



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

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

Título de la tesis:

**“Identificación y caracterización de la proteína
Atg8 durante la autofagia en trofozoítos de
Naegleria gruberi”**

Tesis que presenta:

M. en C. Roberto Cárdenas Zúñiga

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

En la especialidad de:

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de tesis:

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los apoyos económicos brindados durante el desarrollo de este trabajo, debido a que se contó con el apoyo de la beca de Doctorado (Número de CVU 370537) y con el apoyo del fondo SEP-CONACYT 237523.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas y la asesoría de los Drs.: Dra. Virginia Sánchez Monroy, Dra. Patricia Talamás Rohana, Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi y Dr. José de Jesús Serrano Luna, a quienes también agradezco sus recomendaciones y apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Generalidades.....	9
1.2 Morfología y ciclo de vida.....	10
1.3 Fuentes de aislamiento y cultivo.....	11
1.4 Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP).....	13
1.4.1 Epidemiología.....	13
1.4.1.1 Epidemiología en México.....	14
1.4.2 Fisiopatología, características clínicas, diagnóstico y tratamiento.....	15
1.5 <i>Naegleria gruberi</i>	16
1.5.1 Descubrimiento e historia.....	16
1.5.2 Cambios de fase en <i>N. gruberi</i>	17
1.6 Autofagia.....	21
1.6.1 Generalidades.....	21
1.6.2 Historia de la autofagia.....	21
1.6.3 Mecanismo molecular de la autofagia.....	22
1.6.3.1 Inducción de la autofagia.....	24
1.6.3.2 Selección del contenido.....	25
1.6.3.3 Nucleación de la vesícula.....	26
1.6.3.4 Expansión vesicular.....	27
1.6.3.5 Reciclaje de la maquinaria Atg.....	29
1.6.3.6 Entrada y degradación de la vesícula.....	29
1.6.4 Autofagia en protozoarios.....	30
1.7 Antecedentes directos.....	32
2 JUSTIFICACIÓN.....	35

3 HIPÓTESIS.....	36
4 OBJETIVOS.....	37
4.1 Objetivo general.....	37
4.2 Objetivos particulares.....	37
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1 Cultivo de <i>N. gruberi</i>.....	38
5.2 Interacción con rapamicina, curva de crecimiento y ensayos de viabilidad.....	38
5.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	38
5.4 Marcaje con LysoTracker.....	39
5.5 Búsqueda de las secuencias homólogas de Atg8.....	40
5.6 Expresión relativa del mensajero de <i>atg8</i>.....	40
5.6.1 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.....	41
5.6.2 Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	42
5.7 Producción de la proteína recombinante Atg8 de <i>N. gruberi</i> (NgAtg8).....	42
5.7.1 Amplificación del inserto.....	44
5.7.2 Inserción.....	44
5.7.3 Transformación.....	45
5.7.4 Secuenciación del plásmido recombinante.....	45
5.7.5 Expresión de la proteína recombinante.....	46
5.7.6 Purificación de la proteína recombinante.....	47
5.8 Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante.....	47
5.9 Ensayos de Western-blot para la identificación de la proteína recombinante.....	48
5.10 Inducción del enquistamiento.....	48
5.11 Localización celular de Atg8 por microscopía confocal.....	49
5.12 Localización celular de Atg8 por MET.....	49
6 RESULTADOS.....	51

6.1 Ensayos de viabilidad y curva de crecimiento en presencia de rapamicina.....	51
6.2 Cambios ultraestructurales inducidos por la rapamicina.....	53
6.3 Marcaje con LysoTracker de trofozoítos tratados con rapamicina.....	54
6.4 Selección, descripción y análisis <i>in silico</i> de la proteína Atg8 en <i>N. gruberi</i>.....	57
6.5 Expresión relativa del mensajero de <i>ngatg8</i>.....	60
6.6 Obtención de la proteína recombinante NgAtg8 y producción de anticuerpos contra ésta.....	61
6.7 Localización celular de NgAtg8 durante la inducción con rapamicina.....	65
6.8 Localización celular de NgAtg8 durante el enquistamiento.....	68
7 DISCUSIÓN.....	71
8 CONCLUSIÓN.....	75
9 PERSPECTIVAS.....	76
10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i>.....	12
2 Número de reportes de meningoencefalitis causadas por <i>N. fowleri</i> alrededor del mundo.....	14
3 Sección transversal de un flagelo de <i>N. gruberi</i>.....	18
4 Inducción de múltiples flagelos por choque térmico en <i>N. gruberi</i>.....	19
5 Quiste de <i>N. gruberi</i>.....	20
6 Variantes de la vía autofágica.....	23
7 Regulación negativa de la autofagia mediada por TOR.....	26
8 Representación de la vía Cvt y de la vía autofágica en <i>S. cerevisiae</i>.....	27
9 Esquematización de los mecanismos de marcaje del autofagosoma durante la autofagia.....	28
10 Esquema del vector pET100/D-TOPO.....	43
11 Ensayos de viabilidad en presencia de rapamicina.....	51
12 Curva de crecimiento en presencia de rapamicina.....	52
13 Cambios ultraestructurales inducidos por la rapamicina.....	53
14 Acidificación vacuolar de los trofozoítos tratados con rapamicina.....	56
15 Análisis <i>in silico</i> de NgAtg8.....	59

16 Expresión relativa del mensajero de <i>ngatg8</i> durante la incubación con rapamicina.....	60
17 Clonación del gen <i>ngatg8</i>.....	62
18 Purificación de la proteína recombinante NgAtg8 y producción de anticuerpos policlonales.....	64
19 Localización celular de NgAtg8 en trofozoítos inducidos con rapamicina.....	67
20 Detección de NgAtg8 durante el enquistamiento por microscopía confocal.....	69
21 Localización de NgAtg8 durante el enquistamiento por MET.....	70

RESUMEN

Los miembros del género *Naegleria* pertenecen al grupo de las amibas de vida libre, de los cuales la única especie patógena para el humano descrita hasta la fecha es *Naegleria fowleri*. Sin embargo, el genoma de esta especie aún no ha sido descrito, por lo que comúnmente se utiliza a la especie no patógena *Naegleria gruberi* para describir las vías metabólicas, celulares y moleculares en este género. Por otro lado, ciertos mecanismos como la autofagia aún no han sido caracterizados en *N. gruberi*. La autofagia es un fenómeno que se ha visto implicado en diferentes procesos celulares en los protozoarios, incluyendo el reciclaje de organelos innecesarios, el desarrollo y la diferenciación celular. En este trabajo caracterizamos la autofagia en *N. gruberi* utilizando un inductor específico, rapamicina. Mediante análisis ultraestructural se observó la formación de vacuolas autofágicas en los trofozoítos tratados con rapamicina, empleando qRT-PCR se demostró la sobreexpresión del mensajero de *atg8* y utilizando LysoTracker se detectó un aumento en la acidificación vacuolar de las amibas inducidas a autofagia. Además, para una mejor caracterización de este fenómeno, se obtuvieron anticuerpos contra la proteína recombinante del marcador de autofagia Atg8 de *N. gruberi* (NgAtg8). Con estos anticuerpos se realizaron ensayos de inmunomarcaje, donde se detectó la marca de Atg8 en vacuolas presentes en el citoplasma de trofozoítos inducidos con rapamicina e inducidos a enquistamiento. En conclusión, *N. gruberi* posee un homólogo de la proteína Atg8 que se sobre-expresa durante el mecanismo de autofagia inducido farmacológicamente con rapamicina y también durante el enquistamiento de esta amiba de vida libre.

ABSTRACT

Members of the *Naegleria* genus are free-living amoebae. The only pathogenic specie described to date for human beings is *Naegleria fowleri*. However, the complete genome of this specie has not been reported; therefore, the non-pathogenic *Naegleria gruberi* is commonly employed to describe some metabolic and molecular pathways in this genus. Nonetheless, certain mechanisms, such as autophagy, have not been characterized in *N. gruberi*. Autophagy is involved in different cellular processes of some protozoa, including the recycling of unnecessary organelles, cell development and differentiation. In the present work, we characterized autophagy in *N. gruberi* using rapamycin as specific inducer. The formation of autophagic vacuoles in treated trophozoites was observed using transmission electron microscopy. The overexpression of the *atg8* gene was evaluated by real time quantitative PCR. Additionally, by confocal microscopy we detected an increase in the vacuolar acidification of treated amoebae using LysoTracker Red. Finally, to improve the characterization of this event we produced polyclonal antibodies against the recombinant protein of the autophagy marker Atg8 of *N. gruberi* (NgAtg8). Using these antibodies, we identify the Atg8 signal in the cytoplasm of *N. gruberi* trophozoites induced with rapamycin and even in amoebae induced to encystation. In conclusion, *N. gruberi* possess an Atg8 protein homolog that is over-expressed during the autophagic mechanism induced by rapamycin and also during encystation of this free-living amoeba.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El género *Naegleria* pertenece al grupo de las amibas de vida libre, las cuales pueden vivir libremente en el medio ambiente y se caracterizan por tener una distribución cosmopolita. Uno de los rasgos más distintivo de estos protozoarios es que poseen una fase flagelar [1-3]. El estudio del género *Naegleria* se ha convertido en un tema de gran interés médico desde que se reportó que *N. fowleri*, es patógena para el humano; produciendo una enfermedad aguda y fulminante del sistema nervioso central (SNC) de pacientes sanos llamada meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) [4]. *N. fowleri* es considerado un microorganismo anfizóico debido a que es capaz de completar su ciclo de vida en el medio ambiente sin involucrar a otros organismos (exozóico) [5]. Sin embargo, en algunas ocasiones y por razones que hasta el momento han sido poco estudiadas, es capaz de invadir a un hospedero (endozóico) y ocasionarle la MAP. Este microorganismo aerobio es capaz de soportar altas temperaturas (termófilo), lo cual le permite sobrevivir durante los meses más cálidos del año en diversos cuerpos de agua dulce y en el suelo [6-8].

Naegleria pertenece al reino de los protistas y las especies que se conocen han sido descritas tomando en cuenta diversos parámetros como son: la morfología del quiste, la tolerancia a la temperatura, su patogenicidad, algunos criterios inmunológicos y patrones enzimáticos [8-12]. Actualmente se conocen más de 30 especies descritas en base en las secuencias de DNA ribosomal 5.8S [13]. Dentro de las especies de *Naegleria* se encuentran: *N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. lovaniensis*, *N. gruberi* y *N. jadini*, por mencionar algunas, de las cuales solo *N. fowleri* ha sido descrita en numerosos casos como patógena para el humano, aunque otras especies han demostrado ser capaces de causar infecciones en ratones después de ser inoculados por vía intranasal e intracerebral [7].

1.2 Morfología y ciclo de vida

Naegleria presenta tres distintos estadios en su ciclo de vida (Fig. 1), el trofozoíto, el quiste y el flagelado. El trofozoíto, el cual mide alrededor de 15-25 μm de diámetro, presenta una morfología típica de una célula eucarionte [14, 15], posee una membrana celular formada por una bicapa lipídica. Posee un núcleo muy prominente, el cual contiene un nucléolo conspicuo, además se puede apreciar una doble envoltura nuclear con varios poros nucleares. Se han identificado estructuras del citoesqueleto de apariencia filamentosa similar a microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina, estos últimos observados frecuentemente en la periferia del citoplasma [16]. El trofozoíto es la fase en la que la amiba se alimenta y se divide, esta división se lleva a cabo mediante promitosis [17], una variante primitiva de la mitosis presente en algunos protozoarios, en donde la membrana nuclear permanece intacta durante la cariocinesis [18]. Además, el trofozoíto muestra una motilidad muy activa mediante prolongaciones o proyecciones citoplasmáticas de aspecto hialino llamados pseudópodos [19]. En el citoplasma se pueden apreciar un gran número de vacuolas, un retículo endoplásmico liso y rugoso con una gran cantidad de ribosomas, además de un alto contenido de mitocondrias dispersas en todo el citoplasma [7, 8]. También se ha reportado la presencia de lisosomas mediante la detección de la actividad de fosfatasa ácida en pequeñas estructuras intracelulares [20].

Cuando cambian las concentraciones de sales o nutrientes en el medio de cultivo, el trofozoíto puede transformarse a la fase de flagelado [14]. Esta fase tiene un diámetro de entre 10-16 μm y se considera que durante esta estadio el protozoario no se divide ni se alimenta [21]. La transformación a la fase flagelar involucra un cambio bioquímico y estructural complejo, en donde se sintetizan organelos de locomoción flagelar. El proceso dura aproximadamente 2 h y a nivel ultraestructural se pueden identificar cambios tales como la disminución del número de vacuolas citoplasmáticas y la aparición de un cuerpo basal flagelar [22]. Se considera que la fase de flagelado se desarrolla con la finalidad de que la amiba pueda movilizarse

rápidamente en búsqueda de ambientes con condiciones más favorables para su desarrollo [8].

El trofozoíto puede transformarse a la fase de resistencia cuando las condiciones de crecimiento son adversas y la falta de nutrientes es prolongada [23]. El quiste generalmente es esférico y presenta una pared compuesta por celulosa, además contiene poros, los cuales difícilmente pueden observarse mediante microscopía de luz [24]. Ésta es la fase más pequeña, con un diámetro aproximado de 8-10 μm , pero conserva en su citoplasma el mismo contenido de organelos que el trofozoíto; mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso, lisosomas y un núcleo con un nucléolo prominente [5, 7, 8].

1.3 Fuentes de aislamiento y cultivo

Las amibas del género *Naegleria* se encuentran distribuidas en todo el mundo y han sido aisladas de muestras de agua de albercas, canales de riego, lagos, aguas termales, suministros de agua casera, drenaje, suelo, garganta y cavidad nasal de humanos. Además, se ha sugerido que la amiba en el suelo puede servir como vector para otros microorganismos patógenos, una de las interacciones más conocidas es con *Legionella pneumophila* [5, 6]. *N. fowleri* puede habitar casi cualquier cuerpo de agua dulce, por lo tanto, las personas que realizan actividades que involucran el contacto directo con aguas contaminadas con el protozoario, quedan expuestas a la infección (Fig. 1). En el suelo, la amiba tiene contacto directo con una amplia variedad de microorganismos que también radican en el medio ambiente, con los cuales convive de diferentes maneras, pues muchos de los detritos orgánicos, microbios y demás organismos unicelulares pueden ser su fuente de alimento [7]. Se ha reportado que estas amibas pueden ser cultivadas en medios con bajas concentraciones de nutrientes de forma axénica o monoxénica, pues la amiba es capaz de alimentarse de bacterias vivas o muertas como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* [8]. También se ha descrito que en medios altamente nutritivos como el Nelson y con agitación suave y constante, se pueden alcanzar altas tasas de división de los trofozoítos de hasta 5h y

concentraciones de 1×10^6 células por mililitro de medio [25]. Hasta la fecha, no existen reportes del aislamiento de las amibas a partir de muestras de agua de mar, quizás como resultado de los elevados niveles de osmolaridad [7, 26].

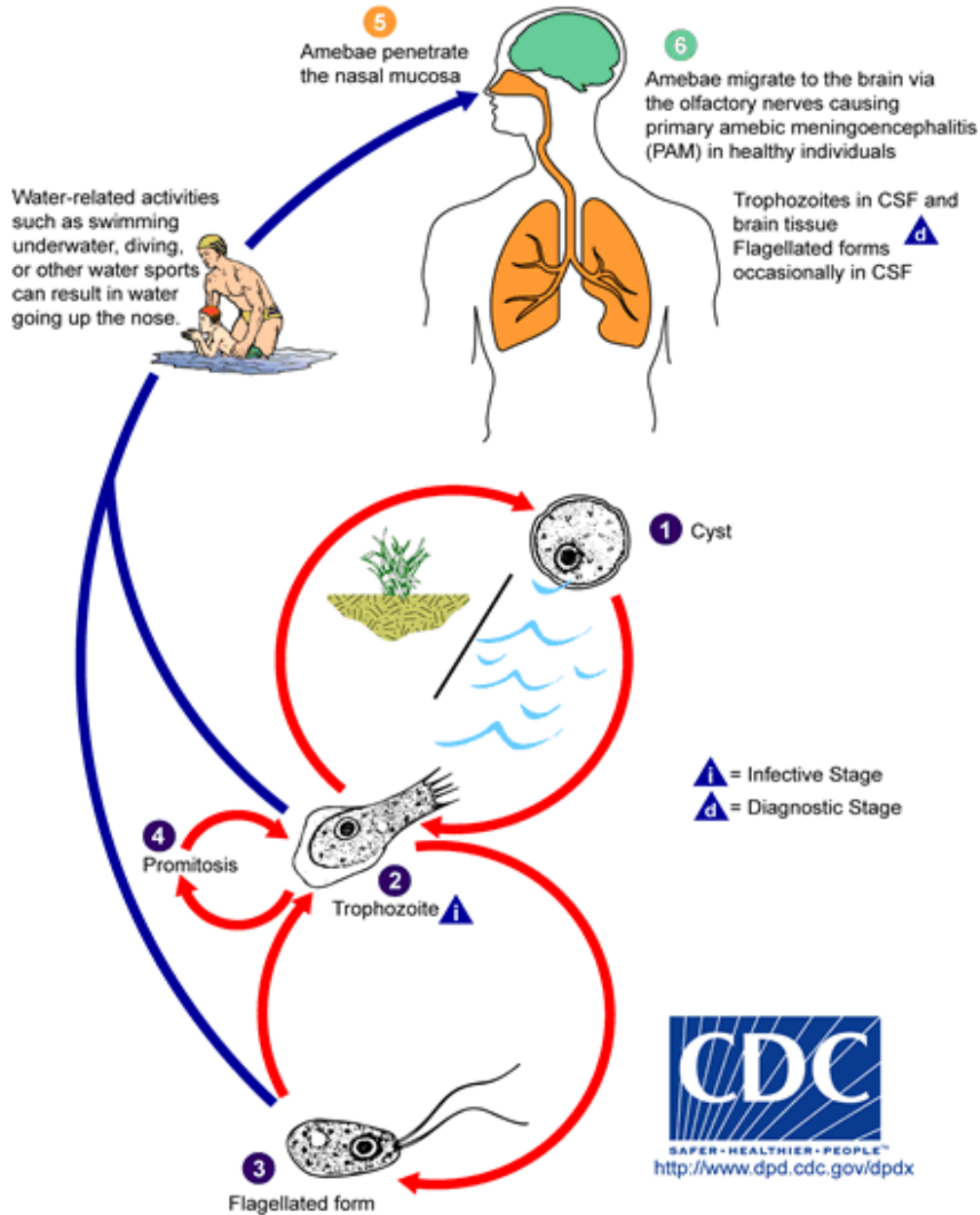


Figura 1.- Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*. Se muestran los 3 diferentes estadios que esta amiba posee. También se observa como las personas pueden quedar expuestas a la infección.

1.4 Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP)

El término meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) fue utilizado primero por Butt y posteriormente por Carter para distinguir la infección aguda del SNC causada por la amiba de vida libre *N. fowleri*, de la invasión crónica y poco común producida por la amiba intestinal *Entamoeba histolytica* [8].

1.4.1 Epidemiología

La MAP fue reportada y descrita por primera vez en 1965 en el sur de Australia, en un niño de 9 años de edad, quien falleció de una meningitis piógena aguda desconocida en ese momento y que inicialmente fue atribuida a *Acanthamoeba spp.* [27]; otros tres casos más son mencionados en el reporte con la misma historia clínica del primer paciente, de los cuales ninguno sobrevivió. Los primeros casos registrados en los Estados Unidos fueron reportados por Butt en Florida y por Patras y Andujar en Texas [28]. Además, un estudio retrospectivo realizado por Dos Santos sugiere que pudo presentarse una epidemia entre los años 1951 y 1952 en Richmond, Virginia, USA [8]. En años más recientes, en un estudio epidemiológico realizado por Trabelsi y cols. (2012), se reportó que solamente en los Estados Unidos, Australia y Europa se habían acumulado ya más de 300 casos clínicos de MAP registrados. Sin embargo, los reportes se han extendido a casi todos los continentes del mundo (Fig. 2), incrementando significativamente el número de casos y con ello, el número de personas que fallecen debido a esta enfermedad [29-33]. La distribución geográfica de este microorganismo es tan amplia, que puede encontrarse tanto en la tierra como en prácticamente cualquier cuerpo de agua como son los canales de riego, lagos e incluso aguas termales, excepto en el mar. Estos lugares son de fácil acceso para los seres humanos, aunado a la falta de conocimiento de la MAP y la carencia de un fármaco eficaz para tratarla, hace de esta enfermedad fulminante un problema de salud pública importante [33].

