímulo deja de ser suficiente para inducir la proliferación amibiana.

Comentado [F5]: Cual??

El Glutamato es un neurotransmisor excitatorio del SNC que induce la proliferación de células progenitoras neuronales, principalmente de la zona subventricular, las cuales son las que dan origen a múltiples linajes celulares pertenecientes al bulbo olfatorio (Jansson et al., 2014). Además, hay evidencias que sugieren que también induce proliferación y supervivencia en parásitos como *Trypanosoma cruzi*, puesto que al utilizar antagonistas de sus receptores se observó una disminución en el proceso de metacicloogénesis y por lo tanto en su proliferación (Damasceno, 2014). Por otra parte,

Comentado [F6]: Es neurotransmisor?

se han relacionado enzimas involucradas en el metabolismo del Glutamato como son la GdhZ (Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD) en el proceso de regulación del ciclo celular y de la división celular de la α -proteobacteria *Caulobacter crescentus*, a partir de la cual se relacionó el proceso de proliferación celular adaptado a la disponibilidad de nutrientes en el medio, describiendo el mecanismo molecular que coordina la relación entre metabolismo y división celular, particularmente en los puntos de control en el ciclo celular (Beaufay et al., 2015). En este estudio observamos que el Glutamato, induce una proliferación significativa desde el inicio de la cinética (1 h) y esta tendencia se mantiene por todos los tiempos estudiados. Es posible sugerir que el Glutamato puede ser utilizado por los trofozoítos de *N. fowleri* como fuente de energía y a través de su metabolismo, participar en fenómenos de división celular que le pueden permitir, una vez que llegan a los bulbos olfatorios (ricos en este neuroquímico), aprovecharlo y por lo tanto proliferar de manera más efectiva en este tejido; de igual manera que con la Taurina, será interesante prolongar los períodos de incubación para conocer el tiempo en que la proliferación se detiene.

Por otra parte, GABA, considerado el mayor neurotransmisor de tipo inhibitorio dentro del SNC en mamíferos, se ha relacionado con la proliferación de células neuronales presentes a nivel de todo el sistema olfatorio y en particular dentro del bulbo olfatorio (Shaoyu et al., 2006). En microorganismos, GABA ha sido relacionado con fenómenos de diferenciación celular y de proliferación en parásitos, hongos y bacterias. En el caso de *D. discoideum*, se encontró que la presencia de GABA induce una rápida encapsulación de la amiba de manera indirecta, al estimular la liberación de AcbA, precursor del péptido señal SDF-2 (spore differentiation factor- 2), que se conoce que es indispensable para la generación de los cuerpos fructíferos de esta amiba de vida libre; así GABA le permitirá diferenciarse y sobrevivir en ambientes carentes de nutrientes. Además de que se conoce que GABA puede actuar en el mecanismo de la exposición de dominios de proteasa de la molécula de superficie TagC que sirve para procesar a AcbA extracelular y producir el péptido SDF-2, que finalmente causará la encapsulación (Anjard et al., 2006). En hongos actinomicetos como *Stagonospora nodorum*, la presencia de GABA se ha relacionado con la proliferación, puesto que al generar mutantes de la enzima que lo metaboliza resultó en cepas con poco

crecimiento, además de que son más susceptibles al estrés por ROS y su virulencia se ve disminuida (Mead et al., 2013).

En el caso de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, GABA se ha relacionado con variación en la virulencia de la cepa, así como en la producción de factores estimuladores de “quorum-sensing” (mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular). En este caso, las células involucradas producen y excretan sustancias que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva. Las bacterias usan los circuitos de comunicación de la percepción de quórum para procesos que incluyen simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, motilidad, esporulación y formación de biopelículas. Este fenómeno es el responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolle comportamientos sociales coordinados. También se ha relacionado a este neuroquímico en la modulación de enzimas involucradas en la respuesta a estrés oxidativo (Dagorn et al., 2013).

Comentado [F7]: interesante

Nuestros resultados al aplicar GABA a los trofozoítos de *N. fowleri* sugieren que éste compuesto en el caso de la ameba puede actuar como una molécula útil como fuente de energía, lo que le permite proliferar desde tiempos tempranos de incubación (3 h), al igual que el Glutamato pues este al ser metabolizado por la enzima Glutamato descarboxilasa (GAD) da origen a GABA. En este caso también será interesante observar el efecto de GABA en tiempos más prolongados y además, observar el efecto en la virulencia de trofozoítos de *N. fowleri* ya que, como se mencionó estos neurotransmisores pueden impactar en la virulencia de los microorganismos (Mead et al., 2013. Dagorn et al., 2013).