1.4.1.1 Epidemiología en México

En México, el primer caso de MAP se documentó en 1984, en un joven de 16 años, en Mexicali, Baja California [34]. Otro caso de MAP se reportó en el año de 1989, en un joven de 13 años de edad en Huetamo, Michoacán [35]. Posteriormente, en 1993 se aislaron cinco cepas de *N. fowleri* de cinco pacientes diferentes con diagnóstico de MAP, adicionalmente una cepa más fue aislada de muestras de agua proveniente de un canal de riego en Mexicali, Baja California [36]. Las seis cepas mostraron un efecto citolítico sobre cultivos de células VERO y un alto grado de virulencia en el modelo *in vivo*. Estos estudios y otros como el cultivo de las cepas a altas temperaturas (45°C), pruebas serológicas y patrones enzimáticos permitieron identificar a los aislados como *N. fowleri* [36].

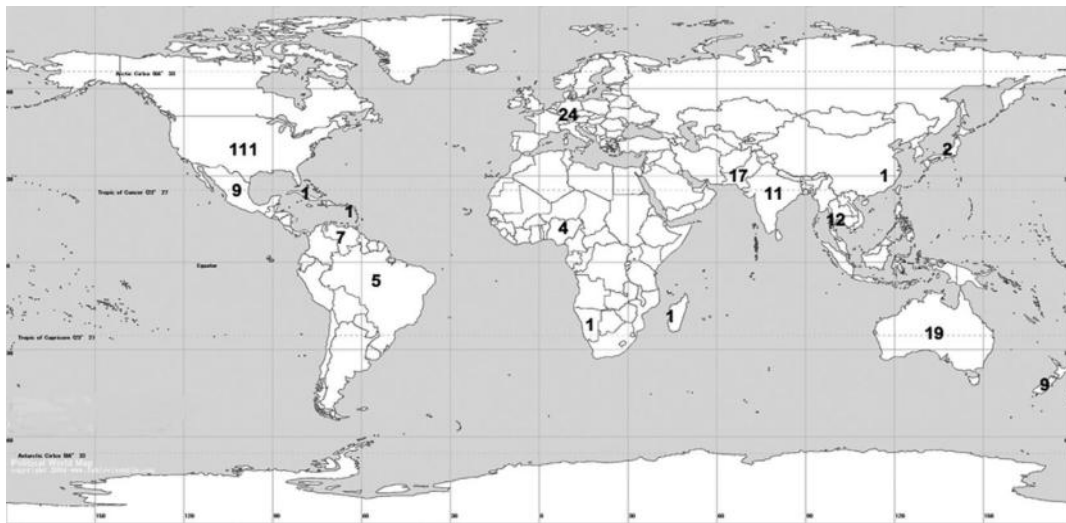


Figura 2.- Número de reportes de meningoencefalitis causadas por *N. fowleri* alrededor del mundo.

Algunos de los casos más recientes de MAP en México fueron reportados en el año 2007, dos casos en los estados de Sonora y en Baja California, en donde ninguno de los dos pacientes sobrevivió, aún al ser tratados con diversos fármacos (fuconazol, amfotericina B, ceftriaxona y dexametazona). Las amibas obtenidas de

los cultivos del líquido cefalorraquídeo de ambos pacientes fueron caracterizadas mediante estudios de microscopía de campo claro y microscopía electrónica de transmisión, pruebas de enflagelación, pruebas de virulencia en ratones de la cepa BALB/c y mediante PCR con iniciadores específicos para *N. fowleri*. Cada parámetro fue comparado con una cepa de referencia (*N. fowleri* ATCC 30808) [37].

1.4.2 Fisiopatología, características clínicas, diagnóstico y tratamiento

La MAP es un padecimiento agudo del SNC causado por *N. fowleri*. Esta enfermedad se caracteriza por desencadenar un proceso inflamatorio y hemorrágico fulminante. Se presenta principalmente en niños y adultos jóvenes sanos con una historia reciente de natación en aguas contaminadas con el parásito [7, 8, 38]. La puerta de entrada al SNC es a través de las fosas nasales, penetrando el neuroepitelio olfatorio, subiendo por los fillos olfatorios, atravesando la placa cribosa y llegando hasta los bulbos olfatorios, en donde la amiba se instala y prolifera, causando la destrucción del tejido y conllevar a la muerte del paciente en un periodo aproximado de una semana [7, 39, 40]. Los síntomas tempranos más frecuentemente detectados durante la MAP son dolor de cabeza, sudoración, fiebre, rigidez de la nuca, náuseas, vómito en proyectil, irritabilidad, letargia, convulsiones, confusión, coma, diplopia y comportamientos extraños. También se ha encontrado edema cerebral, aumento en la presión intracraneal, aumento de los glóbulos rojos y de leucocitos en la sangre, predominantemente polimorfonucleares [7, 30, 31, 41].

El diagnóstico estándar se realiza por medio de técnicas como la identificación por microscopía de luz de las amibas en fresco a partir del sedimento del líquido cefalorraquídeo y mediante la prueba de enflagelación, la cual se realiza colocando los trofozoítos en agua bidestilada o en solución salina durante dos horas esperando que la amiba exhiba sus flagelos [42]. Otros estudios empleados en la identificación de *N. fowleri* son diversas técnicas de PCR, mediante la amplificación de la secuencia del gen de la *subunidad ribosomal 5.8S* para determinar la especie aislada [43-48].

Con respecto al tratamiento, hasta el día de hoy no se cuenta con un fármaco específico y efectivo contra la MAP, a pesar de que se han utilizado diversos fármacos para tratarla [49, 50]. Por esta razón, más del 90% de los casos reportados culminan con la muerte del paciente. El único fármaco que ha mostrado evidencia clínica contra la MAP es la anfotericina B (AmB). Este fármaco es administrado principalmente por vía intravenosa a dosis de 0.5-1.5 mg/kg/día en soluciones glucosiladas al 5% y generalmente se prepara en suspensiones coloidales con desoxicolato de sodio o sulfato de colesterilo [33, 51-53]. Este fármaco afecta a nivel de membrana citoplásmica, actuando específicamente sobre los esteroides de membrana como el colesterol [54].

1.5 *Naegleria gruberi*

Debido a la importancia biológica y médica que ha adquirido el género *Naegleria* en los últimos años, se ha vuelto indispensable el estudio y descripción de la biología celular y molecular de este género. Para ello, frecuentemente se utiliza a la especie no patógena, *N. gruberi*, como modelo de estudio para describir las vías moleculares en estos protozoarios. Esto se debe principalmente a que a la fecha, solo se cuenta con el genoma descrito de esta especie no patógena [55-57]. Esta amiba ha sido estudiada a nivel de cultivo. Estudios *in vitro* han sido utilizados para determinar su metabolismo y sus requerimientos energéticos [15, 58, 59], incluso se ha estudiado también su importancia ecológica, pues se sabe que cumple un papel fundamental en la regulación de poblaciones bacterianas [6, 33, 60].

1.5.1 Descubrimiento e historia

La especie no patógena *N. gruberi*, se distingue de entre todas las especies de este género debido a que fue la primera en ser identificada. Algunos autores han mencionado que fue en 1899 cuando Schardinger la aisló por primera vez, nombrándola inicialmente *Amoeba gruberi* [3]. Desde entonces, esta amiba se convirtió en un modelo de estudio de los protistas, un subgrupo de los eucariontes

que es considerado evolutivamente inferior [55, 56]. El descubrimiento de este microorganismo se tornó de gran interés biológico, pues se observó que esta amiba es capaz de presentar una fase de flagelado de manera temporal y en cuestión de aproximadamente dos horas [2, 21]. Al parecer, la capacidad de poder realizar un recambio celular como lo es la enflagelación en tan poco tiempo, despertó la curiosidad de algunos investigadores que han estudiado la diferenciación celular desde esa época hasta el día de hoy [3, 21, 61, 62].

La secuenciación del genoma de *N. gruberi* permitió entender la gran versatilidad que puede tener un protista que se encuentra expuesto a condiciones ambientales que cambian constantemente, debido a que este microorganismo puede adaptarse para sobrevivir casi en cualquier parte del mundo [1, 63]. Los hallazgos genómicos nos llevaron a conocer que *N. gruberi* posee tres distintos genomas; el genoma nuclear cromosómico de 41 Mb, compuesto de 12 cromosomas que codifican para aproximadamente 15, 727 proteínas; un genoma mitocondrial de 50 kb, el cual contiene la información necesaria para la síntesis de enzimas mitocondriales que participan en la cadena respiratoria; y un tercer genoma extra-cromosómico de 14 kb, que es de tipo plasmídico y almacena la información que codifica para las subunidades ribosomales 28S, 18S y 5.8S [55, 56]. Por otra parte, estudios bioinformáticos también han demostrado que la maquinaria metabólica de *N. gruberi* puede ser tan laxa que cuenta con algunos genes necesarios para vías de señalización que involucran receptores acoplados a proteínas G, además de indicios de un metabolismo anaerobio y algunos genes que parecen tener un origen bacteriano [55, 57].

1.5.2 Cambios de fase en *N. gruberi*

La fase flagelar de *N. gruberi* ha sido estudiado desde el contexto morfológico, estructural, bioquímico e incluso genético [2, 21, 64-69]. Se sabe que el trofozoíto es capaz de transformarse en flagelado, no solo en respuesta a los cambios nutricionales en el ambiente, sino también ante otros factores como el cambio en el balance iónico o la temperatura del medio en el que la amiba se encuentre [70, 71]. El

flagelo de esta ameba ha sido descrito con una estructura filamentosa típica de 9 + 2 (Fig. 3) y está compuesto principalmente de tubulina, el cual nace desde un cuerpo basal que se encuentra anclado al núcleo. Se ha descrito también que la fase de flagelado presenta 2 flagelos (biflagelado), sin embargo, se sabe que puede presentar más, incluso algunos autores han evaluado diferentes formas de inducir la enflagelación *in vitro*, manipulando algunas condiciones de cultivo como la temperatura, lo cual ha permitido inducir un mayor número de flagelos (Fig. 4) [72, 73].

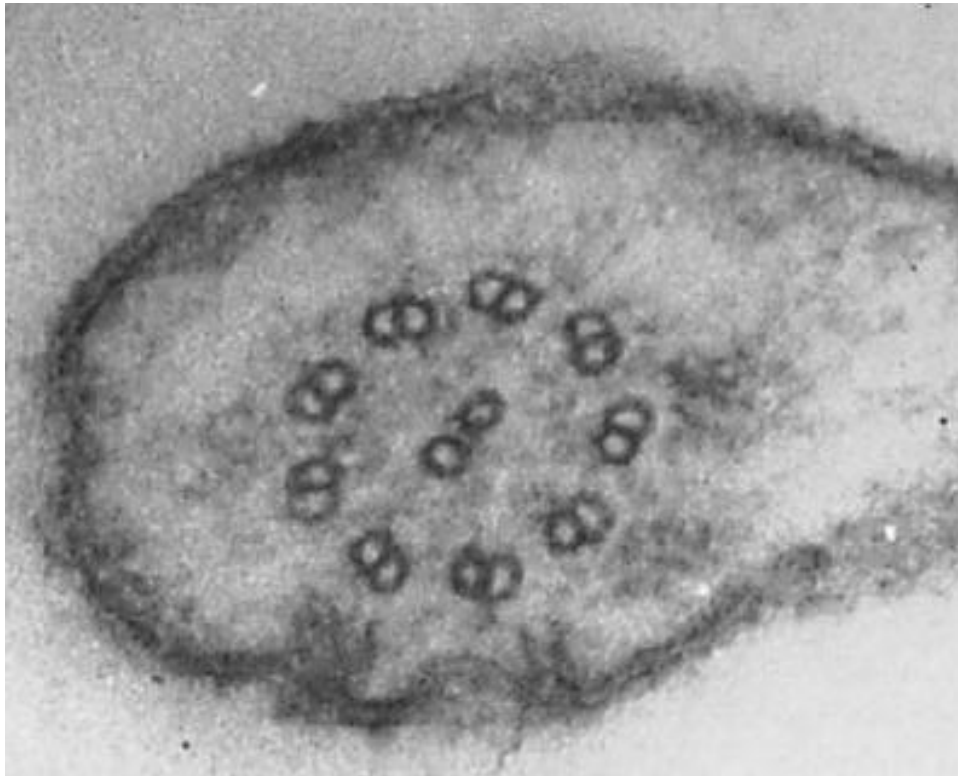


Figura 3.- Sección transversal de un flagelo de *N. gruberi*.

En la actualidad, existen estudios derivados de la secuenciación del genoma de *N. gruberi*, enfocados en el análisis teórico de los genes involucrados en la formación del flagelado, comparándolo con otros organismos que contienen genes

evolutivamente conservados y directamente relacionados a la formación de flagelos [56, 67, 74]. Incluso algunos autores han propuesto a esta amiba como modelo para el estudio de la formación de los cuerpos basales [61]. Una de las principales proteínas más estudiada en el flagelo de este protista es la tubulina, debido a que se sabe que más del 90% de la alfa y beta tubulina utilizadas durante la formación del flagelo es sintetizada *de novo*, para lo cual se requiere de un incremento en los mRNA que codifican para estas proteínas [75-77].

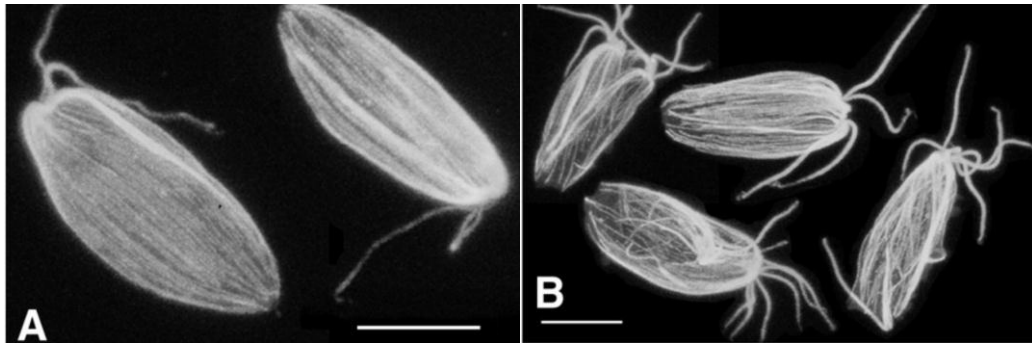


Figura 4.- Inducción de múltiples flagelos por choque térmico en *N. gruberi*. (A) Amibas cultivadas a 25°C. (B) Amibas cultivadas a 37°C.

A pesar de que la amiba *N. gruberi* ha sido ampliamente estudiada durante el fenómeno de enflagelación, también existen algunos estudios enfocados en la descripción del mecanismo de enquistamiento [78-81]. El quiste de *N. gruberi*, mide aproximadamente de 8-10 μm y es considerado la fase de resistencia (Fig. 5). La inducción de enquistamiento en esta especie no patógena se diferencia de la especie patógena *N. fowleri* debido a que ésta puede requerir de hasta dos semanas para la formación de los quistes. Sin embargo, ambas especies son inducidas a enquistamiento bajo las mismas condiciones de cultivo como es el crecimiento en agar no nutritivo en presencia de bacterias como *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor [24, 78, 82].

Uno de los primeros estudios enfocados en el enquistamiento de *N. gruberi* fue reportado por Werth y Kahn en 1967, en donde los autores realizaron un análisis bioquímico parcial de la composición de la pared del quiste de este protozooario. Mediante digestión alcalina con hidróxido de potasio, identificaron que uno de los principales componentes de la pared celular es la celulosa [81], el biopolímero más abundante en la naturaleza conformado de monómeros de glucosa unidos mediante enlaces beta, el cual ha sido encontrado también conformando la pared quística de otras amibas de vida libre como *A. castellanii* [83].

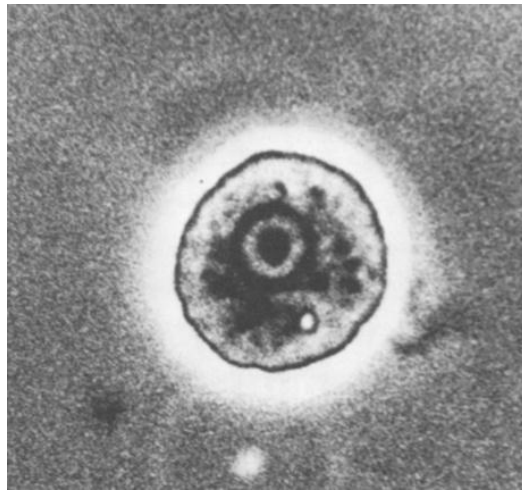


Figura 5.- Quiste de *N. gruberi*.

Por otro lado, algunos autores han reportado la resistencia del quiste de *N. gruberi* ante compuestos clorados como el cloruro de calcio, un compuesto utilizado comúnmente en el tratamiento de aguas de albercas. Los autores reportaron que los quistes de *N. gruberi* eran inactivados ante la presencia del cloro a una concentración de 1 g por litro [80]. Además, otros autores han realizado estudios comparativos similares en donde estudiaron el efecto de estos compuestos clorados sobre los quistes de *N. gruberi*, mostrando una mayor resistencia al compararlos con los quistes de la especie patógena *N. fowleri* [79].

1.6 Autofagia

1.6.1 Generalidades

La homeóstasis celular es controlada por un balance entre la producción y la degradación de macromoléculas celulares como las proteínas. En el caso de la degradación, existen dos mecanismos de acción principales, uno mediado por los complejos proteínicos denominados proteosomas y un segundo mecanismo mediado por los lisosomas, ambos involucran el mecanismo de ubiquitinación de sus moléculas blanco, pero el primero está limitado en términos de su capacidad de degradación. La autofagia es un fenómeno que ha adquirido gran importancia desde su descubrimiento en los años 50's, brindándole a las células la capacidad de degradar sus propios componentes por vía lisosomal con la finalidad de deshacerse de moléculas dañadas o innecesarias y reciclar los productos obtenidos de dicha degradación [84, 85].

1.6.2 Historia de la autofagia

En 1955 Christian de Duve y colaboradores reportaron la existencia de un tipo especial de gránulos citoplasmáticos en tejido hepático de ratas, los cuales contenían un gran número de hidrolasas [86]. Desde entonces se han identificado más de 50 enzimas dentro de estas estructuras y todas de carácter ácido. Estos organelos fueron posteriormente llamados lisosomas y clasificados en base a sus propiedades de sedimentación y a su extenso contenido enzimático [87]. Mediante microscopía electrónica de transmisión se observó que los lisosomas se encuentran rodeados por una membrana lipídica estándar, siendo capaces de contener enzimas que pueden degradar lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas [87]. La mejor forma de caracterizar a los lisosomas es mediante tinciones citoquímicas que nos muestren la actividad de una o más hidrolasas ácidas contenidas en ellos. Adicionalmente, debido a su capacidad lítica, los lisosomas han sido involucrados en un gran número de eventos relacionados con la degradación de moléculas solubles u organelos, en el

reciclaje de membranas, en la endocitosis y en la autofagia. Sin embargo, es también su capacidad de lisis lo que los hace partícipes de daños a la célula si sus enzimas se liberan accidentalmente [87, 88]. El término autofagia fue acuñado por Christian de Duve; con sus trabajos iniciados desde 1947 en la universidad de Lovaina y complementados en el Instituto Rockefeller en New York, le fue otorgado el Premio Nobel de Fisiología en 1974, debido al descubrimiento de los lisosomas y la descripción del mecanismo de autofagia [88]. En las últimas décadas, el estudio de la autofagia continua siendo de gran interés, debido a que es un mecanismo evolutivamente conservado en casi todos los eucariontes descritos hasta el momento y con gran importancia en diferentes eventos celulares. Sin embargo, se ha empleado a las levaduras como modelo para el estudio de esta vía [84, 89, 90]. Incluso un segundo premio nobel de Fisiología fue otorgado en 2016 a Yoshinori Ohsumi por su contribución en la descripción de la maquinaria molecular de la autofagia y en el estudio del papel fisiológico de éste mecanismo [91-101].