Los factores de crecimiento TGF- α e IGF-I objetos de este proyecto, están implicados en proliferación y diferenciación celular a nivel de bulbos olfatorios y del sistema olfatorio en general (Plendl, et al., 1999). Su relación con estos fenómenos en microorganismos o protozoarios parásitos no ha sido estudiada; sin embargo, se sabe que otros factores de crecimiento propios del SNC como el BDNF (Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro) participan en el desarrollo de infecciones como la malaria cerebral. Los resultados en este trabajo mostraron que ambos factores (TGF- α e IGF-I) fueron capaces de inducir la proliferación amebiana a concentraciones elevadas a las 6

Comentado [F8]: Este parafo tenia muchas palabras de mas

a 9 h. En reportes previos estos factores se aplicaron de forma simultanea para obtener respuestas de proliferación y migración en células y progenitores neuronales, por lo que es necesario evaluar estos factores en conjunto sobre las amibas y determinar si de esta manera el efecto resulta más evidente (Yan et al., 2001),

La migración de los trofozoítos de *N. fowleri*, se ha estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*. En el inicio del estudio de la MAP, el grupo de Martínez y colaboradores caracterizaron en el modelo del ratón, la ruta olfatoria como vía de entrada de la amiba hacia los bulbos olfatorios y posteriormente al SNC. En este trabajo señalaron que los trofozoítos son capaces de invadir las células sustentaculares y a partir de ellas penetrar hacia el resto del cerebro; además de que se estableció que la amiba es capaz de invadir cruzando por la vía de los axones de los plexos nerviosos olfatorios no mielinizados, lugar en donde se localizaron las amibas dentro de los espacios mesaxonales, sugiriendo que de esta manera, podría ser que *N. fowleri* aprovecha los neuroquímicos presentes en este tejido nervioso para migrar hacia sus células blanco (Martínez, 1973).

Comentado [F9]: Esto lo sugirió martinez?? Es lo quieres decir?

En el presente estudio, se probó la respuesta de migración de los trofozoítos de *N. fowleri* en co-incubación con neuroquímicos importantes presentes en los bulbos olfatorios. Para ello se utilizo la cámara de Boyden modificada de acuerdo a los trabajos realizados por Cline y colaboradores (1986) en donde demuestran mayor respuesta de migración, particularmente quimiotaxis (migración independiente de concentración). En varios estudios con trofozoítos de *N. fowleri* puestos a interactuar con extractos o monocapas de células B-103, provenientes de neuroblastoma de rata, en comparación con células Vero (riñón de mono verde) o de otros tipos celulares como células HeLa (carcinoma cervical humano) y Hep-2 (epitelioma de laringe humano) sugieren que es probable que los neuroquímicos presentes de manera característica en este tipo de líneas celulares pueden estar influenciando la respuesta de migración amibiana. Este efecto fue mayor en la línea celular B-103 con respecto a las otras estirpes celulares (Cline et al., 1986).

Comentado [F10]: Es correcto ¿

En los ensayos de migración realizados en este trabajo la Taurina indujo una respuesta de migración significativa de *N. fowleri* desde tiempos muy tempranos de interacción (1 h), lo que podría sugerir que *in vivo*, este compuesto favorece el movimiento en los.

Para confirmar este resultado, sería interesante utilizar el mismo sistema pero creciendo sobre la membrana del filtro Millicel en la cámara superior una monocapa de células de origen nervioso (neuroblastoma) que pueda generar un impedimento en el movimiento de la amiba lo que permitiría, además, determinar si se trata de migración de tipo quimioquinesis o quimiotaxis (movimiento direccionado dependiente de gradiente) y se podría valorar el daño a la monocapa y si la Taurina es capaz de permear la monocapa. Estos experimentos nos proporcionarían una aproximación más fisiológica a lo que ocurre en la enfermedad natural y podría asegurar de manera más clara el tipo de respuesta de migración que se presenta en el SNC, particularmente hacia los tejidos del sistema olfatorio.

Por otra parte, se estudió la migración de los trofozoítos en interacción con Glutamato, tomando en consideración los antecedentes de que este neurotransmisor genera respuestas de migración tanto en organismos procariontes como en eucariontes inferiores. Por ejemplo *Paramecium tetraurelia*, es atraído por el ácido L- glutámico (Glutamato) utilizando un mecanismo de hiperpolarización de membrana. En su ambiente natural, *P. tetraurelia* se alimenta de bacterias las cuales son capaces de liberar al ambiente Glutamato, de manera tal, que este aminoácido se convierte en una señal que le indica a este protozoo la presencia de una fuente de nutrientes cercana (Preston et al., 1988). En los ensayos de migración utilizando este neurotransmisor, se observó que éste es capaz de generar una respuesta significativa de movimiento hasta las 6 h post-incubación; esto sugiere que *N. fowleri* es capaz de responder al estímulo de migración de manera activa y probablemente de igual manera que *Paramecium* lo utiliza como una señal química que le indica la presencia de una fuente de nutrientes importante para su metabolismo. Sería importante determinar el comportamiento en la membrana de *N. fowleri* para conocer el mecanismo por el cual responde al Glutamato, determinando cambios en los potenciales de membrana o a través de la determinación de las concentraciones y los tiempos óptimos por los cuales se da esta respuesta. También sería interesante valorar la importancia de este neurotransmisor en la virulencia de *N. fowleri*.

Respecto al neuroquímico GABA, éste estimula la migración de *N. fowleri* de manera significativa a partir de las 3 h de interacción. La migración inducida por GABA se ha

estudiado con diferentes bacterias y parásitos. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se determinó la presencia de quimiorreceptores llamados PctC, altamente específicos por GABA, y que estos receptores, además, modulan un incremento de la virulencia. Estas funciones son importantes para la capacidad de la bacteria de establecerse en el hospedero infectado. Además, en esta bacteria se conocen otros dos quimiorreceptores con alta especificidad a este neurotransmisor (PctA y PctB) (Reyes-Darias et al., 2015).

En estudios con el protozoario *P. primaurelia*, se caracterizó la presencia de un sistema de moléculas de tipo gabaérgico (relacionadas a la síntesis, aprovechamiento y señalización de GABA), el cual es variable en su función y localización dependiendo del estado de madurez del protozoario (Corrado et al., 2002). Además, la relevancia en la migración con este neurotransmisor se ha estudiado en el comportamiento del nado en reversa, pues se ha demostrado que el bloqueo de un receptor de tipo metabotrópico similar a GABA_B presente en metazoarios, en el protozoario disminuye su velocidad de locomoción, éste actúa acoplado a un sistema de proteínas G y también se ha relacionado con la regulación del potencial de calcio dependiente de los canales en la membrana del ciliado de los cuales dependerá su movimiento (Ramoino et al., 2003).

Igualmente, se estudió la respuesta de migración de *N. fowleri* utilizando los factores de crecimiento IGF-1 y TGF- α presentes en los bulbos olfatorios. El IGF-I, es capaz de inducir migración hasta las 9 h de interacción y al igual que en los ensayos de proliferación, este resultado se observó a concentraciones elevadas. Por otro lado, el TGF- α no generó respuestas significativas en cuanto a la migración. Dado que se ha descrito que estos factores de crecimiento operan de forma sinérgica en el SNC y en estudios de precursores neuronales (células de la glía del sistema olfatorio) son capaces de aumentar tanto su proliferación y migración por el efecto de IGF-I y TGF- α , a través de sus receptores IGFR-I y EGFR, respectivamente y actuando a través de señalización por las vías de señalización de PI3-K y por la de las MAP-cinasas (Yan et al., 2001), se realizarán las combinaciones de estos factores para determinar si de esta manera presentan actividad sobre *N. fowleri*.

Tomando en cuenta todos estos resultados, podemos concluir que los neuroquímicos y factores de crecimiento utilizados en este proyecto nos permitieron determinar su

Comentado [F11]: ¿?? explicar

participación en la proliferación y migración de los trofozoítos de *N. fowleri*. Es necesario profundizar en la búsqueda de receptores a neurotransmisores o factores de crecimiento presentes en la amiba que sean homólogos en secuencia o estructura a los ya reportados en bacterias, parásitos y en la amiba de vida libre *D. discoideum* de la cual se tiene ventaja pues se cuenta con el genoma completo (Eichinger et al., 2005).