1.6.3 Mecanismo molecular de la autofagia

La autofagia involucra el tráfico regulado de vesículas denominadas autofagosomas, que se caracterizan por secuestrar porciones citoplasmáticas u organelos completos para su degradación en la vacuola/lisosoma (en las levaduras el término vacuola es utilizado para referirse al análogo de los lisosomas en los mamíferos) [84]. Dentro de la autofagia se pueden encontrar subdivisiones de la vía dependiendo principalmente de cómo se forme la vacuola y del contenido que ésta transporte; pero todas estas vías convergen siempre en la fusión de las vacuolas con los lisosomas [102]. El mecanismo más común es la denominada macroautofagia, la cual se caracteriza por atrapar de una manera no selectiva porciones citoplasmática con un gran contenido de moléculas u organelos completos, siendo éstos envueltos por una estructura denominada fagóforo, que al completarse se convierte en el autofagosoma [84]. La membrana externa de estas estructuras se fusiona con la membrana de los lisosomas, dejando dentro una estructura de una sola membrana, la cual es digerida por las enzimas lisosomales y sus productos de degradación pueden

ser devueltos al citoplasma vía permeasas [84]. Una vía alternativa (tampoco selectiva) es la llamada microautofagia, que se distingue por capturar partes del citoplasma mediante la invaginación de la membrana de los lisosomas, sin necesidad de formar al autofagosoma. En cuanto a las vías selectivas que se han estudiado, se encuentra la vía Cvt (Cytoplasm-to-vacuole targeting), la cual involucra también la captura de proteínas mediante autofagosomas, como en la macroautofagia, pero en este caso la selección es específica, capturando precursores de aminopeptidasas y manosidasas con la finalidad de cargar a la vacuola con las enzimas hidrolíticas necesarias [89]. Sin embargo, esta vía solo ha sido descrita en levaduras y hongos filamentosos. [84]. Un último mecanismo es la selección de organelos redundantes o dañados para ser degradados, y se le denomina según el organelo blanco (peroxisomas, peroxifagia; mitocondrias, mitofagia; ribosomas, ribofagia; retículo endoplásmico, reticulofagia; fragmentos del núcleo, nucleofagia, etc.) [84]. La diferencia más notable de todas estas variantes, es que durante la macroautofagia se pueden capturar diferentes organelos al mismo tiempo y sin la necesidad de que estos se encuentren dañados, es decir, sin que sea un evento selectivo (Fig. 6) [102].

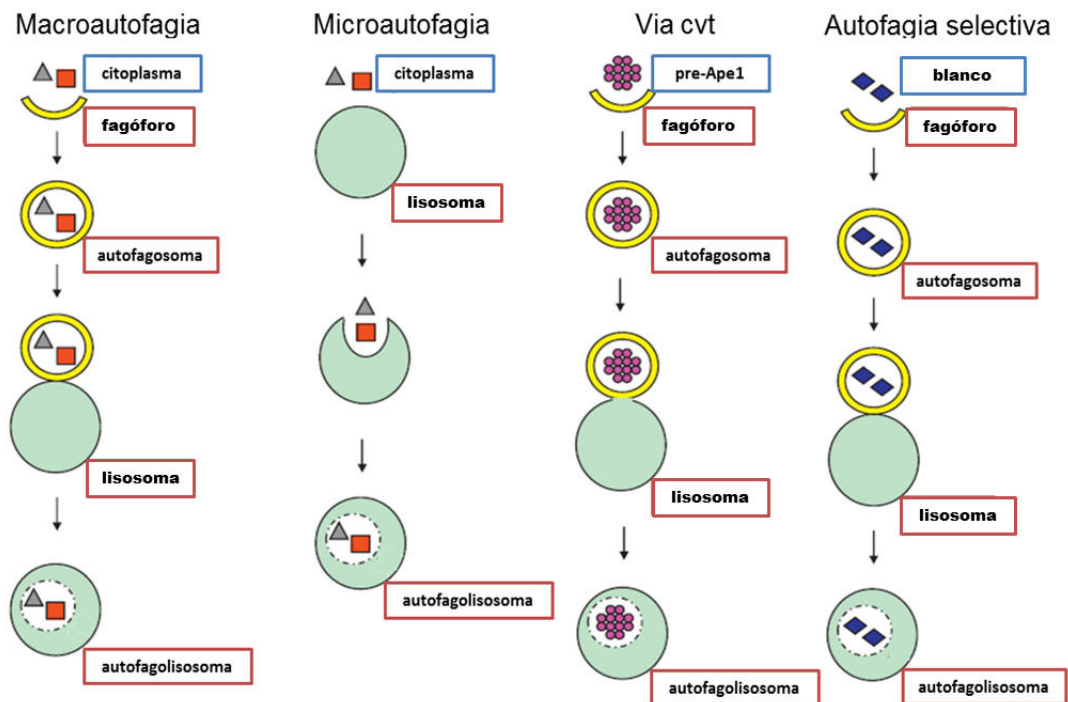


Figura 6.- Variantes de la vía autofágica.

Algunos autores han estudiado los genes relacionados con este mecanismo [103]. Las proteínas provenientes de estos genes, las cuales participan en el fenómeno de autofagia, se les denomina proteínas Atg (Autofagia), de las cuales se han descrito más de 30 miembros [104]. Varias de las proteínas Atg difieren funcionalmente entre sí, pues dentro de ellas podemos encontrar algunas cinasas (Atg1), proteasas (Atg4) e incluso moléculas tipo ubiquitina (Atg8 y Atg12), estas últimas se encargan de marcar a las membranas de los autofagosomas, participando también en el control del tamaño de la vacuola autofágica [105, 106]. Canónicamente, el mecanismo de autofagia ha sido descrito detalladamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, debido principalmente a que su genoma es relativamente fácil de manipular, por lo cual es comúnmente utilizado como modelo de estudio [84, 89, 102, 107].

1.6.3.1 Inducción de la autofagia

La autofagia es un evento que puede estar activo de forma basal, pero que también puede ser potenciado ante distintos estímulos, principalmente durante la deficiencia de nutrientes o de factores de crecimiento, así como también mediante la inducción farmacológica (p. ej. rapamicina) e infecciones por patógenos [108, 109]. Se sabe que durante el proceso de inducción de la autofagia, se activan cinasas reguladoras que participan como iniciadores de la cascada de señalización [102, 110]. La señalización es iniciada intracelularmente por la serina/treonina cinasa TOR (Target Of Rapamycin). Esta proteína cinasa es la responsable de regular negativamente a la autofagia (Fig. 7) [102, 110-113]. Su función consiste en mantener el mecanismo en niveles basales, hasta que sea necesario su incremento. De los dos complejos que involucran a TOR (TORC1 y TORC2), solo TORC1 es sensible a rapamicina, un macrólido capaz de inhibir a TOR, lo cual induce directamente la activación de la autofagia aún en presencia de nutrientes [112, 114]. Río abajo de TOR en la cascada de señalización, se encuentra el complejo Atg1 [115], el cual está conformado por la serina/treonina cinasa Atg1 y por Atg13 (proteína blanco de fosforilación de TORC1), esta última conforma el cuerpo central del complejo y es necesaria para la activación de Atg1. Otras proteínas que pueden formar parte del

complejo Atg1 son Atg17-Atg29-Atg31 para inducir macroautofagia y Atg20-Atg24-VAC8 para inducir la vía Cvt [102]. Bajo condiciones normales de nutrientes, TORC1 mantiene a Atg13 en un estado de hiper-fosforilación, pero cuando existe una deficiencia de nutrientes o cuando la rapamicina inhibe a TORC1, Atg13 se fosforila parcialmente, lo cual incrementa su afinidad por Atg1 promoviendo así la formación del complejo inductor [84, 102, 110]. Una vez iniciada la cascada de señalización se estimula la formación del fagóforo en una estructura denominada PAS (Phagophore Assembly Site o Pre-Autophagosomal Structure) [90].

1.6.3.2 Selección del contenido

Posterior a la inducción de la autofagia, se activan los mecanismos de selección del contenido del autofagosoma. Para este proceso, se necesita dejar en claro que la autofagia como mecanismo general, es un proceso selectivo pero no específico, mientras que la vía Cvt es un mecanismo selectivo y específico [116]. Además, que algunas moléculas pueden participar indistintamente en casi todas las vías autofágicas, pero existen otras que son específicas de ciertas vías y de ciertos organismos [89, 107]. También cabe mencionar que la selección de moléculas u organelos es crucial para el funcionamiento normal de una célula, por lo que requiere de una perfecta regulación y control.

A diferencia de la macroautofagia, en las formas selectivas se requiere la participación de proteínas como Atg11 y Atg19, en donde Atg11 forma un complejo, uniendo la molécula cargo a Atg19 para la formación de PAS [84, 117]. Sin embargo, se ha observado que en la levadura *Pichia pastoris* participan otras moléculas en este mecanismo, como Atg30, PEX3 y PEX14 para desencadenar la peroxifagia [89]. Específicamente en *S. cerevisiae*, las moléculas Atg32 y Atg33 se han encontrado rodeando a las mitocondrias destinadas a ser degradadas, pero el marcaje es regulado también mediante Atg11 [84, 89]. En términos generales, Atg19 es considerada un receptor y principal molécula encargada del marcaje del precursor de la aminopeptidasa y de la α -manosidasa en la vía Cvt. Sin embargo, ésta es degradada

junto a la molécula cargo sin reciclarse como el resto de las proteínas de la maquinaria autofágica [84].

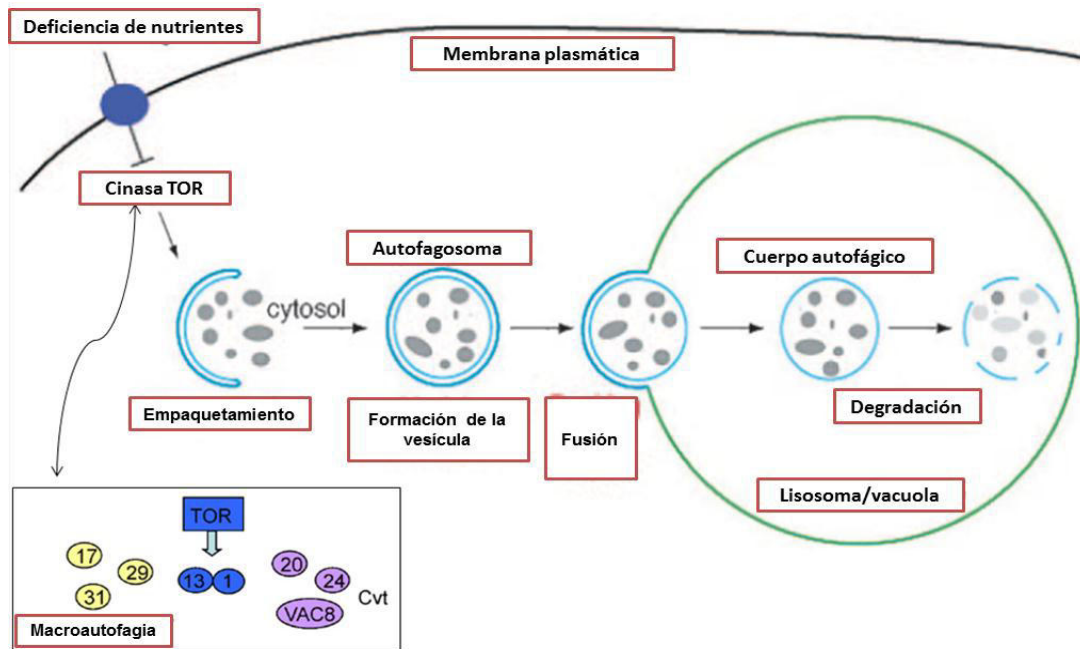


Figura 7.- Regulación negativa de la autofagia mediada por TOR.

1.6.3.3 Nucleación de la vesícula

La formación de la membrana inicia con la formación del sitio denominado PAS, que es el nombre que se le da a la estructura previa a la formación del fagóforo, tanto de la vía macroautofágica como de la vía Cvt (Fig. 8). Hasta la fecha se desconoce el origen de la membrana lipídica que se usa durante la formación del autofosoma, pues no hay evidencia concreta de la síntesis *de novo* de lípidos. Algunos investigadores sugieren el reclutamiento de lípidos desde el retículo endoplásmico y de la membrana celular en mamíferos, mientras que en las levaduras se sugiere la participación del complejo de Golgi [84, 106, 118, 119]. La membrana que se forma durante la nucleación es rica en fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), esto se lleva a cabo mediante el complejo III PI-3K (Fosfatidilinositol 3-Cinasa), el cual está conformado por la PI-3K VPS34, por la serina/treonina proteína cinasa VPS15, por Atg14 y Atg6 (Beclin 1). El PI3P recluta a otras moléculas efectoras (Atg2-

Atg18, Atg20, Atg21 y Atg24) que se unen a éste para conformar el complejo que dará inicio a la formación de la vesícula [84, 89, 102].

1.6.3.4 Expansión vesicular

Una vez completos todos los componentes de PAS, el fagóforo se expande de igual manera para la formación del autofagosoma, así como también para la vesícula de la vía Cvt (Fig. 8) [84]. En este punto se pueden encontrar ahora dos sistemas de conjugación involucrados en este proceso [105]; el primer sistema incluye a una de las moléculas más representativas de la autofagia, la proteína Atg8, una proteína tipo ubiquitina encargada del marcaje de las membranas durante la autofagia y que se ha visto directamente involucrada en controlar la expansión del fagóforo o vesícula [106].

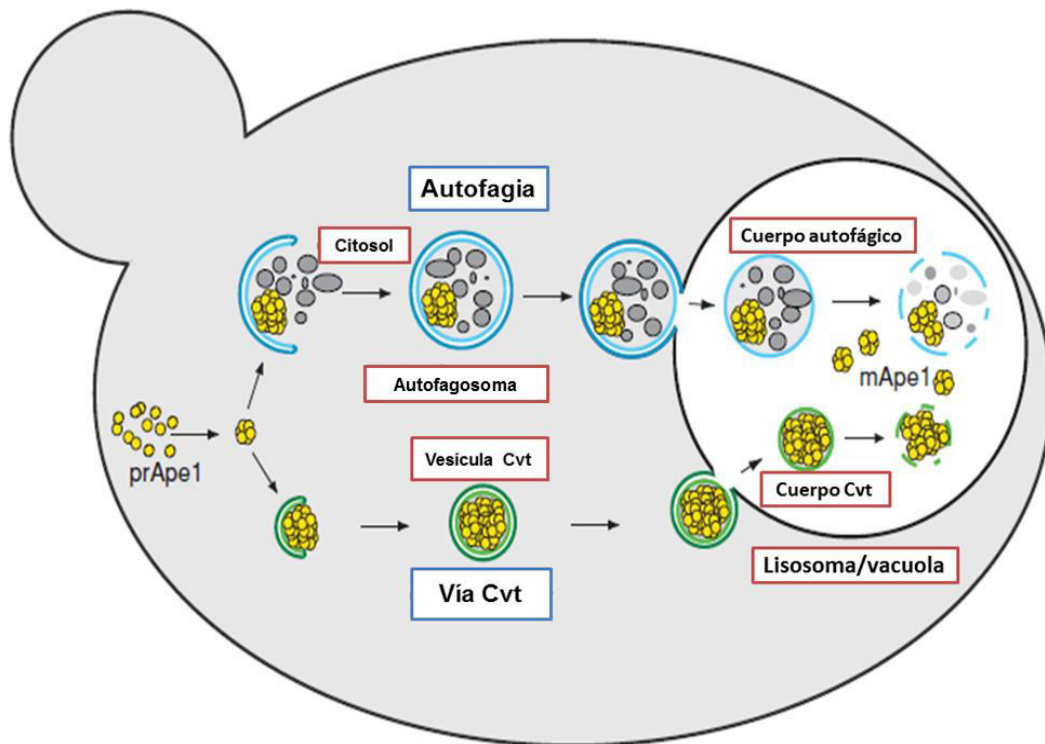


Figura 8.- Representación de la vía Cvt y de la vía autofágica en *S. cerevisiae*.

La proteína Atg8 es procesada por la cisteína proteasa Atg4, quien realiza un corte en su extremo carboxilo-terminal dejando expuesto un residuo de glicina en la posición 116, la cual es posteriormente conjugada con una fosfatidiletanolamina (PE) por el complejo Atg7-Atg3, lo cual le permite intercalarse en las membranas de los autofagosomas [120]. Además, se ha visto que la formación del complejo Atg8-PE es dependiente de la formación de un segundo complejo formado por Atg12 y Atg5 [105]. En un segundo sistema de marcaje, Atg7 y Atg10 ligan al complejo Atg5-Atg12 (ésta última ahora participa como proteína tipo ubiquitina) quien posteriormente se une a Atg16. Tanto Atg12 como Atg8 exponen un residuo de glicina el cual es activado por Atg7 en una reacción dependiente de ATP, formando una unión libre de tipo tioéster. En este estado transicional Atg8 es unido covalentemente a una PE vía Atg3 mientras que Atg12 es unido a Atg5 vía Atg10 [105]. El complejo Atg8-PE se encuentra tanto en el interior como en el exterior de la vesícula, mientras que Atg12-Atg5-Atg16 se encuentran cubriendo solo la parte exterior de la membrana (Fig. 9) [102, 105]. En conclusión, tanto Atg8-PE como el complejo Atg12-Atg5-Atg16 son esenciales para la expansión del fagóforo. Otras moléculas que también son reclutadas al fagóforo son Atg23, Atg27 y Atg9. Estas moléculas también han sido detectadas en la membrana de las vesículas durante cada ciclo de formación del autofagosoma, pero su función aún no ha sido descrita [84, 102].

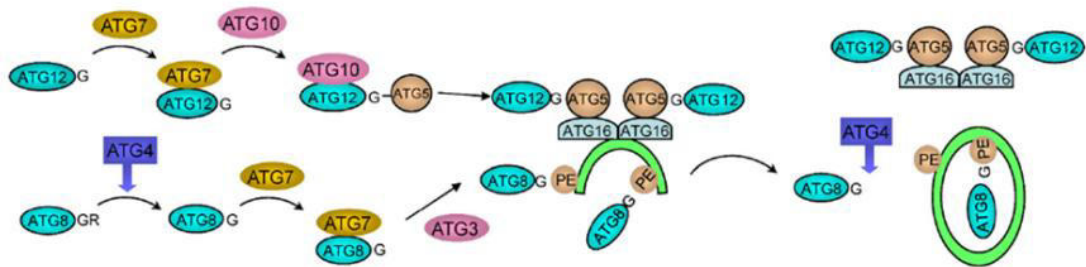


Figura 9.- Esquematación de los mecanismos de marcaje del autofagosoma durante la autofagia.