Comentado [F12]: Muchas palabras

CONCLUSIONES

- La co- incubación de trofozoítos de *Naegleria fowleri* con bulbos olfatorios frescos induce mayor proliferación de las amibas en comparación con las condiciones control de cultivo.
- Los neuroquímicos Taurina, Glutamato y GABA, estimulan la proliferación de los trofozoítos de *Naegleria fowleri*.
- Los factores de crecimiento, IGF-I y TGF- α , inducen proliferación de trofozoítos de *Naegleria fowleri*.
- Los neuroquímicos Taurina y GABA son capaces de estimular la migración de trofozoítos de *Naegleria fowleri* en un sistema *in vitro*.

PERSPECTIVAS

- Trabajar las combinaciones tanto de neuroquímicos (Glutamato, GABA y Taurina) como de los factores de crecimiento (IGF-I y TGF- α) para determinar su efecto en los fenómenos de proliferación y migración de trofozoítos de *Naegleria fowleri*.
- Determinar si existe cambio en la expresión o síntesis *de novo* en proteínas de *Naegleria fowleri* al interactuar con los neuroquímicos y factores de crecimiento propios del bulbo olfatorio.
- Determinar las vías de señalización que se estarían activando en la incubación de los trofozoítos de *Naegleria fowleri* con GABA y Glutamato.
- Realizar ensayos *in vivo* para estudiar el fenómeno de proliferación de los trofozoítos de *Naegleria fowleri* en los bulbos olfatorios en la MAP experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Anjard, C., Loomis, W.F. (2006). "GABA induces terminal differentiation of *Dictyostelium* through a GABAB receptor". *Development* 133, 2253-2261.
- Beaufay, F., Coppine, J., Mayard, A., Laloux, G., De Bolle, X., Hallez, R. (2015). "A NAD-dependent glutamate dehydrogenase coordinates metabolism with cell division in *Caulobacter crescentus*." *The EMBO Journal* (2015) 34: 1786-1800.
- Brinkley, C., Marciano-Cabral, F. (1992). "A method for assessing the migratory response of *Naegleria fowleri* utilizing [³H] uridine-labeled amoebae." *J Protozool* 39(2): 297-302.
- Carleton, A., Rochefort, C., Morante-Oria, J., Desmaisons, D., Vincent, J. D., Gheusi, G., Lledo P. M. (2002). "Making scents of olfactory neurogenesis." *J Physiol Paris* 96(1-2): 115-122.
- Carter, R. F. (1970). "Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it." *J Pathol* 100(4): 217-244.
- CDC. "*Naegleria fowleri* - Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM)." from <http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html#asterisk>.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., Tapia-Malagon, J.L., Pacheco-Yepetz, J., Silva-Olivares, A., Galindo-Gomez, S., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2007). "Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases

of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico." *Rev Invest Clin* 59(5): 342-347.

- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., Pacheco-Yepez, J., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2010). "Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates." *Parasitol Res* 106(3): 695-701.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2008). "Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis." *Parasitol Int* 57(3): 307-313.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2008). "Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion." *Microbiology* 154(Pt 12): 3895-3904.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., Meza-Cervantez, P., Arroyo, R., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2009). "*Naegleria fowleri* induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation." *Microbiology* 155(Pt 11): 3739-3747.
- Cline, M., Carchman R., Marciano-Cabral, F. (1986). "Movement of *Naegleria fowleri* stimulated by mammalian cells in vitro." *J Protozool* 33(1): 10-13.
- Corrado, M.U., Ognibene, M., Trielli, F., Politi, H., Passalacqua, M., Falugi, C. (2002). "Detection of molecules related to the GABAergic system in a single – cell eukaryote, *Paramecium primaurelia*". *Neuroscience letters* 329(1): 65-68
- Corona, R., Guerrero, R. G. P. (2011) "Nuevas neuronas para el olfato y la reproducción." *Revista Digital Universitaria* 12.