1.6.3.5 Reciclaje de la maquinaria Atg

Una vez formado el autofagosoma, Atg4 de nuevo corta a Atg8 en su residuo de glicina, liberándolo de la membrana. También el complejo Atg12-Atg5-Atg16 es liberado para ser reciclado; asimismo, Atg9, Atg23 y Atg27 son de igual manera recicladas continuamente hacia PAS para dar inicio a la formación de un nuevo autofagosoma [84]. Solamente Atg19 de la vía Cvt que se encuentra unida a la molécula cargo, así como Atg8 que se encarga de marcar el interior de la vesícula no son recicladas, culminando en su degradación dentro del lisosoma/vacuola junto con el contenido del autofagosoma [84, 102].

1.6.3.6 Entrada y degradación de la vesícula

Una vez completo el autofagosoma, éste se une a la vacuola/lisosoma mediante su interacción con receptores del sistema de fusión de membranas típico de una célula, en donde se encuentran involucradas proteínas relacionadas con la fusión de membranas como las proteínas SNARE [121]. Debido a que estas moléculas no son específicas de la autofagia, no se contemplan dentro del tema molecular para describir la fusión de las membranas en este mecanismo.

Una vez fusionadas la membrana externa del autofagosoma con la membrana del lisosoma/vacuola, dentro de ésta se puede observar una estructura de una sola membrana lipídica [84]. En *S. cerevisiae* la membrana de esta estructura es degradada por una proteína transmembranal con actividad de lipasa, denominada Atg15 [122, 123]. El contenido del fagosoma es degradado mediante las proteasas del lisosoma y facilitado por el pH ácido (cerca de 4.0). Posterior a la degradación, los restos son devueltos al citoplasma vía permeasas [102]. Una proteína que se ha visto involucrada en este mecanismo de salida de los nutrientes es Atg22, quien cuenta con un dominio similar al que presenta la familia de las permeasas y que se le ha atribuido su participación en el reciclaje de aminoácidos hacia el citoplasma [84, 89, 102].

El concepto de autofagia es empleado para describir un mecanismo de salvamento para la célula ante la ausencia de nutrientes en el medio [87, 88]. Sin

embargo, también se ha descrito a la autofagia como un fenómeno involucrado en la muerte celular [120, 124]. Esto puede deberse a una inducción prolongada de la autofagia que conlleva a la muerte de la célula, bajo la premisa de que ninguna célula es autosustentable. Tomando en cuenta que el mecanismo de autofagia es un fenómeno totalmente regulado en cuanto a la expresión de las proteínas implicadas en su activación y desarrollo, pero que en ocasiones puede estar destinado a llevar a la célula a la muerte, nace el término “muerte celular tipo autofagia” o muerte celular programada (MCP) tipo II [120, 124]. En contraste a la necrosis, tanto la MCP tipo apoptosis como la MCP tipo autofagia, ninguno de estos dos mecanismos desencadenan la lisis de la célula durante el proceso de muerte [120, 125].

1.6.4 Autofagia en protozoarios

El estudio de algunas vías o mecanismos celulares canónicos como la autofagia en los protozoarios no ha sido fácil. Como se ha mencionado previamente, la autofagia fue descrita por primera vez en células de mamífero (en hígado de rata) pero se caracterizó paso a paso en los hongos, principalmente en la levadura *S. cerevisiae* [89]. En algunos protozoarios también hay evidencia necesaria para poder describir la maquinaria autofágica, pero con algunas modificaciones y en ocasiones carece prácticamente de este mecanismo como en el caso de *Giardia duodenalis* [102, 118].

Un ejemplo de estudio de la autofagia es en la amiba de vida libre *Dictyostelium discoideum*, en la cual se han encontrado un gran número de proteínas Atg, de las cuales se ha visto que varias de ellas son importantes para el desarrollo y la diferenciación de la amiba hacia la formación de esporas en su ciclo de vida [118, 126]. Cuando los cultivos de *D. discoideum* son expuestos a la falta de nutrientes, esta amiba comienza a conglomerarse para formar una masa que dará origen a vesículas denominadas “cuerpos fructíferos”, que en su interior contienen esporas, las cuales son la fase de resistencia de este protozooario [127]. Existen estudios en donde se observó que en las amibas que poseían una mutación en *atg1*, se comprometía la formación de los cuerpos fructíferos [126]. De igual manera que con *atg1*, también se

ha visto la importancia de *atg5*, *atg6*, *atg7*, *atg8* o *atg9* en la proliferación de esta amiba [118].

Dentro de los estudios realizados en los protozoarios parásitos, se encuentran los que describen la participación de la autofagia durante la degradación de nutrientes y componentes citoplásmicos, así como también en la diferenciación celular y la remodelación metabólica de algunos microorganismos como *Trypanosoma brucei* [118]. Específicamente en este grupo de Tripanosomátidos se ha descrito la ausencia de algunos componentes de la maquinaria autofágica, en comparación con la familia de genes descritos para humanos o para levaduras [102, 128, 129]. Sin embargo, esto no significa que el mecanismo en si sea menos complejo en estos protozoarios, por el contrario, algunos autores han descrito el papel indispensable de la autofagia durante los cambios de fase en el ciclo de vida de *T. brucei* [129, 130].

Otros protozoarios que han sido blanco de estudio en la autofagia son *Entamoeba histolytica*, así como también *Entamoeba invadens*, un parásito de reptiles, el cual es frecuentemente utilizado como modelo de estudio para el enquistamiento en estas amibas [131, 132]. Mediante el análisis informático se observó la presencia de gran parte de la maquinaria autofágica en *E. invadens* y mediante ensayos de inmunomarcaje observaron la expresión de la proteína Atg8 durante la fase exponencial de crecimiento, pero interesantemente disminuía durante la fase estacionaria. Los autores observaron también un aumento de las estructuras citoplasmáticas positivas a la marca dirigida contra Atg8 durante el proceso de enquistamiento; además, al co-incubar a los trofozoítos con wortmanina (un inhibidor de la autofagia) se comprometía la formación de quistes a las 72 h en comparación con los controles [131].

Por otro lado, en protozoarios no parásitos, también se ha descrito la participación de la autofagia durante el cambio de fase, específicamente durante el enquistamiento de *Acanthamoeba castellanii* [133, 134]. Algunos autores han identificado al homólogo de la proteína Atg8 y mediante ensayos de qRT-PCR observaron un aumento en la expresión del mensajero de *atg8* en *A. castellanii* durante el proceso de enquistamiento [133]. Además, al transfectar a los trofozoítos con Atg8 acoplada a la proteína verde fluorescente (EGFP-AcAtg8) pudieron

observar su localización en pequeños cuerpos vesiculares en el citoplasma, esta marca aumentaba al inducir a los trofozoítos a enquistamiento y además co-localizaba con los lisosomas. Por otro lado, estos mismos autores realizaron ensayos de silenciamiento utilizando RNA interferente dirigido contra *atg8* (siRNA-*acatg8*) en donde se observó una disminución en la eficiencia del enquistamiento de los trofozoítos tratados con siRNA-*acatg8*, así como también una disminución en la formación de los autofagosomas [133].

En otro estudio similar en *A. castellanii*, se identificó un homólogo de Atg16, la cual forma parte del complejo de marcaje Atg12. Utilizando anticuerpos policlonales contra una proteína recombinante denominada AcAtg16, lograron identificar a Atg16 en extractos de trofozoítos en proceso de enquistamiento [134]. Además, al transfectar a los trofozoítos con EGFP-AcAtg16 pudieron observar su localización, que al igual que para Atg8, ésta se encontró en pequeñas estructuras tipo vesículas en el citoplasma. Se observó además que esta marca aumentaba al inducir a los trofozoítos a enquistamiento. Por otro lado, mediante ensayos de silenciamiento, se observó una disminución en la eficiencia del enquistamiento de los trofozoítos tratados con siRNA-*acatg16* [134]. Estos resultados nos hablan de la importancia que tiene el mecanismo de autofagia durante el crecimiento y el cambio de fase en algunos protozoarios.

1.7 Antecedentes directos

Con todos los antecedentes mencionados, es clara la importancia y multifuncionalidad de la vía autofágica, lo cual la convierte en un mecanismo importante para el estudio de la biología celular en los protozoarios. Este mecanismo ha sido desglosado en una serie de eventos que van desde las diferentes vías de inducción, la selección del contenido, la nucleación y expansión vesicular, hasta el reciclaje de la maquinaria Atg, así como también, la entrada y degradación del autofagosoma en los lisosomas [84, 89, 102, 110]. Todos estos eventos se encuentran orquestados y regulados por las proteínas Atg, las cuales están presentes en todo momento durante la autofagia. Como se mencionó previamente, durante la expansión

vesicular, se pueden encontrar dos sistemas de marcaje; uno de ellos es el sistema de marcaje mediante la formación del complejo Atg5-Atg12-Atg16, el cual se encarga de marcar solamente la cara externa de la membrana del autofagosoma [105]. Un segundo sistema de marcaje, es el que se lleva a cabo mediante una de las moléculas más representativas de la autofagia, la proteína Atg8, una proteína tipo ubiquitina la cual se puede encontrar en ambas caras (interna y externa) de las membranas del autofagosoma y la cual es necesaria para la expansión del fagóforo [106]. La caracterización de esta molécula es considerada frecuentemente un paso clave en la descripción del mecanismo de autofagia [132]. Atg8 generalmente contiene dominios y sitios que la distinguen, tal es el caso de la glicina en la posición 116 descrita en *S. cerevisiae*, sobre la cual es ligada a PE [135]. Ésta lipidación es llevada a cabo por un complejo enzimático propio de la autofagia, pero que asemeja un sistema enzimático tipo E1 y E2 [136, 137]. Una de las moléculas autofágicas que interaccionan con Atg8 durante este procesamiento es Atg7; por lo que un sitio de unión a Atg7, presente en la secuencia de Atg8, es considerado también un dominio característico de Atg8 [137, 138].

Las levaduras han sido ampliamente utilizadas como modelo de estudio para la autofagia [84, 89, 90]. Este mecanismo ha sido descrito también en otros organismos unicelulares como *D. discoideum*, *A. castellanii*, *E. invadens* y *E. histolytica* [126, 131-133]. En los estudios realizados en *E. invadens*, Picazzari y cols. en el 2008 realizaron la descripción *in silico* de una secuencia de la proteína Atg8 que fue localizada utilizando como molde de búsqueda la secuencia de la proteína Atg8 de *S. cerevisiae*. Posteriormente, los autores observaron mediante ensayos experimentales que Atg8 es indispensable para el crecimiento de los cultivos y fundamental para la formación de quistes [131]. La descripción y participación de la proteína Atg8 durante la proliferación y el enquistamiento también ha sido estudiada en *A. castellanii* [133]. En el 2011, Brennan y cols. publicaron una revisión en la cual se enfocaron en el estudio de la autofagia en algunos protozoarios y discutieron acerca de la participación de este mecanismo durante la diferenciación celular y los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos [118]. Además, en otra publicación los mismos autores proponen a las moléculas involucradas en la

autofagia como candidatos para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en contra de las enfermedades producidas por estos protozoarios [102].

Con respecto a los protozoarios del género *Naegleria*, no existe ningún estudio detallado a nivel experimental que describa el mecanismo de autofagia. Sin embargo, a partir de que el genoma de *N. gruberi* fue descrito [56], se han realizado búsquedas *in silico* de moléculas relacionadas con autofagia en donde se han encontrado posibles homólogos de proteínas como Atg1, Atg3, Atg4, Atg7 y Atg8, proponiendo la existencia de una posible maquinaria autofágica en *N. gruberi* [102]. Sin embargo, estos datos aún no han sido demostrados a nivel experimental, lo cual nos ayudará a comprender mejor la biología celular de estos protozoarios, así como también la participación de la autofagia durante los procesos de diferenciación celular en las amibas del género *Naegleria*.

2 JUSTIFICACIÓN

La autofagia desempeña un papel fundamental durante la diferenciación celular de algunos protozoarios; sin embargo, este mecanismo no ha sido descrito experimentalmente en el género *Naegleria*. En nuestro laboratorio se ha identificado un fragmento del gen *atg8*, por lo que es de nuestro interés caracterizar a la proteína Atg8 y describir el mecanismo de autofagia en *N. gruberi* para determinar su participación en los procesos de diferenciación celular.

3 HIPÓTESIS

Naegleria gruberi posee una molécula homóloga a la proteína Atg8, la cual participa en el marcaje de los autofagosomas durante la vía autofágica inducida con rapamicina y durante el cambio de fase de trofozoíto a quiste en esta amiba de vida libre.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar el proceso de autofagia en *Naegleria gruberi*.

4.2 Objetivos particulares

- Inducir y caracterizar el mecanismo de autofagia en los trofozoítos de *N. gruberi*.
- Identificar y seleccionar por análisis *in silico* al homólogo de Atg8 en el genoma de *N. gruberi*.
- Analizar la expresión del mensajero de *atg8* durante la autofagia.
- Obtención de la proteína recombinante NgAtg8.
- Analizar la localización celular de la proteína Atg8 en trofozoítos inducidos con rapamicina.
- Evaluar la expresión y localización de la proteína Atg8 durante el enquistamiento de *N. gruberi*.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo de *N. gruberi*

A lo largo de este proyecto se utilizó la especie no patógena *N. gruberi* (donada amablemente por el Dr. Visvesvara del CDC de Atlanta, USA). La amiba fue cultivada axénicamente a 25°C en medio de líquido bactocasitona al 2% suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Para cosechar a los trofozoítos, éstos se colocaron en baño de hielo por 30 min y fueron recuperados por centrifugación a 500 x g durante 5 min. Las amibas fueron trabajadas durante la fase logarítmica de crecimiento (48 h).

5.2 Interacción con rapamicina, curva de crecimiento y ensayos de viabilidad

Para inducir la autofagia, las amibas se colocaron en medio sin SFB, conteniendo rapamicina (INVITROGEN, USA) a una concentración de 5 µM (INVITROGEN, USA) durante 1, 3, 9, 12, 18, 24 y 48 h a temperatura ambiente. La viabilidad se evaluó en cada tiempo de interacción mediante el conteo de células muertas utilizando la tinción con el colorante vital azul tripano (0.5%). Además, se realizó el conteo del número total de trofozoítos cada 24 h para determinar si la rapamicina afectaba la proliferación de las amibas.

5.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para evaluar si la rapamicina es capaz de inducir algún cambio morfológico en los trofozoítos de *N. gruberi*, se realizó el análisis ultraestructural mediante MET, de los cultivos de *N. gruberi* control e inducidos a autofagia. Diez millones de trofozoítos fueron colocados en baño de hielo durante 30 min y recuperados por centrifugación a 500 x g durante 5 min, se realizaron tres lavados del paquete celular con PBS (pH 7.2), las amibas fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M (pH 7.4) durante 1 h, se realizaron 3

lavados con cacodilato de sodio 0.1 M, se post-fijaron las muestras en 1 ml de tetraóxido de osmio al 2% diluido 1:1 en cacodilato de sodio 0.2 M durante 1 h (en agitación) y se realizaron 3 lavados con cacodilato de sodio 0.1 M. Las muestras fueron deshidratadas en alcohol al 70, 80, 90 y 2 veces en alcohol al 100% durante 5 min, se añadió 1 ml de óxido de propileno a cada tubo durante 30 min y se centrifugaron a 500 x g durante 5 min, se añadió la resina de pre-inclusión 1:1 en óxido de propileno durante 1 h, posteriormente los tubos fueron colocados en el desecador durante 12 h, se centrifugaron a 500 x g durante 5 min y se decantaron los tubos, las muestras fueron colocadas en resina total y centrifugadas a 500 x g durante 5 min, se dejaron polimerizar durante 48 h a una temperatura de 60-65°C. Se realizaron cortes semifinos de 0.5 µm de espesor y se tiñeron con azul de toluidina para observarlos al microscopio óptico, posteriormente se realizaron los cortes finos de 70 nm de espesor y se colocaron en rejillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico ZEISS-910 (CARL ZEISS VISIÓN, ALEMANIA).

5.4 Marcaje con LysoTracker

La autofagia induce un incremento en el número de lisosomas y por consecuencia, la acidificación de las vacuolas autofágicas como fase final de este mecanismo. En este proyecto se evaluó la acidificación utilizando como indicador el LysoTracker red DND-99 (MOLECULAR PROBES, USA) mediante ensayos de microscopía confocal. Se utilizaron 1×10^6 trofozoítos provenientes de cultivos axénicos sin inducir (control) e inducidos con rapamicina, los cuales fueron colocados sobre cubreobjetos silanizados (SIGMA-ALDRICH, USA), se retiró el medio de cultivo sin SFB y se colocó 1 ml de PBS estéril, se añadieron 50 nM de LysoTracker, y se incubó durante 30 min a 25°C en oscuridad, se realizaron tres lavados con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 30 min y se lavó tres veces con PBS, se permeabilizó por 15 min con triton X-100 al 0.2%, se realizaron tres lavados con PBS, los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; MOLECULAR PROBES, USA) al 0.2 µg/ml durante 20 min. Los cubreobjetos fueron montados en

portaobjetos con 10 µl de vectashield (VECTOR LABORATORIES, USA). Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal LSM 700 (CARL ZEISS VISION, ALEMANIA). Los cambios en la marca de LysoTracker fueron cuantificados midiendo la intensidad de fluorescencia utilizando el programa ImageJ. Los datos fueron graficados y el análisis estadístico fue evaluado mediante la comparación de las amibas tratadas contra los controles no tratados (0 h) empleando el programa GraphPad Prism 6.

5.5 Búsqueda de las secuencias homólogas de Atg8

La búsqueda *in silico* de la proteína Atg8 de *N. gruberi* se realizó en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). Una vez obtenida la secuencia de la proteína en el formato FASTA, se realizaron alineamientos de esta secuencia con las secuencias obtenidas de distintos organismos, incluyendo a la levadura *S. cerevisiae* (gi|6319393), *A. castellanii* (AcAtg8, gi|197321090), *D. discoideum* (DdAtg8, gi|28395469), *Drosophila melanogaster* (DmAtg8, gi|24641085), *Homo sapiens* (HsAtg8, gi|6005768), *Trichomonas vaginalis* (TvAtg8, gi|123475330) y *E. histolytica* (EhAtg8, gi|67466014).

5.6 Expresión relativa del mensajero de atg8

Se realizaron ensayos de PCR tiempo real para determinar la expresión relativa del mensajero de *atg8*. El primer paso fue realizar la búsqueda de la secuencia de RNA mensajero de la proteína previamente identificada como Atg8 de *N. gruberi*, para poder diseñar los iniciadores empleados para la amplificación de este gen. Como gen endógeno se empleó la secuencia del mensajero de la subunidad ribosomal 18S (*small subunit ribosomal protein S18*, ref. XM_002682911). Como gen problema para evaluar la autofagia en *N. gruberi* se empleó la secuencia del mensajero de la proteína relacionada con autofagia Atg8 (*autophagy related protein 8*, ref. XM_002678882.1).

Los iniciadores utilizados para obtener un amplicón de 151 pares de bases para estos dos genes fueron:

Gen	Iniciadores	
<i>subunidad ribosomal 18S</i>	F:	5'GTTATCTGCCAAGGATATGCACAA 3'
	R:	3'AGCGTAGAAAGGACTCTCGGG 5'
<i>atg8</i>	F:	5'GCCGATCTTACAGTGGCACA 3'
	R:	3'CATCATCGTCCTTTTGTTCTTCAT 5'

Estos iniciadores fueron diseñados en el programa Primer Express 2.0 (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) y se mandaron a sintetizar (INVITROGEN, USA).

5.6.1 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

La extracción del RNA total de los trofozoítos de *N. gruberi* se realizó empleando el reactivo TRIzol (AMBION, USA). La integridad del RNA fue evaluada mediante un gel de agarosa al 2% y las muestras fueron tratadas con DNasa I (INVITROGEN, USA). La síntesis de cDNA se realizó con el “first strand cDNA synthesis kit” (FERMENTAS, USA), el cual fue utilizado como molde en las PCRs punto final. Para la amplificación de genes *sr18* y *atg8*, utilizamos la siguiente mezcla de reacción del kit platinum PCR supermix (INVITROGEN USA):

Supermix	25 µl
Iniciador sentido	2 µl
Iniciador antisentido	2 µl
Molde (cDNA)	1 µl

La reacción de PCR se realizó mediante las siguientes condiciones:

Paso 1 (1 ciclo)	94°C	4 min
Paso 2 (35 ciclos)	94°C	30 seg
	58°C	30 seg
	68°C	30 seg

El tamaño del producto esperado fue corroborado mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2%.

5.6.2 Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Posterior a la síntesis de cDNA, se realizaron los ensayos de PCR tiempo real con el kit SYBR Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS, USA). La reacción se llevó a cabo en el ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) la cual nos proporcionó los valores de CT para ser procesados mediante cálculos aritméticos utilizando la fórmula de Livak y cols. [139]. Una vez obtenidos los valores de la expresión relativa de cada gen normalizados contra sus respectivos controles, se graficaron los datos y se realizó el análisis estadístico de cada grupo de resultados en el programa Sigma Stat statistical software versión 2.0, utilizando la prueba de Tukey para determinar la significancia estadística de los datos.

5.7 Producción de la proteína recombinante Atg8 de *N. gruberi* (NgAtg8)

La producción de la proteína recombinante se realizó mediante la inserción del amplicón que codifica para la proteína Atg8 de *N. gruberi* en el vector de clonación-expresión pET100/D-TOPO (INVITROGEN, USA) (Fig. 10), el cual contiene:

- una región promotora de T7lac, que le ayuda a obtener un elevado grado de expresión en bacterias como *E. coli*.
- un sitio TOPO de clonación dirigida, que sirve para que la ligación sea unidireccional.
- una secuencia de poli-histidinas para la detección y purificación de la proteína recombinante.
- un sitio de corte de enterocinasa para descartar la secuencia de poli-histidinas previo a la inmunización.
- un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las colonias con el inserto.
- una secuencia origen pBR322 que le ayuda a ser más estable en la bacteria *E. coli*.

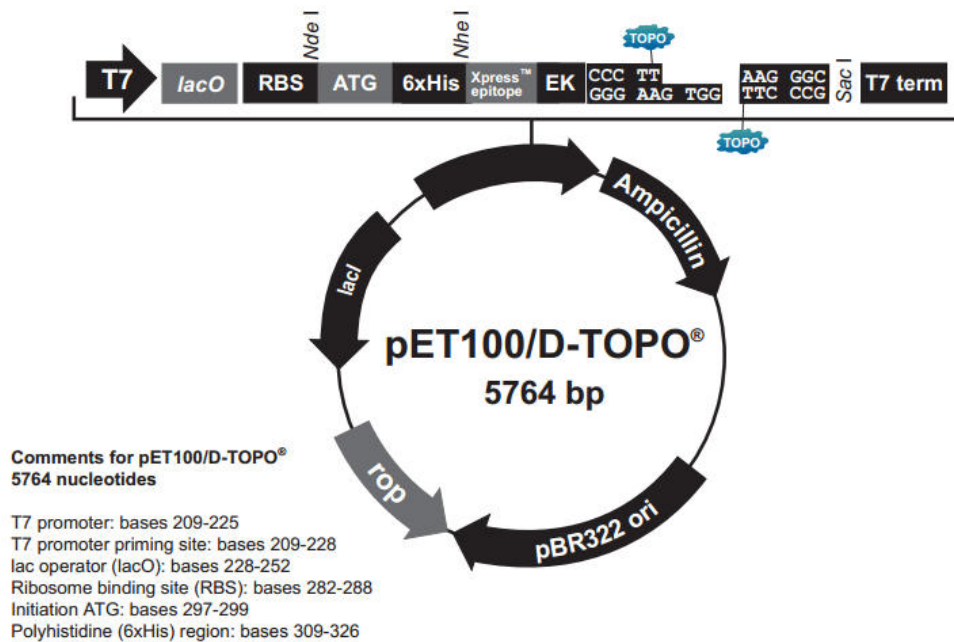


Figura 10.- Esquema del vector pET100/D-TOPO. El plásmido fue utilizado para la clonación y expresión del gen *atg8* de *N. gruberi*.

5.7.1 Amplificación del inserto

Para que el amplicón del gen *atg8* de *N. gruberi* (*ngatg8*) pudiera unirse al vector pET100 se adicionaron cuatro nucleótidos (5'-CACC-3') en el extremo 5' del iniciador sentido, esto facilitó la unión direccionada del amplicón en el vector. La obtención del RNA total y la síntesis de cDNA y la PCR se realizaron tal y como se mencionó previamente en los ensayos de qRT-PCR.

La reacción de PCR se realizó mediante las siguientes condiciones:

Paso 1 (1 ciclo)	94°C	4 min
Paso 2 (35 ciclos)	94°C	30 seg
	60°C	30 seg
	68°C	30 seg

5.7.2 Inserción

Una vez obtenido el amplicón, se procedió a realizar su inserción en el plásmido mediante la siguiente mezcla de reacción:

Producto de PCR	4 µl
Solución salina	1 µl
Vector pET100/D-TOPO	1 µl

La mezcla de reacción TOPO se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. El pET100/D-TOPO (INVITROGEN, USA) contiene un sitio cohesivo, complementario al extremo 5' de la secuencia añadida en el iniciador sentido, en el cual se encuentra unida covalentemente la Topoisomerasa I del virus vaccinia en el sitio 395-400 y otra en el sitio 405-409, de esta manera la enzima se encarga de unir los extremos del amplicón de una forma direccionada.

5.7.3 Transformación

Se tomaron 3 μ l de la mezcla de reacción de ligación y se colocaron en uno de los viales que contienen la cepa competente TOP10 de *E. coli* (incluidas en el kit). La reacción se colocó en hielo por 15 min, posteriormente se incubaron las bacterias a 42°C sin agitar durante 1 min y se colocaron en hielo nuevamente. Se añadieron 250 μ l del medio S.O.C. (incluido en el kit) y las células fueron incubadas durante 1 h a 37°C con agitación ligera, posteriormente las bacterias fueron sembradas en cajas de selección con agar LB con ampicilina 100 μ g/ml y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Una de las clonas obtenidas en la placa fue inoculada en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina (100 μ g/ml) durante toda la noche a 37°C en agitación. A partir de ese cultivo, se purificó el plásmido utilizando el PureLink HQ mini plasmid purification kit (INVITROGEN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para corroborar la clonación del gen se realizaron ensayos de PCR punto final del gen *atg8* empleando como molde el plásmido purificado.

5.7.4 Secuenciación del plásmido recombinante

Previo a la secuenciación, 5 μ l de muestra fueron tratados con 2 μ l de ExoSAP-IT (AFFIMETRIX, USA) e incubados durante 15 min a 37°C y 15 min a 80°C para purificar el amplicón, eliminando cualquier nucleótido de tamaño menor a 100 pb. Para la secuenciación se utilizó el sistema BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) con la siguiente mezcla de reacción:

H ₂ O inyectable	2 μ l
Iniciador T7 sentido	1 μ l
BigDye Mix	1 μ l
Amortiguador de reacción	2 μ l
Producto de ExoSAP-IT	2.5 μ l

La reacción se realizó mediante las siguientes condiciones:

Paso 1 (1 ciclo)	96°C	1 min
Paso 2 (25 ciclos)	96°C	30 seg
	50°C	15 seg
	60°C	3 min

La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia teórica mediante BLAST para corroborar su integridad. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

5.7.5 Expresión de la proteína recombinante

Una vez obtenido el vector recombinante, éste fue utilizado para transformar a las bacterias *E. coli* BL21 Star (incluidas en el kit), cepa específicamente diseñada para la expresión de genes regulados por el promotor T7, el cual está presente en la secuencia del pET100. Se tomó 1 µg del plásmido recombinante y se colocó en uno de los viales que contienen la cepa competente BL21 Star. La reacción se agitó muy ligeramente y se colocó en hielo durante 30 min, posteriormente se incubaron las bacterias a 42°C sin agitación durante 30 seg y se colocaron nuevamente en hielo. Se añadieron 250 µl del medio S.O.C. y se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación suave. Posteriormente las bacterias fueron inoculadas en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Una vez que transcurrieron 12 h, los cultivos fueron expandidos en dos viales con 5 ml de medio LB/Amp y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 para añadir Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM durante 2 h e inducir la producción de la proteína recombinante. Como control de no inducción se tomaron 500 µl de bacterias sin IPTG. Una vez transcurrido el tiempo de inducción, se centrifugaron las bacterias a 14 000 x g durante 1 min, se separó el sobrenadante del paquete celular y se almacenaron ambas fracciones a -20°C hasta su uso. Los

paquetes celulares fueron re-suspendidos en 50 μ l del amortiguador de lisis (incluido en el kit) y la mezcla se centrifugó a 15 000 x g durante 15 min para separar las fracciones solubles e insolubles. Ambas fracciones fueron procesadas para un corrimiento electroforético en SDS-PAGE al 15%, donde se evaluó la presencia de la proteína en cuerpos de inclusión o en la fracción soluble. La secuencia que contiene la etiqueta de 6 histidinas que se añade a la proteína recombinante en el extremo amino generalmente aumenta el peso molecular de la proteína en al menos 3 kDa.

5.7.6 Purificación de la proteína recombinante

Para la recuperación de la proteína recombinante se utilizó el kit ProBond™ Purification System (INVITROGEN, USA). El kit consta de una resina con agarosa/níquel, por la cual se hicieron pasar los sobrenadantes obtenidos de la expresión de la proteína recombinante. Se emplearon 2 ml de la resina diluidos en 6 ml de solución amortiguadora que fueron colocados en las columnas de purificación de 10 ml, posteriormente 8 ml de los extractos bacterianos fueron incubados por media hora en la columna, se lavaron con las soluciones de lavado y se eluyeron con 5 ml de solución amortiguadora de elusión, ambas incluidas en el kit.

5.8 Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante

Una vez obtenida nuestra proteína recombinante purificada, se inmunizó un conejo de la cepa Nueva Zelanda, utilizando como adyuvante TiterMax Classic (SIGMA-ALDRICH, USA). Como control, se obtuvo el suero pre-inmune mediante la punción de la vena media de la oreja. La sangre se centrifugó a 2000 x g durante 10 min para obtener el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su uso. La proteína se diluyó en una relación de volumen 1:1 con el TiterMax. La primera inmunización se realizó mediante la inoculación subcutánea de 100 μ g de la proteína recombinante, con una semana de intervalo, se realizaron dos inmunizaciones adicionales que constaron de inmunizaciones por vía intramuscular con la misma cantidad de proteína en cada caso. Una vez terminado el esquema de inmunización, se recuperó el

suero, el cual fue precipitado con una solución saturada de sulfato de amonio en frío y dializados en PBS estéril. Se realizó la titulación del anticuerpo mediante ensayos de WB utilizando la proteína recombinante purificada.

5.9 Ensayos de Western-blot para la identificación de la proteína recombinante

Aproximadamente 40 µg de extractos totales de lisado de bacterias inducidas con IPTG se corrieron en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El corrimiento electroforético se realizó en un paso inicial de 50 V por 15 min y 100 V durante 3 h, posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF durante 90 min a 400 mA, la membrana fue lavada cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T) durante 5 min, posteriormente la membrana fue bloqueada con leche descremada al 10% durante toda la noche a 4°C, se realizaron 5 lavados con PBS-T durante 5 min. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-NgAtg8 diluido 1:100 o con un anticuerpo monoclonal anti-6xhis (ROCHE, SUIZA) diluido 1:2000 en PBS-T durante toda la noche a 4°C, se realizaron 5 lavados con PBS-T durante 5 min, posteriormente se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (ZYMED, USA) durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó la membrana cinco veces con PBS-T durante 5 min. La membrana fue revelada con el kit de luminol (SANTA CRUZ TECHNOLOGIES, USA) por quimioluminiscencia usando placas radiográficas.

5.10 Inducción del enquistamiento

Se prepararon placas con agar no nutritivo (BECTON DICKINSON, USA) al 1.5% y esterilizado por calor húmedo. Cultivos de *Enterobacter aerogenes* fueron re-suspendidos en PBS estéril e inactivados en baño maría por 1 h a 60°C, posteriormente 0.5 ml de la suspensión bacteriana fueron dispersados homogéneamente en las placas de agar en condiciones de esterilidad y colocadas a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, cinco millones de trofozoítos de *N. gruberi* en fase log fueron re-suspendidos en 5 ml de PBS estéril y colocados en

las placas con agar no nutritivo y bacterias. La inducción de enquistamiento se realizó incubando a los trofozoítos a 25°C durante 5, 10 y 15 días. Como control, se utilizaron trofozoítos en el tiempo cero de inducción. Para corroborar la presencia de quistes, se realizó la tinción con blanco de calcofluor (MERCK, USA). Las células control e inducidas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 min y lavados 3 veces con PBS centrifugando a 500 x g por 5 min. Posteriormente, las muestras fueron teñidas con 1% de blanco de calcofluor durante 1 h a temperatura ambiente y lavadas dos veces con PBS. Las muestras fueron observadas mediante microscopía confocal en un microscopio ZEISS LSM 700 (CARL ZEISS VISION, ALEMANIA).

5.11 Localización celular de Atg8 por microscopía confocal

Los trofozoítos tratados y no tratados con rapamicina, así como también los inducidos a enquistamiento fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min, permeabilizados con 0.2% de triton-X100 por 20 min y bloqueados con albumina al 1% por 1 h a 37°C. Posteriormente las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-NgAtg8 diluido 1:50 en PBS-T durante 3 h a temperatura ambiente, posteriormente fueron incubados con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a FITC durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal para identificar la localización celular de Atg8 en los trofozoítos inducidos a autofagia e inducidos a enquistamiento.

5.12 Localización celular de Atg8 por MET

Para corroborar la marca observada por microscopía confocal, se realizaron ensayos de localización de NgAtg8 en trofozoítos inducidos a enquistamiento, mediante el marcaje con el anticuerpo anti-NgAtg8 utilizando MET. Veinte millones de trofozoítos control e inducidos a enquistamiento durante 5 y 10 días fueron fijados con paraformaldehído 4%/glutaraldehído 0.5% en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M (pH 7.4) durante 3 h, se realizaron tres lavados con PBS estéril (pH

7.2). Posteriormente, se realizó un lavado con etanol al 25%. Las muestras fueron deshidratadas en alcohol al 50, 70, 90 y 2 veces en alcohol absoluto al 100% durante 15 min, se añadió la resina LR-white de pre-inclusión 2:1 en etanol absoluto durante 30 min, se centrifugaron a 500 x g durante 5 min, se adicionó una mezcla 1:1 de resina en etanol y se dejaron en agitación suave durante 24 h, se centrifugaron a 500 x g durante 5 min, se añadió una mezcla 2:1 de resina en etanol y se colocó en agitación por 90 min, se centrifugaron a 500 x g durante 5 min. Se realizaron tres cambios de resina pura durante 1 h cada uno, colocando en el paso final las muestra en cápsulas de gelatina con resina nueva, se centrifugaron a 500 x g durante 30 min, La resina fue polimerizada con luz UV a 4°C por 3 días. Se realizaron cortes semifinos de 0.5 µm de espesor y se tiñeron con azul de toluidina para ser analizados por microscopía de luz, posteriormente se realizaron los cortes finos de 70 nm de espesor y se colocaron en rejillas de níquel.

Las muestras fueron bloqueadas con SFB al 10% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, se realizaron 10 lavados con PBS, se colocó el anticuerpo primario de conejo anti-NgAtg8 diluido 1:15 en SFB al 5% durante 24 h a 4°C, se realizaron 10 lavados con PBS, se colocó el anticuerpo secundario chivo anti-IgG de conejo acoplado a partículas de oro de 20 nm diluido 1:40 en SFB al 5%, se incubó a temperatura ambiente por 1 h, se realizaron 10 lavados con PBS. Finalmente, las muestras se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser observadas en un microscopio electrónico JEM-1011 (JEOL, JAPAN).

6 RESULTADOS

6.1 Ensayos de viabilidad y curva de crecimiento en presencia de rapamicina

La inducción del mecanismo de autofagia en los trofozoítos de *N. gruberi* se llevó a cabo utilizando un inductor específico, rapamicina. Mediante ensayos con el colorante vital azul de tripano se observó que la rapamicina (5 μ M) no afectó la viabilidad de los cultivos de *N. gruberi* en ninguno de los tiempo probados (Fig. 11), al igual que los controles incubados únicamente con el vehículo de la rapamicina (DMSO), así como tampoco en los cultivos crecidos en medio de bactocasitona sin SFB y en medio de bactocasitona suplementado con SFB. Este resultado nos muestra que la rapamicina a la concentración utilizada, no afecta la viabilidad de las amibas.

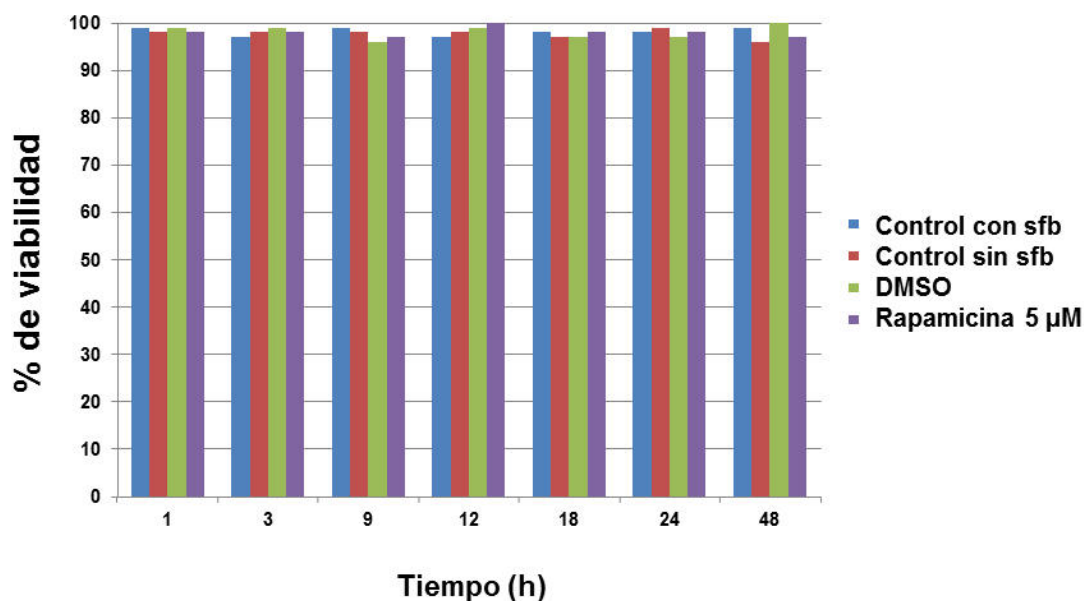


Figura 11.- Ensayos de viabilidad en presencia de rapamicina. Utilizando la técnica de exclusión de azul tripano se determinó el porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *N. gruberi* control y de los tratados con rapamicina (5 μ M) o DMSO durante 1, 3, 9, 12, 18, 24 y 48 h. No se observó ningún cambio en la viabilidad en ninguna de las condiciones utilizadas.

Después de corroborar que la viabilidad de los cultivos no fue afectada por la rapamicina, se evaluó si la proliferación de los trofozoítos se mantenía intacta, mediante el conteo de células a lo largo de los tiempos de interacción. Los resultados mostraron que el crecimiento de los trofozoítos de *N. gruberi* tratados con rapamicina no mostró cambios significativos en comparación con los cultivos control (Fig. 12).