- Chávez-Munguía, B., Omana-Molina, M., Castanon, G., Bonilla, P., González-Lázaro, M., Hernández-Martínez, D., Salazar-Villatoro, L., Esparza-García, A., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G. (2009). "Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria sp.*" *J Eukaryot Microbiol* 56(1): 66-72.
- Chávez-Munguía, B., Villatoro, L. S., Omana-Molina, M., Rodriguez-Monroy, M. A., Segovia-Gamboa, N., Martínez-Palomo, A. (2014). "*Naegleria fowleri*: contact-dependent secretion of electron-dense granules (EDG)." *Exp Parasitol* 142: 1-6.
- Chu, D. M., Ferguson T. J., Marciano-Cabral, F. (2000). "Protein kinase activation and protein phosphorylation in *Naegleria fowleri* amoebae in response to normal human serum." *J Eukaryot Microbiol* 47(1): 40-47.
- Damasceno, FS., Barisón, MJ., Pral, EMF., Paes, LS., Silber, AM. (2014). "Memantine, an antagonist of the NMDA Glutamate Receptor, affects cell proliferation, differentiation and the intracellular cycle and induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*." *PLoS Negl Trop Dis* 8(2): e2717.
- da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B., Marciano-Cabral, F. (2009). "Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae." *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 251406.
- De Jonckheere, J. F. (2011). "Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*." *Infect Genet Evol* 11(7): 1520-1528.
- Debnath, A., Tunac, J. B., Galindo-Gomez, S., Silva-Olivares, A., Shibayama, M., McKerrow, J. H. (2012). "Corifungin, a new drug lead against *Naegleria*,

identified from a high-throughput screen." *Antimicrob Agents Chemother* 56(11): 5450-5457.

- Dunnebacke, T. H., Walen, K. H. (1999). "A protein from *Naegleria amoebae* causes apoptosis in chick embryo and CHO cells after they become confluent." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35(5): 252-261.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.A.,... Hauser, H. (2005). "The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*". *Nature* 435(7038): 43-57.
- Fouque, E., Trouilhe, M. C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M. H., Hechard, Y. (2012). "Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae." *Eukaryot Cell* 11(4): 382-387
- Fountain, S. (2010). "Neurotransmitter receptor homologues of *Dictyostelium discoideum*." *J Mol Neurosci* 41:263-266.
- Fritz-Laylin, L. K., Ginger, M. L., Walsh, C., Dawson, S. C., Fulton, C. (2011). "The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology." *Res Microbiol* 162(6): 607-618.
- González-Robles, A., Cristóbal-Ramos, A.R., González-Lazaro, M., Omana-Molina, M., Martínez-Palomo, A. (2009). "*Naegleria fowleri*: light and electron microscopy study of mitosis." *Exp Parasitol* 122(3): 212-217.
- Grate, I., Jr. (2006). "Primary amebic meningoencephalitis: a silent killer." *CJEM* 8(5): 365-369.
- Halasz, N., Shepherd, G. M. (1983). "Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb." *Neuroscience* 10(3): 579-619.

- Hassel, B., Dahlberg, D., Mariussen, E., Goverud, I.L., Antal, E.A., Tonjum, T., Maehlen, J. (2014). "Brain infection with *Staphylococcus aureus* leads to high extracellular levels of glutamate, aspartate, gamma-aminobutyric acid, and zinc." J Neurosci Res.
- Heggie, T. W. (2010). "Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters." Travel Med Infect Dis 8(4): 201-206.
- Herbert, R. P., Harris, J., Chong, K. P., Chapman, J., West, A. K., Chuah, M. I. (2012). "Cytokines and olfactory bulb microglia in response to bacterial challenge in the compromised primary olfactory pathway." J Neuroinflammation 9: 109.
- Huart, C., Rombaux, P., Hummel, T. (2013). "Plasticity of the human olfactory system: the olfactory bulb." Molecules 18(9): 11586-11600.
- Jamerson, M., da Rocha-Azevedo, B., Cabral, G. A., Marciano-Cabral, F. (2012). "Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins." Microbiology 158(Pt 3): 791-803.
- Jansson, C.L., Akerman, E.K. (2014). "The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells". J Neural Transm(2014) 121:819-836.
- Jarolim, K. L., McCosh J. K., Howard M. J., John, D. T. (2000). "A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice." J Parasitol 86(1): 50-55.
- Khan, N. A. (2007). "*Acanthamoeba* invasion of the central nervous system." Int J Parasitol 37(2): 131-138.