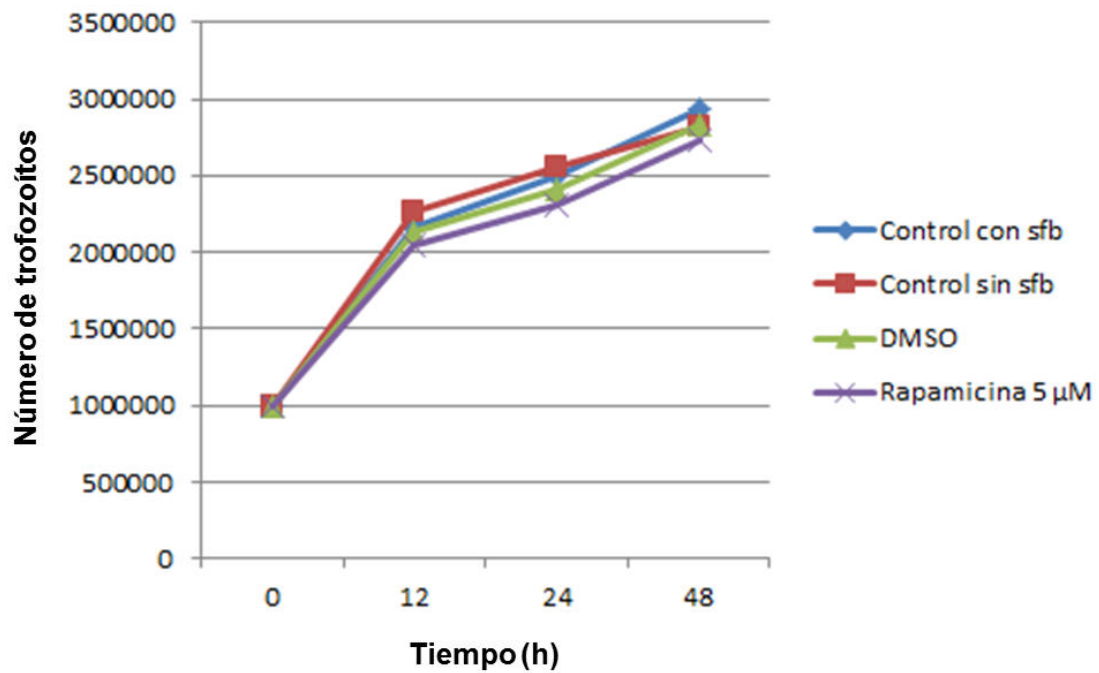


Figura 12.- Curva de crecimiento en presencia de rapamicina. Se contó el número total de trofozoítos de *N. gruberi* control no tratados y de los cultivos tratados con rapamicina durante 0, 12, 24 y 48 h. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los cultivos.

6.2 Cambios ultraestructurales inducidos por la rapamicina

Para evaluar los cambios ultraestructurales inducidos por la rapamicina sobre los trofozoítos de *N. gruberi*, realizamos ensayos de MET. Los controles no tratados presentaron la morfología típica de *N. gruberi*, mostrando una forma ameboidea, un gran contenido de mitocondrias y de vacuolas en todo el citoplasma, así como un núcleo con un nucléolo muy prominente (Fig. 13A). Por otro lado, en los trofozoítos tratados con rapamicina durante 9 h, se observó la formación de vacuolas tipo autofágicas, las cuales contenían material citoplasmático, incluyendo organelos completos como lo son las mitocondrias (Fig. 13B). Posteriormente, a las 12 h de interacción con rapamicina se pudieron apreciar vacuolas con restos citoplásmicos, sugerentes de ser vacuolas autofágicas (Fig. 13C).

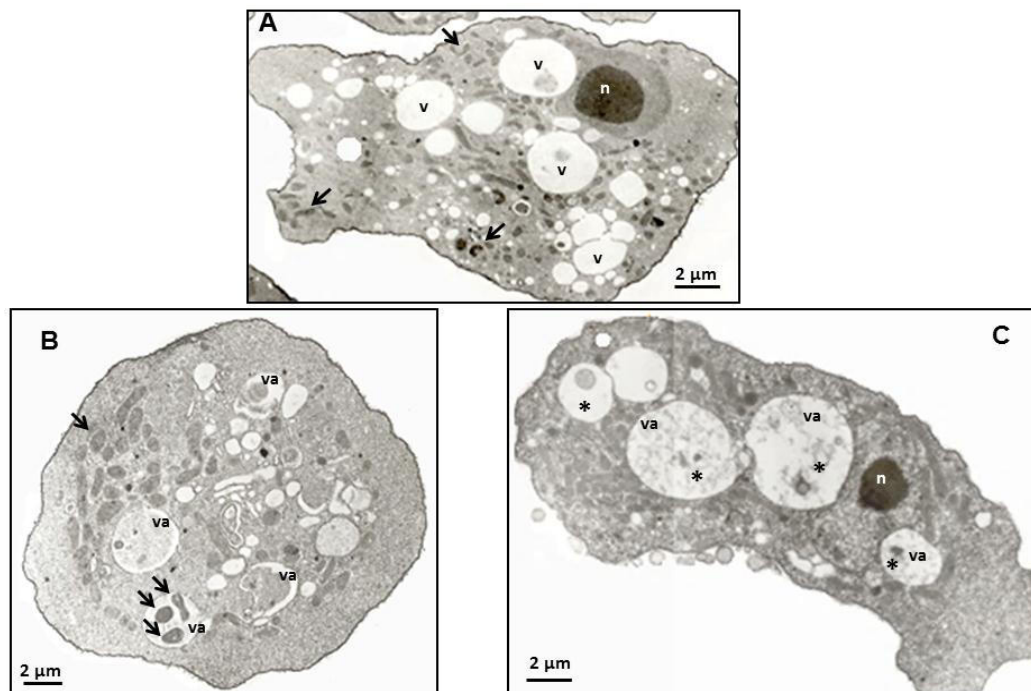


Figura 13.- Cambios ultraestructurales inducidos por la rapamicina. Los trofozoítos control (A) de *N. gruberi* mostraron una morfología ameboidea típica con un gran contenido de vacuolas (v), mitocondrias (flechas) y un núcleo con un nucléolo muy prominente (n). Por otro lado, los trofozoítos tratados con rapamicina durante 9 (B) y 12 h (C) mostraron un gran número de vacuolas autofágicas (va) con evidente contenido citoplásmico (asteriscos) en su interior.

6.3 Marcaje con LysoTracker de trofozoítos tratados con rapamicina

Uno de los cambios más representativos que se pueden evaluar durante la autofagia es el incremento en el número de vacuolas ácidas en el citoplasma de las células [84]. Este evento fue evaluado en los trofozoítos de *N. gruberi* tratados con rapamicina mediante el marcaje con LysoTracker, un fluoróforo que se acumula dentro de estructuras ácidas como son los lisosomas. Los resultados obtenidos por microscopía confocal mostraron que los trofozoítos tratados con rapamicina durante 1, 3, 9 y 12 h no mostraron un incremento evidente en la marca de LysoTracker en comparación con el control (0 h) (Fig. 14A). Sin embargo, la marca de LysoTracker incrementó ligeramente a las 18 h post-inducción (Fig. 14A), la cual posteriormente aumentó significativamente a las 24 h de interacción con rapamicina. Interesantemente, la marca disminuyó de manera considerable a las 48 h post-inducción (Fig. 14A). La marca de LysoTracker fue cuantificada mediante la determinación de la intensidad del número de píxeles, mostrando un incremento estadísticamente significativo a las 18, 24 y 48 h post-rapamicina (Fig. 14B).

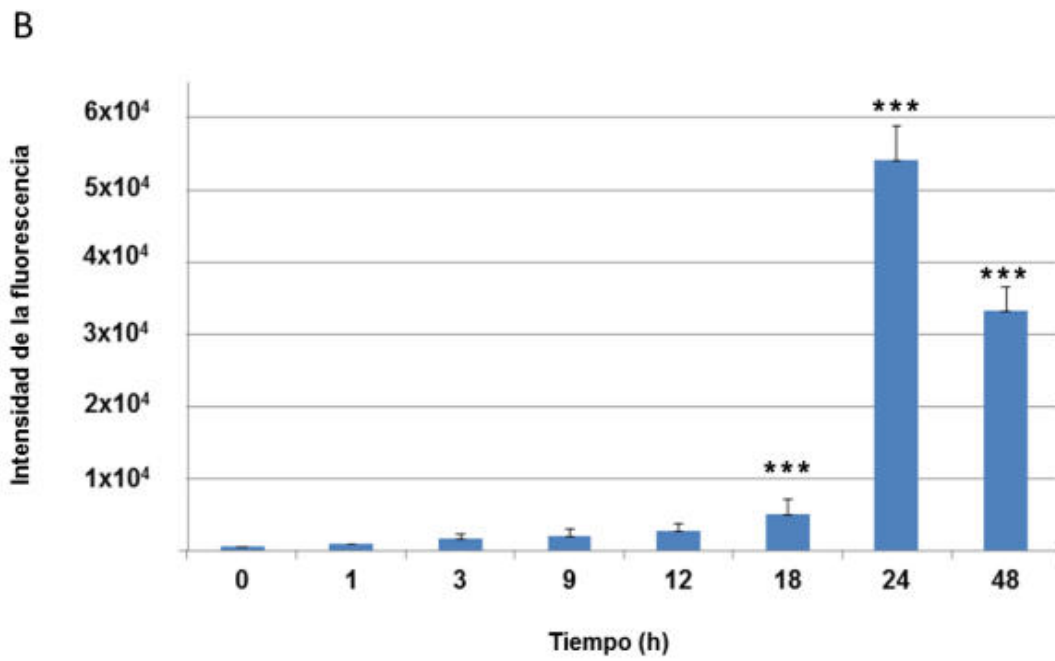
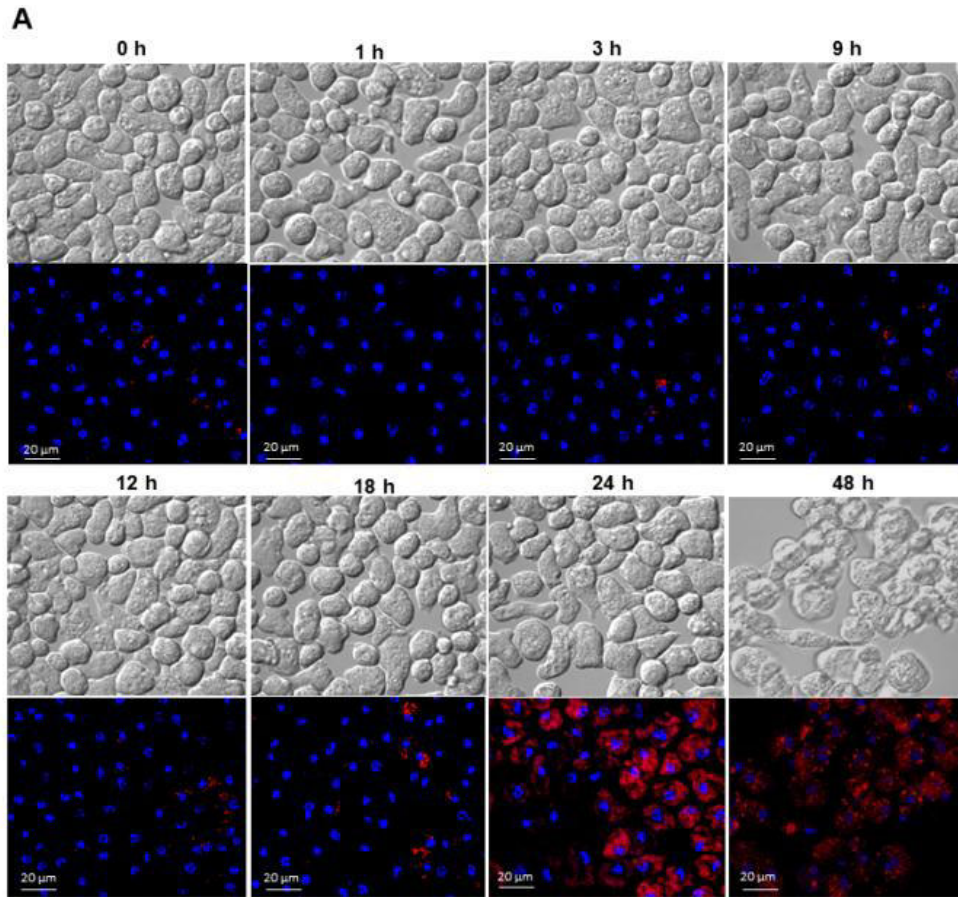


Figura 14.- Acidificación vacuolar de los trofozoítos tratados con rapamicina. (A) Mediante ensayos de microscopía confocal se observó el marcaje de las vacuolas ácidas con LysoTracker (rojo) y de los núcleos con DAPI (azul) de las amibas tratadas con rapamicina a diferentes tiempos. (B) La marca fue cuantificada y graficada para calcular las diferencias estadísticas a lo largo del tratamiento. Los resultados mostraron que la marca de LysoTracker fue estadísticamente significativa a las 18, 24 y 48 h post-rapamicina, comparadas con el control (0 h). Barras = 20 μ m.

*** $p < 0.001$.

6.4 Selección, descripción y análisis *in silico* de la proteína Atg8 en *N. gruberi*

Para corroborar el evento de autofagia en *N. gruberi*, se realizó la búsqueda *in silico* de candidatos a homólogos de la proteína Atg8 en el genoma de este protozooario usando la base de datos del NCBI y la secuencia Atg8 de *S. cerevisiae* (ScAtg8; gi|6319393) como molde. En este estudio se encontró una secuencia con dominios similares a los que contienen las proteínas Atg8, por lo que fue seleccionada como el principal candidato a homólogo de Atg8 de *N. gruberi*. La secuencia Atg8 de *N. gruberi*, denominada NgAtg8 (gi|284092542), tiene una identidad de 66% con ScAtg8 y está conformada por 118 aminoácidos, a diferencia de los 117 de ScAtg8. Posteriormente, la secuencia de la proteína NgAtg8 fue alineada con las proteínas Atg8 de otros organismos para realizar un análisis comparativo más detallado (Fig. 15A); en este alineamiento se pueden distinguir varios aminoácidos altamente conservados, en los cuales se destaca un residuo de glicina en la posición 116, que es el sitio en donde la proteína es ligada a una PE (Fig. 15A). Además, se encontró el dominio de unión a Atg7 y el sitio de unión a tubulina, dominios característicos de esta proteína tipo ubiquitina encontrados también en ScAtg8 (Fig. 15B). Adicionalmente, se muestran los porcentajes de homología entre NgAtg8 y las demás Atg8 (Fig. 15C).

A

```

Acatg8 ----MQKPFKEEHS LDKRREVADRIRAKYPDRIPVIVEKAPKSD-APDID
Ddatg8 --MVHVSSFKNHPLDKRREVAERIRSKYLD RIPVIVEKAPRSD-APDID
Scatg8 ----MKSTFKSEYPFEKRKAESER IADRFKNRIPVICEKAEKSD- IPEID
Ngatg8 ----MKYKEDPENTFEKRQAEASRIRQRYS DRIPVICEKADKSN-FPDID
Dmatg8 ----MKFQYKEEHAF EKRR AEGDKIRRKYPDRVPVIVEKAPKAR-IGDLD
Hsatg8 ----MKWMFKEDHSL EHR CVESAKIRAKYPDRVPVIVEK VSGSQ-IVDID
Tvatg8 -----MELQSLD-RSNNIMTMLNKYPDHIPVIVERDPHCTTLPDIK
Ehatg8 MESQP KLPFKQV SFEERKAF AIQLRQKKPNYVPLV VESDGT SN-AIELK
          .:: *      :  :  : : *:: *      .      ::.

Acatg8 KKKFLVPADITVGK FVYEIRKHM-KLSPEKAI FLFVNNVLPPTAEL ----
Ddatg8 KKKYLVPADITVGK FVYEIRKHMTKVSAEKAIYLFVNNIPPTAAL ----
Scatg8 KRKYLVPADLTVAQFVYIIRKRI-MLPPEKAI FIFVNDTLPPTAAL ----
Ngatg8 KKKYLVPADLTVAQFVYIIRKRI-KIDSTTNI FIFVNNVLPPTSATL ----
Dmatg8 KKKYLVPSDLTVGQFYFLIRKRI-HLRPEDAL FFFVNNVLPPTSAT ----
Hsatg8 KRKYLVPSDITVAQFMWIIIRKRI-QLPSEKAI FLFVDKTVPQSSLT ----
Tvatg8 NKKFFVTKT LSVGNFVYCVRNRL-DINEKDAI FLFVDNTLPNPSDN ----
Ehatg8 KDRFFIPEDSKV SDFVKVLVDKYIETDGETPISTVSVKIQT PSKAIQPSN
          :  ::::.  . * . *      :  :      :  .  .  .  .

Acatg8 --MSHIYAKYKDEDGFLYITYSGENTFGQ----
Ddatg8 --ISQIYERYKDEDGFLYITYSGENTFGSDL--
Scatg8 --MSAIYQEHKDKDGF LYVTYSGENTFGR----
Ngatg8 --MSQLYEEQKDDGFLYVTYNGENTFGEI---
Dmatg8 --MGSLYQEHHEEDYFLYIAYS DENVYGMAKIN
Hsatg8 --MGQLYEKEKDEDGFLYVAYS GENTFGF----
Tvatg8 --LGAIYEKHKSEDQMLHCTYSSDSAYGFL---
Ehatg8 EDTIGSLYAMYQEEDGYLYFIVYRESVFGN----
          :. : *  :.. *  *!  :...! *

```

B

>gi|284092542|gb|EFC46184.1| atg8 [*Naegleria gruberi*]



>gi|6319393|ref|NP_009475.1| atg8 [*Saccharomyces cerevisiae*]



162 bits (410), Expect = 9e-57, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 77/116 (66%), Positives = 92/116 (79%), Gaps = 0/116 (0%)

C

Organism	Atg8 length	Identity
<i>Naegleria gruberi</i>	118	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	117	70/110 (74%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117	77/116 (66%)
<i>Dictyostelium discoideum</i>	122	67/110 (61%)
<i>Homo sapiens</i>	117	64/116 (55%)
<i>Drosophila melanogaster</i>	121	61/116 (53%)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	113	37/104 (36%)
<i>Entamoeba histolytica</i>	129	33/115 (29%)

Figura 15.- Análisis *in silico* de NgAtg8. (A) Alineamiento múltiple de NgAtg8 contra otras Atg8 de distintos organismos. Se identificaron los aminoácidos fuertemente conservados (asterisco), altamente conservados (dos puntos) y los menos conservados (punto). También se remarca la glicina de lipidación (cabeza de flecha). (B) La secuencia homóloga a Atg8 de *N. gruberi* fue alineada con ScAtg8, en donde se identificaron dominios específicos de una proteína Atg8 tipo ubiquitina como son el sitio de unión a tubulina y el sitio de unión a Atg7. (C) Porcentajes de identidad obtenidos del alineamiento múltiple.

6.5 Expresión relativa del mensajero de *ngatg8*

Una vez identificada la secuencia de NgAtg8, se procedió a evaluar la expresión de su mensajero durante la inducción con rapamicina mediante ensayos de qRT-PCR. Los resultados mostraron un incremento no significativo en la expresión del mensajero a los tiempos de 0.5 y 1 h post-incubación con rapamicina, el cual continuó incrementando hasta volverse estadísticamente significativo a las 3 y 9 h (Fig. 16). El pico máximo de expresión de *ngatg8* se observó a las 9 h; a partir de este tiempo se observó un decaimiento en la expresión a las 12 h, la cual seguía siendo significativa, pero la expresión decayó hasta niveles basales a las 18 h post-incubación con rapamicina (Fig. 16). El análisis estadístico fue obtenido mediante la comparación de las amibas tratadas a los distintos tiempos de incubación con rapamicina contra los controles no tratados (0 h).

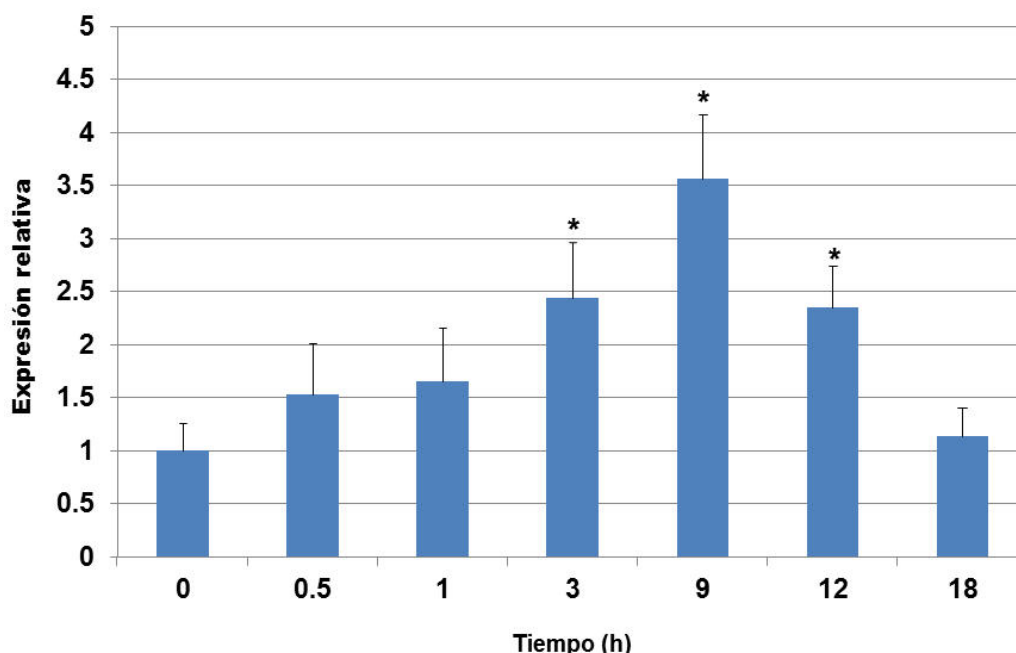
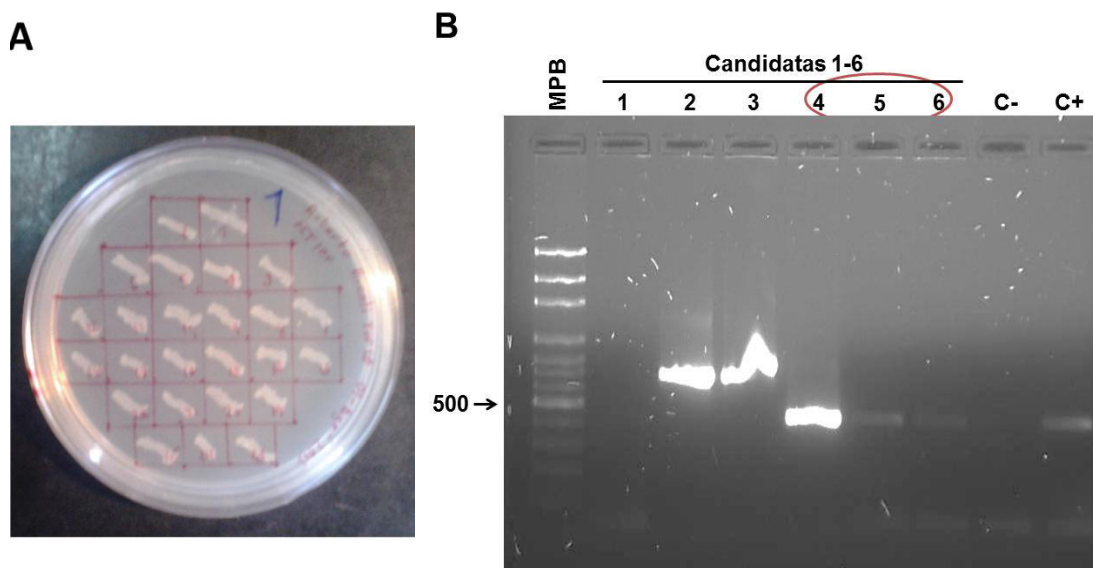


Figura 16.- Expresión relativa del mensajero de *ngatg8* durante la incubación con rapamicina. Mediante ensayos de qRT-PCR se observó la sobreexpresión del gen de *ngatg8* en los trofozoítos de *N. gruberi* inducidos a autofagia con rapamicina. Los tiempos de 3, 9 y 12 h post-incubación con rapamicina fueron los únicos estadísticamente significativos en la sobreexpresión de *ngatg8*. Siendo a las 9 h donde se observó el pico máximo de expresión. * $p < 0.05$.

6.6 Obtención de la proteína recombinante NgAtg8 y producción de anticuerpos contra ésta

Para obtener la proteína recombinante, el gen *ngatg8* fue amplificado mediante PCR y clonado en el vector pET100/D-TOPO. Para identificar los plásmidos que contenían la secuencia de interés se realizaron ensayos de PCR punto final utilizando como molde el DNA plasmídico de las bacterias transformadas (Fig. 17A). Las clonas 4, 5 y 6 fueron los candidatos que amplificaron el producto del tamaño esperado durante las PCR (Fig. 17B). Para corroborar la inserción de *Ngatg8* en esos plásmidos se realizaron ensayos de restricción con la enzima HincII, donde se observó que la clona 4 generó los fragmentos de DNA en el tamaño esperado durante la restricción (Fig. 17C). Además, la secuencia obtenida del inserto de la clona 4 (Fig. 17D) fue 100% idéntica a la reportada en la base de datos del genoma de *N. gruberi*.



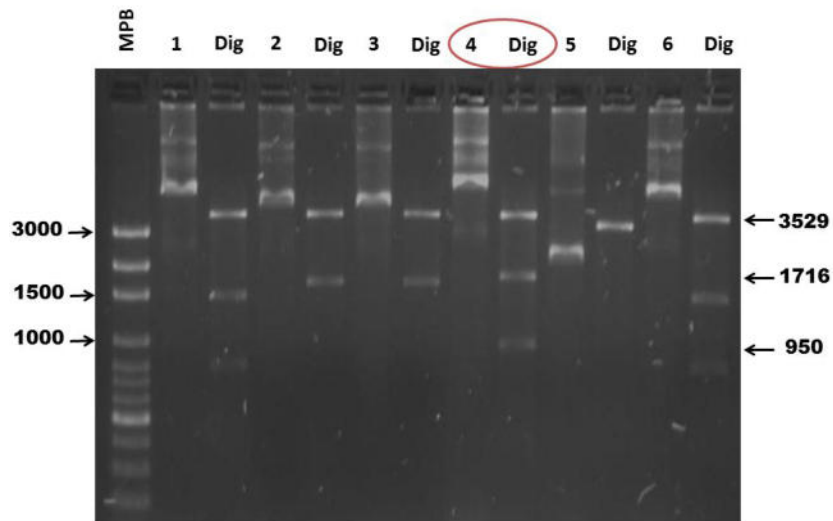
C**D**

Figura 17.- Clonación del gen *ngatg8*. (A) Clonas resistentes a ampicilina, debido a que contenían el vector pET100/D-TOPO ligado al gen *ngatg8*. (B) Las clonas 4, 5 y 6 fueron los candidatos que amplificaron el producto de PCR en el tamaño esperado (círculo rojo). (C) El DNA plasmídico de las clonas 4, 5 y 6 se digirió con la enzima HincII y los productos se analizaron en un gel de agarosa, donde observamos en la clona 4 la liberación de un fragmento de 950 pares de bases, el cual indica la correcta ligación y orientación del inserto (círculo rojo). (D) Electroferograma de la secuenciación del inserto en la clona 4, usando el iniciador sentido de la región promotora T7. Se indican algunos aminoácidos al inicio de la secuencia que codifica para la proteína NgAtg8 (**MKYKEDPE**), la glicina 116 (**G**) y el codón de paro de la proteína (**Stop**).

Posteriormente, se realizaron los ensayos de expresión de la proteína recombinante. Mediante SDS-PAGE se detectó la sobreexpresión de una proteína de 18 kDa en los extractos de bacterias transformadas con la construcción que contenía al gen *ngatg8* y que fueron inducidas con IPTG (Fig. 18A). Este peso corresponde al esperado para la proteína NgAtg8 recombinante, la cual está fusionada a una etiqueta de 6 histidinas codificadas por el vector y que fue utilizada para su purificación mediante columnas de agarosa/níquel. Esta purificación fue corroborada mediante ensayos de WB utilizando anticuerpos contra la etiqueta de 6 histidinas (Fig. 18B). Posteriormente, se inmunizó a un conejo con la proteína recombinante para obtener anticuerpos policlonales anti-NgAtg8. La producción de anticuerpos fue corroborada mediante ensayos de WB utilizando como sustrato a la proteína recombinante purificada (Fig. 18C).

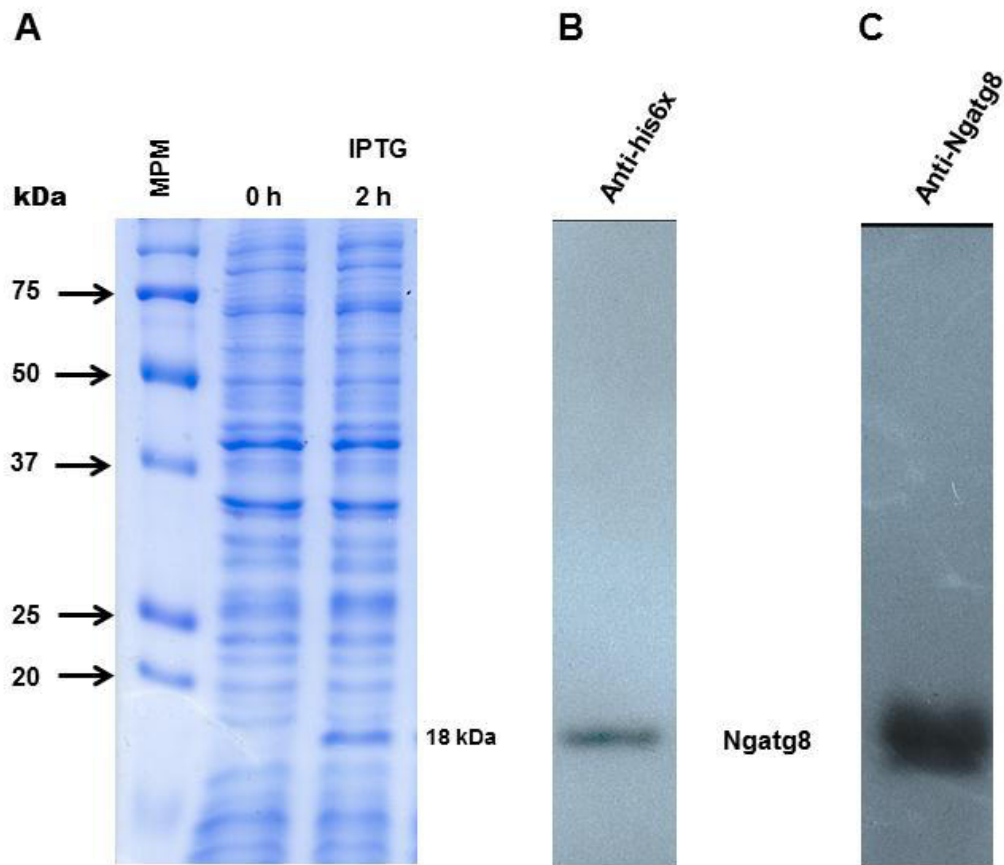


Figura 18.- Purificación de la proteína recombinante NgAtg8 y producción de anticuerpos policlonales. (A) Las bacterias transformadas con la construcción de interés fueron incubadas con IPTG y la inducción de la proteína recombinante se analizó mediante SDS-PAGE, en donde se observó la sobreexpresión de una banda de 18 kDa a las 2 h de inducción. (B) WB dirigido contra la cola de 6 histidinas, usando la proteína recombinante purificada como sustrato. (C) WB contra la proteína recombinante, utilizando los anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante producidos en el conejo.

6.7 Localización celular de NgAtg8 durante la inducción con rapamicina

La rapamicina ha sido descrita como un inhibidor de la cinasa TOR, lo que conlleva a la activación directa de la autofagia [112, 113]. Los trofozoítos de *N. gruberi* inducidos con rapamicina fueron procesados para ensayos de localización celular de la proteína NgAtg8 mediante microscopía confocal, utilizando los anticuerpos policlonales producidos en conejo.

Los cultivos amibianos inducidos con rapamicina no mostraron un incremento en la marca de NgAtg8 a las 3 h post-inducción, en comparación con los trofozoítos control no inducidos (0 h) (Fig. 19). Sin embargo, los trofozoítos inducidos durante 9 h mostraron una marca positiva de NgAtg8 en su citoplasma, y en algunas zonas se podían distinguir agregados de esta señal (Fig. 19). Posteriormente, a las 12 h post-inducción se observó un incremento en la marca de NgAtg8, presentándose como estructuras vacuolares en el citoplasma de los trofozoítos (Fig. 19). Finalmente, a las 24 h post-inducción la marca de NgAtg8 ya no fue detectada; por otro lado, pero a ese mismo tiempo se observó la marca evidente de LysoTracker (Fig. 19), lo cual podría indicar el comienzo de la degradación del contenido vacuolar.

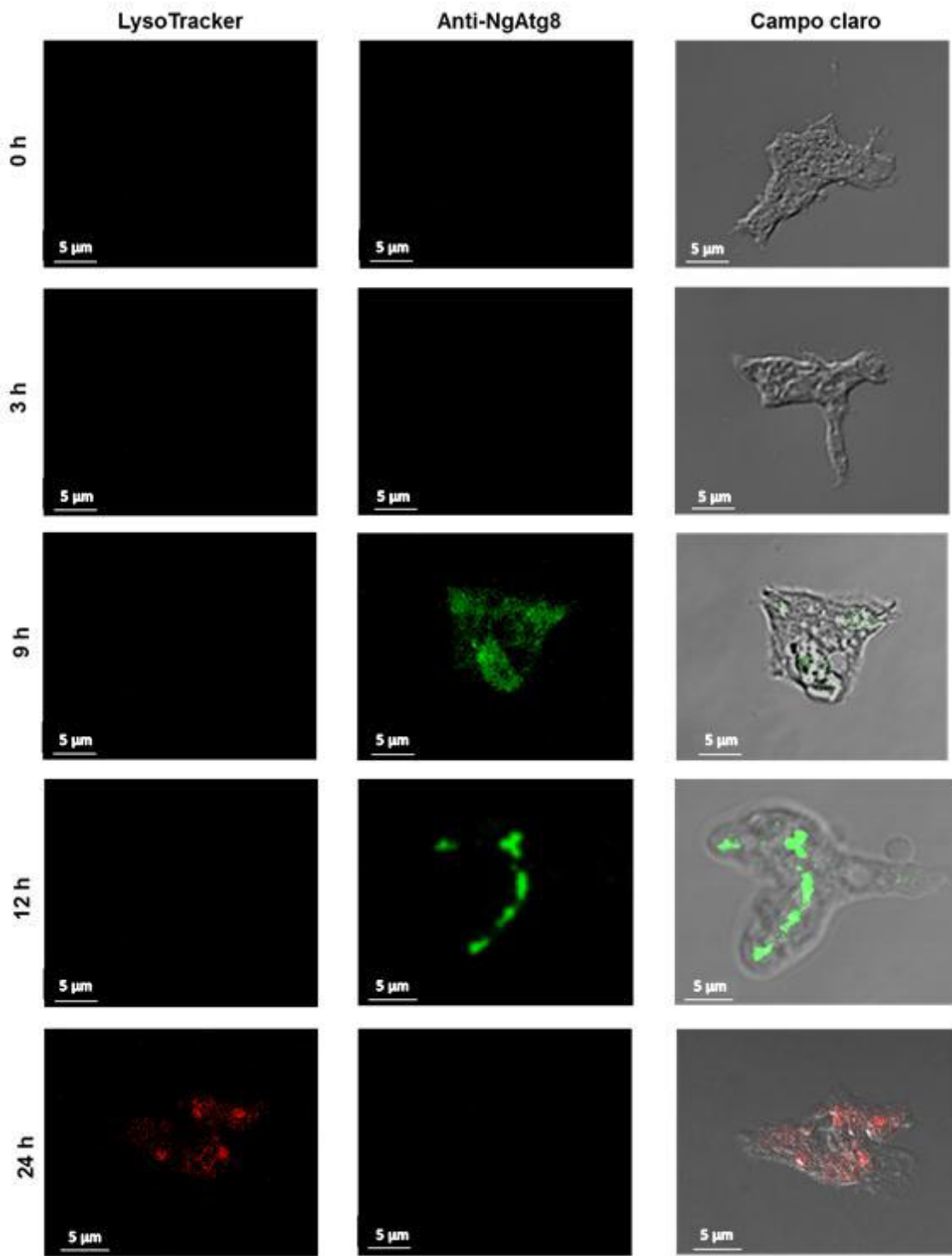


Figura 19.- Localización celular de NgAtg8 en trofozoítos inducidos con rapamicina. Utilizando los anticuerpos policlonales generados contra la proteína recombinante NgAtg8, mediante microscopía confocal se observó un incremento en la marca de NgAtg8 (verde; FITC), mostrándose como una marca citoplasmática tipo vacuolar en los trofozoítos inducidos con rapamicina durante 9 y 12 h. Posteriormente, a las 24 h la marca de Atg8 desapareció, sin embargo se observó un incremento en la aparición de vacuolas ácidas (rojo; LysoTracker) a las 24 h. Barras = 5 μ m.

6.8 Localización celular de NgAtg8 durante el enquistamiento

Se sabe que el proceso de autofagia participa en varios eventos celulares como la deficiencia de nutrientes, el crecimiento y desarrollo celular, así como también durante el cambio de fase en algunos microorganismos [131, 133]. Por tal motivo, se procedió a realizar la inmunolocalización de la proteína NgAtg8 mediante microscopía confocal en trofozoítos de *N. gruberi* inducidos a enquistamiento. Primero se realizó la estandarización del proceso de enquistamiento en *N. gruberi*, observándose a las 2 semanas post-inducción la formación de células redondeadas con una doble pared refringente, que sugerían la formación de quistes (Fig. 20A). Esto fue corroborado con la tinción de blanco de calcofluor en donde se pudo observar la marca fluorescente en las células redondeadas (Fig. 20A). Con respecto a los resultados de inmunomarcaje de NgAtg8, se observó que los trofozoítos control (no inducidos) no mostraron ninguna marca positiva a esta proteína. Sin embargo, a los 5 días de inducción se observó una marca positiva de NgAtg8, principalmente en los trofozoítos que comenzaban a adquirir una forma redondeada y una disminución de tamaño (Fig. 20B), los cuales fueron considerados como posibles formas pre-quísticas. Por otro lado, a este mismo tiempo de inducción, aquellas células que aun conservaban la morfología y tamaño característico de los trofozoítos, parecían mostrar solo una débil marca o incluso carecer de ella (Fig. 20B). La marca de NgAtg8 fue observada también a los 10 días de inducción (Fig. 20B), en donde solo se pueden apreciar estructuras pre-quísticas. La marca en ambos tiempos (5 y 10 días) se identificó como pequeñas estructuras tipo vesiculares en el citoplasma de los pre-quistes (Fig. 20B). Finalmente, a los 15 días de inducción la marca ya no fue observada en los quistes ya maduros (Fig. 20B).