- Kiderlen, A. F., Laube, U. (2004). "*Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway." *Parasitol Res* 94(1): 49-52.
- Kiernan, J. A. (2009). *El Sistema Nervioso Humano. Una perspectiva anatómica.* 9ª edición. Editorial: Wolters Kluwer, Canada. pág. 259-264.
- Kim, J. H., Jung, S. Y., Lee, Y. J., Song, K. J., Kwon, D., Kim, K., Park, S., Im, K. I., Shin H. J. (2008). "Effect of therapeutic chemical agents in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*." *Antimicrob Agents Chemother* 52(11): 4010-4016.
- Lorenzo-Morales, J., Cabello-Vilchez, A. M., Martín-Navarro, C. M., Martínez-Carretero, E., Pinero, J. E., Valladares, B. (2013). "Is *Balamuthia mandrillaris* a public health concern worldwide?" *Trends Parasitol* 29(10): 483-488
- Marciano-Cabral, F. (1988). "Biology of *Naegleria spp.*" *Microbiol Rev* 52(1): 114-133.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. A. (2007). "The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection." *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(2): 243-259.
- Martínez, A. J., Nelson, E. C., Jones, M. M., Duma, R. J., Rosenblum, W. I. (1971). "Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study." *Lab Invest* 25(5): 465-475.
- Martínez, J., Duma, R. J., Nelson, E. C., Moretta, F. L. (1973). "Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study." *Lab Invest* 29(2): 121-133.

- Mead, O., Thyme, E., Solomon, PS. (2013). "Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*". PLoS ONE 8(11):e78368.
- Mikawa, S., Suzuki, M., Fujimoto, C., Sato, K. (2009). "Imaging of phosphatidylcholines in the adult rat brain using MALDI-TOF MS." Neuroscience Letters 451(1): 45-49.
- Miwa, T., Moriizumi, T., Horikawa, I., Uramoto, N., Ishimaru, T., Nishimura T., Furukawa, M. (2002). "Role of nerve growth factor in the olfactory system." Microsc Res Tech 58(3): 197-203.
- Oddó, D. (2006). "Infecciones por amebas de vida libre.: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos." Revista chilena de infectología 23(3): 200-214.
- Oh, Y. H., Jeong, S. R., Kim, J. H., Song, K. J., Kim, K., Park, S. , Sohn, S., Shin, H. J. (2005). "Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nfa1 antibody." Parasite Immunol 27(12): 453-459.
- Opperdoes, F. R., De Jonckheere J. F., Tielens, A. G. (2011). "*Naegleria gruberi* metabolism." *Int J Parasitol* 41(9): 915-924.
- Plendl, J, Sinowatz, F. (1998). "Glycobiology of the olfactory system." *Acta Anat (Basel)* 161(1-4): 234-253.
- Plendl, J., Stierstorfer B., Sinowatz F. (1999). "Growth factors and their receptors in the olfactory system." *Anat Histol Embryol* 28(2): 73-79.

- Preston, R., Usherwood, N.R. (1988). "L-Glutamate-induced membrane hyperpolarization and behavioural responses in *Paramecium tetraurelia*". J Comp Physiol A 164:75-82.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A., O McNamara, J., Williams, M. (2001). "The Olfactory Epithelium and Olfactory Receptor Neurons." Neuroscience. S. Associates.
- Ramoino, P., Fronte, P., Beltrame, F., Diaspro, A., Fato, M., Raiteri, L., Stigliani, S., Usai, C. (2003). "Swimming behavior regulation by GABA_B receptors in *Paramecium*." Experimental cell research 291(13): 398-405.
- Reyes-Darias, J., Vanina, M., Rico-Jiménez, A., Corral-Lugo, O., Juárez-Hernández, D. (2015). "Specific gamma-aminobutyrate chemotaxis in pseudomonads with different lifestyle." Molecular microbiology (2015).
- Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R. (2004). "Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice." Parasitol Res 94(1): 31-36.
- Serrano-Luna, J., Cervantes-Sandoval, I., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2007). "A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*." J Eukaryot Microbiol 54(5): 411-417.
- Shaoyu, G., Eyleen, L.K., Yasuji, K.G. Hongjun, S.G. (2006). "GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain". Nature 439-7076(2006):589-593.
- Shepherd, G., Wei, M. C., Greer, R., Charles, A. (2014). The Synaptic Organization of the Brain. Olfactory Bulb. O. U. Press.

- Shivarah, M.C., Low, M.G., Ryu, J.R., Zhao, X. (2012). Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain. PLoS ONE 7(8):e42935.
- Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Navarro-Garcia, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi V., Serrano-Luna, J. (2013). "Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*." Microbiology 159(Pt 2): 392-401.
- Shibayama, M., Serrano-Luna, J., Rojas-Hernandez, S., Campos-Rodriguez, R., Tsutsumi, V. (2003). "Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I." Can J Microbiol 49(3): 164-170.
- Sjölander, H., Jonsson, A.-B. (2010). "Olfactory nerve—A novel invasion route of *Neisseria meningitidis* to reach the meninges." PloS one 5(11): e14034.
- Sohn, H. J., Kim, J. H., Shin, M. H., Song, K. J., H. J. (2010). "The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*." Parasitol Res 106(4): 917-924.
- Song, K. J., Song, K. H., Kim, J. H., Sohn, H. J., Lee, Y. J., Park, C. E., Shin, H. J. (2008). "Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and in vitro cytotoxicity." Parasitol Res 103(2): 313-317.
- St John, J. A., Ekberg, J. A., Dando, S. J., Meedeniya, A. C., Horton, R. E., Batzloff, M., Owen, S. J., Holt, S., Peak, I. R., Ulett, G. C., Mackay-Sim, A., Beacham, I. R. (2014). "*Burkholderia pseudomallei* penetrates the brain via destruction of the olfactory and trigeminal nerves: implications for the pathogenesis of neurological melioidosis." MBio 5(2): e00025.

- Tiewcharoen, S., Malainual, N., Junnu, V., Chetanachan, P., Rabablert, J. (2008). "Cytopathogenesis of *Naegleria fowleri* Thai strains for cultured human neuroblastoma cells." *Parasitol Res* 102: 997-1000.
- Toney, D. M., Marciano-Cabral, F. (1992). "Alterations in protein expression and complement resistance of pathogenic *Naegleria* amoebae." *Infect Immun* 60(7): 2784-2790.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A. (2012). "Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review." *Pathol Biol (Paris)* 60(6): 399-405.
- Vicario-Abejon, C., Yusta-Boyo, M. J., Fernández-Moreno, C., de Pablo, F. (2003). "Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia." *J Neurosci* 23(3): 895-906.
- Viljetic, B., Degmecic, I. V., Krajina, V., Bogdanovic, T., Mojsovic-Cuic, A., Dikic, D., Vajn, K., Schnaar, R. L., Heffer, M. (2011). "Distribution of Major Brain Gangliosides in Olfactory Tract of Frogs." *Collegium Antropologicum* 35: 121-126.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L. (2007). "Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*." *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(1): 1-26.
- Whitman, M.C., Greer, C.A. (2009) "Adult neurogenesis and the olfactory system". *Progress in Neurobiology* 89(2009): 162-175.

- Yan, H., Bunge, B.M., Wood, P.M., Plant, W.G. (2001). "Mitogenic Response of Adult Rat Olfactory Ensheathing Glia to Four Growth Factors". *Glia* 33:334-342.
- Young, J. D., Lowrey, D. M. (1989). "Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic amoeboid flagellate *Naegleria fowleri*." *J Biol Chem* 264(2): 1077-1083.
- Zhao, H., Aoshi, T., Kawai, S., Mori, Y., Konishi, A., Ozkan, M., Fujita, Y., Haseda, Y., Shimizu, M., Kohyama, M., Kobiyama, K., Eto, K., Nabekura, J., Horii, T., Ishino, T., Yuda, M., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., Kinoshita, M., Tohyama, K., Yoshioka, Y., Ishii, K. J., Coban, C. (2014). "Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria." *Cell Host Microbe* 15(5): 551-563.
- Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S. J., Luskin, M. B. (1998). "Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb." *Mol Cell Neurosci* 11(4): 234-245.
- Zysset-Burri, D. C., Muller, N., Beuret, C., Heller, M., Schurch, N., Gottstein, B., Wittwer, M. (2014). "Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*." *BMC Genomics* 15(1): 496