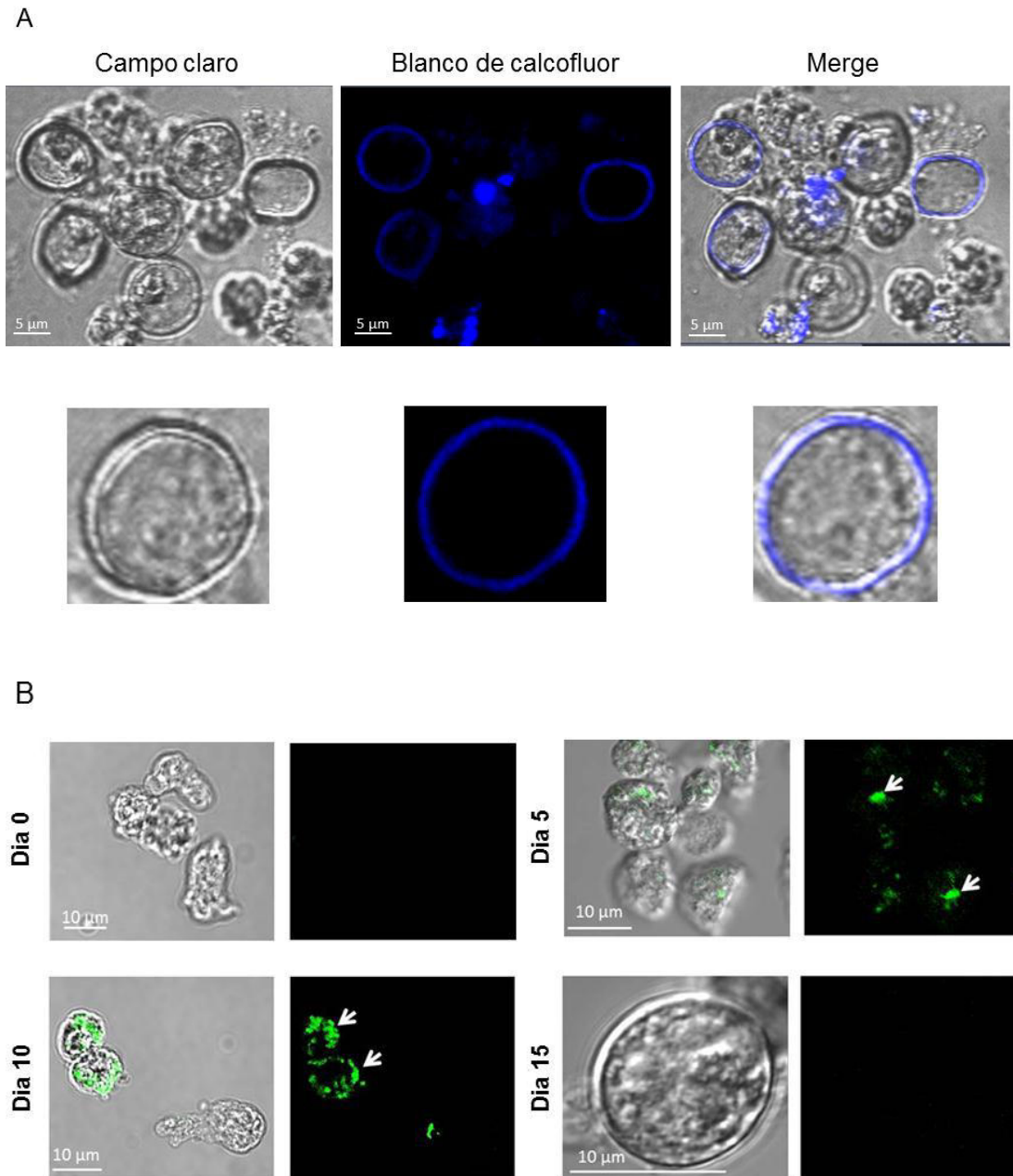


Figura 20.- Detección de NgAtg8 durante el enquistamiento por microscopía confocal. (A) Inducción del enquistamiento de *N. gruberi* durante 15 días. La formación de quistes fue corroborada tiñendo la pared quística con blanco de calcofluor. Barras = 5 μm (B) Inmunomarcaje de NgAtg8 durante el proceso de enquistamiento de *N. gruberi*. La marca de NgAtg8 (flechas) fue observada solo en estructuras pre-quísticas a los 5 y 10 días de inducción. Por otro lado, no se observó marca aparente en los trofozoítos control no inducidos. La marca no se detectó en los quistes completamente formados a los 15 días. Barras = 10 μm .

Basados en los resultados obtenidos por microscopía confocal, se realizaron ensayos de inmunomarcaje de NgAtg8 utilizando MET para corroborar la marca en las vacuolas autofágicas de los trofozoítos de *N. gruberi* inducidos a enquistamiento durante 5 y 10 días. Los resultados mostraron una marca positiva para NgAtg8 dentro de las vacuolas autofágicas en ambos tiempos, mientras que en los trofozoítos control (no inducidos), no se observaron partículas de oro coloidal (Fig. 21).

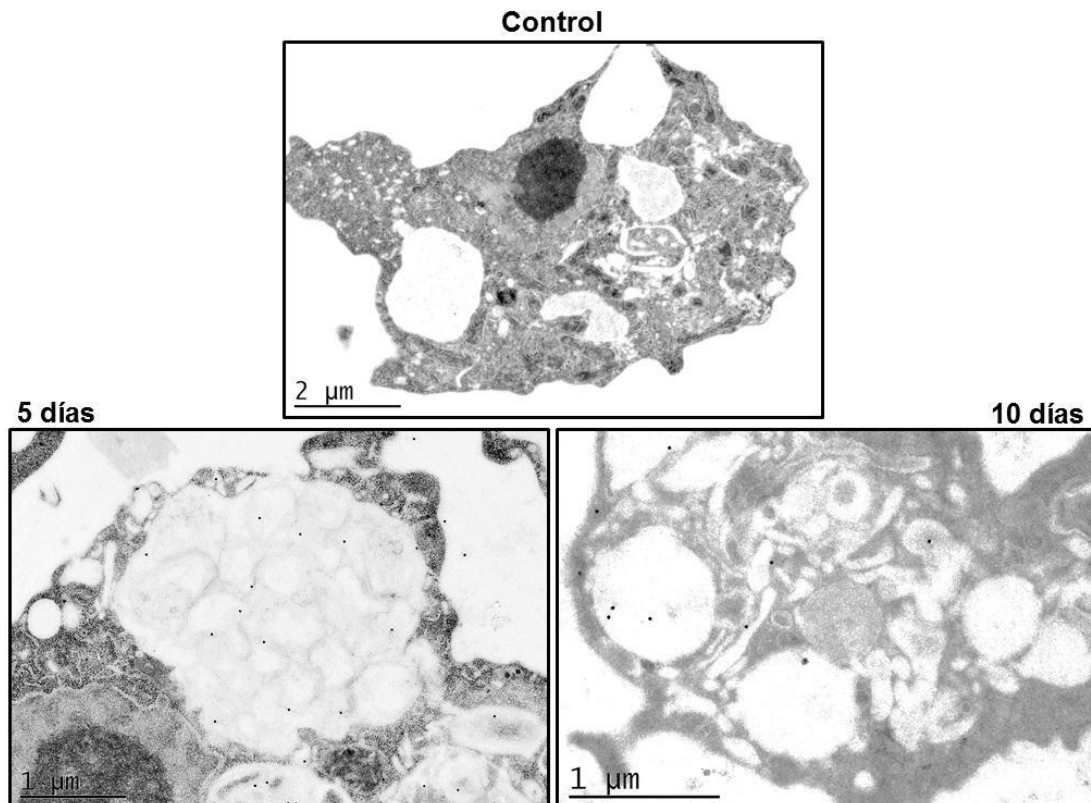


Figura 21.- Localización de NgAtg8 durante el enquistamiento por MET. El marcaje con oro coloidal de la proteína NgAtg8 fue evaluado mediante ensayos de MET. Se observó una marca positiva a NgAtg8 en las vacuolas autofágicas de los trofozoítos de *N. gruberi* inducidos a enquistamiento durante 5 y 10 días. Barra = 1 μm. La marca no fue identificada en los trofozoítos control no inducidos. Barra = 2 μm.

7 DISCUSIÓN

La autofagia fue descrita por Christian de Duve en células hepáticas de rata [86, 87]. Posteriormente, se ha utilizado a la levadura *S. cerevisiae* como modelo de estudio para la descripción de este mecanismo [107]. Hasta la fecha este mecanismo ha sido caracterizado en una gran variedad de organismos, participando en diferentes procesos celulares como el crecimiento celular, el reciclaje de nutrientes, la muerte celular programada y durante la diferenciación celular [88, 125, 131, 133, 140]. Con respecto a la autofagia en el género *Naegleria*, algunos autores han descrito, mediante microscopía electrónica de transmisión, que durante el tratamiento con anfotericina B los cultivos de *Naegleria spp.* forman estructuras citoplasmáticas similares a vacuolas autofágicas [141]. Otros autores han descrito mediante análisis *in silico* del genoma de *N. gruberi* la posible existencia de una maquinaria autofágica completa [102]. Sin embargo, este mecanismo aún no ha sido estudiado detalladamente a nivel experimental en estas amibas, por lo que en el presente proyecto decidimos estudiarlo y caracterizarlo mediante la inducción con rapamicina, un inhibidor de la serina/treonina cinasa TOR, utilizando principalmente a la proteína Atg8 como indicador de la autofagia en los trofozoítos de *N. gruberi*.

La rapamicina es un macrólido producido por *Streptomyces hygroscopicus* [142-144], el cual inhibe a la cinasa TOR mediante la formación de un complejo con la proteína FKBP12, activando así indirectamente la autofagia debido a que TOR es considerado el principal inhibidor de la maquinaria de inducción de la autofagia [114]. Por lo cual, la rapamicina es comúnmente utilizada como inductor de este mecanismo en una gran variedad de células, sin embargo la dosis empleada puede variar desde concentraciones nanomolares (nM) hasta micromolares (μM) según la célula a estudiar [109, 112, 145]. En este estudio, se utilizó una concentración de 5 μM de rapamicina para inducir la autofagia en trofozoítos de *N. gruberi*. Los ensayos de viabilidad y proliferación mostraron que esta concentración no afectaba la viabilidad ni el crecimiento de los cultivos, pero si fue capaz de inducir el mecanismo de autofagia.

Como parte de la descripción de este mecanismo, observamos e identificamos los cambios a nivel ultraestructural que se generaron durante la autofagia en esta ameba de vida libre. En organismos como *S. cerevisiae* se ha reportado la formación de vacuolas que contienen material citoplasmático dentro de las mismas, el cual es llevado a la degradación por la vía lisosomal [84, 88, 89]. En nuestros resultados, se observó la formación de vacuolas con contenido citoplasmático, incluso organelos completos como las mitocondrias, por lo cual sugiere fuertemente que dichas vacuolas podrían pertenecer a vacuolas autofágicas. Estas evidencias son similares a lo reportado en algunos protozoarios como *Tritrichomonas foetus*, donde se observó que durante la autofagia inducida por deficiencia de suero, los hidrogenosomas se encontraron dentro de vacuolas autofágicas para su posterior degradación [146].

Debido a que la presencia de vacuolas en el citoplasma de *N. gruberi* puede deberse a la activación de otros mecanismos como la fagocitosis, se realizaron ensayos de qRT-PCR para analizar la expresión relativa de un fragmento del mensajero de *ngatg8*, una molécula tipo ubiquitina que se encarga de marcar específicamente a los autofagosomas [105, 106], para corroborar que las vacuolas inducidas por la rapamicina pertenecieran al tipo autofágicas. Los resultados mostraron una sobreexpresión de *ngatg8* en trofozoítos inducidos con rapamicina, confirmándonos a nivel genético la inducción específica de la maquinaria autofágica. La sobre-expresión del gen *atg8* durante la autofagia ha sido demostrada en otros microorganismos como *T. brucei*, *L. major* y *E. histolytica* [105, 129, 132, 147].

La formación de la vacuola autofágica es considerada un paso intermedio durante el desarrollo del mecanismo de autofagia, ya que una vez formada, ésta se fusiona con los lisosomas, los cuales proporcionan las enzimas necesarias para degradar el contenido vacuolar [84, 85, 87, 89, 107]. Esta fusión conlleva a la acidificación del ahora denominado autofagolisosoma. Por lo cual, un incremento en la acidificación de las vacuolas citoplasmáticas puede ser considerado también como otra característica distintiva de la autofagia, indicando la culminación del evento *per se*, sugiriendo la degradación del material contenido en las vacuolas [84, 85, 102]. Debido a esto, fue de nuestro interés corroborar este evento mediante microscopía confocal, utilizando al LysoTracker como marcador de acidificación en las amebas

inducidas con rapamicina. Los trofozoítos tratados con rapamicina mostraron un incremento de la señal positiva de LysoTracker en tiempos largos de inducción (18, 24 y 48 h). Estos resultados concuerdan con lo previamente mencionado, pues la acidificación se detectó en tiempos posteriores a los observados durante la sobreexpresión del mensajero de *ngatg8* por qRT-PCR y a la formación de las vacuolas autofágicas observadas por MET.

El estudio de la autofagia en *N. gruberi* estaba limitado solamente a la descripción teórica de la maquinaria Atg; utilizando como molde las secuencias canónicas de la levadura *S. cerevisiae*, se reportó la presencia de dos posibles secuencias homólogas a Atg8 en esta amiba de vida libre [102]. En este proyecto se realizó la búsqueda y selección del principal candidato a proteína homóloga de Atg8 en *N. gruberi*. La proteína fue seleccionada tomando en cuenta su similitud e identidad con la proteína Atg8 de *S. cerevisiae*. Ambas proteínas poseen una alta homología entre sí, indicando que esta molécula se encuentra altamente conservada entre estos dos reinos. Además, durante el alineamiento fueron identificados algunos residuos como lo fue un sitio de lipidación, en el cual se sabe que Atg8 es ligado a una PE en una reacción mediada por Atg7, Atg4 y Atg3 [84, 105, 137]. Otro dominio encontrado fue el dominio de unión a Atg7, el cual cumple un papel importante en la unión de Atg8 a su complejo de procesamiento. Se ha demostrado que en otras amibas de vida libre como *D. discoideum*, la eliminación de este dominio afecta la correcta inducción de la autofagia durante la deficiencia de nutrientes [137]. Debido a estos hallazgos, denominamos a esta secuencia como NgAtg8.

Para evaluar con más detalle el mecanismo de autofagia en *N. gruberi*, se realizaron ensayos de inmunolocalización de NgAtg8, utilizando anticuerpos policlonales producidos contra la proteína recombinante de NgAtg8, en amibas inducidas con rapamicina. Mediante microscopía confocal se observó un incremento en la señal de NgAtg8 en trofozoítos inducidos a autofagia. La proteína NgAtg8 fue localizada a lo largo del citoplasma como una señal dispersa y en pequeñas estructuras vesiculares. Estas estructuras poseen una notable concentración de NgAtg8, lo que indica que podrían representar a las estructuras denominadas PAS, las cuales han sido descritas como el sitio exclusivo en donde se ensamblan las vacuolas

autofágicas y se caracterizan por la acumulación de Atg8 durante la expansión del fagóforo [117, 148]. Sin embargo, la búsqueda de moléculas como Atg1, Atg13, Atg 11 u otras proteínas que forman parte del complejo inductor de autofagia, podrían ser utilizadas para reforzar la formación y descripción de PAS en *N. gruberi*, tal y como ha sido descrito en *S. cerevisiae* [117, 148].

Por otro lado, se ha reportado la participación de la autofagia en distintos mecanismos como la deficiencia de nutrientes en *B. hominis* y *T. foetus*, durante la diferenciación hacia esporas de la amiba de vida libre *D. discoideum*, así como también durante el enquistamiento de *E. invadens* y *A. castellanii* [126, 131, 133, 134, 146, 149]. Debido al aparente papel que cumple este mecanismo durante el cambio de fase de estos protozoarios, se procedió a evaluar si la autofagia se encuentra inducida durante el fenómeno de enquistamiento en *N. gruberi*. La inducción de quistes fue llevada a cabo mediante el cultivo de la amiba en agar no nutritivo y en presencia de *E. aerogenes* inactivada por calor [24, 82]. El estudio de los componentes de la pared quística de *N. gruberi* ha sido previamente reportado por Werth y cols. Estos autores identificaron por digestión alcalina con KOH, la presencia de un compuesto con características similares a la celulosa [81]. Por lo cual, en este proyecto utilizamos la tinción con blanco de calcofluor para corroborar la formación de los quistes. Por otro lado, mediante microscopía confocal se observó un incremento en la marca positiva de NgAtg8 solamente en el citoplasma de los pre-quistes. Esta marca fue corroborada mediante microscopía electrónica de transmisión, lo cual permitió observar con mayor detalle el marcaje dentro de las vacuolas autofágicas. Estos resultados demostraron que el mecanismo de autofagia fue inducido durante el proceso de enquistamiento y sugieren fuertemente su participación durante el cambio de fase en *N. gruberi*.

8 CONCLUSIÓN

- Por primera vez se demuestra experimentalmente que la especie no patógena *N. gruberi* cuenta con un homólogo de la proteína Atg8, necesaria para llevar a cabo el mecanismo de autofagia ante la inducción farmacológica con rapamicina y para el cambio de fase de trofozoíto a quiste en esta amiba de vida libre.

9 PERSPECTIVAS

- Inhibir el mecanismo de autofagia mediante el silenciamiento del gen *ngatg8* para evaluar su papel durante el proceso de enquistamiento en *N. gruberi*.
- Describir experimentalmente la existencia de las moléculas que conforman la vía de inducción de la autofagia (TOR, Atg1 y Atg13).
- Identificar a la proteína Atg12 de *N. gruberi* y evaluar su expresión durante el enquistamiento en esta amiba de vida libre.
- Evaluar el papel de la autofagia en los mecanismos de patogenicidad *in vitro* e *in vivo* de *N. fowleri* mediante el bloqueo de la vía con el inhibidor 3-metiladenina.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Jonckheere JF. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental parasitology*. 2014;145 Suppl:S2-9. Epub 2014/08/12.
2. Dingle AD, Fulton C. Development of the flagellar apparatus of *Naegleria*. *The Journal of cell biology*. 1966;31(1):43-54. Epub 1966/10/01.
3. Fulton C. Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Annual review of microbiology*. 1977;31:597-629. Epub 1977/01/01.
4. Chang SL. Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba. *Folia parasitologica*. 1979;26(3):195-200. Epub 1979/01/01.
5. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*. 1997;7(1):583-98. Epub 1997/01/01.
6. Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol*. 1994;20(3):225-41. Epub 1994/01/01.
7. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2007;50(1):1-26. Epub 2007/04/13.
8. Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological reviews*. 1988;52(1):114-33. Epub 1988/03/01.
9. Baverstock PR, Illana S, Christy PE, Robinson BS, Johnson AM. srRNA evolution and phylogenetic relationships of the genus *Naegleria* (Protista: Rhizopoda). *Molecular biology and evolution*. 1989;6(3):243-57. Epub 1989/05/01.
10. De Jonckheere JF. Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Annales de microbiologie*. 1982;133(2):319-42. Epub 1982/03/01.
11. Kilvington S, White DG. Rapid identification of thermophilic *Naegleria*, including *Naegleria fowleri* using API ZYM system. *Journal of clinical pathology*. 1985;38(11):1289-92. Epub 1985/11/01.
12. Thong YH, Ferrante A. Migration patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. *Infection and immunity*. 1986;51(1):177-80. Epub 1986/01/01.
13. De Jonckheere JF. Sequence Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacers, Including the 5.8S rDNA, of *Naegleria* spp. *Protist*. 1998;149(3):221-8. Epub 1998/09/01.

14. Schuster F. An Electron Microscope Study of the Amoeba-Flagellate, *Naegleria Gruberi* (Schardinger). I. The Amoeboid and Flagellate Stages. The Journal of protozoology. 1963;10:297-313. Epub 1963/08/01.
15. Chang SL. Cultural, cytological and ecological observations on the amoeba stage of *Naegleria gruberi*. Journal of general microbiology. 1958;18(3):565-78. Epub 1958/06/01.
16. Fulton C, Lai EY, Lamoyi E, Sussman DJ. *Naegleria* actin elicits species-specific antibodies. The Journal of protozoology. 1986;33(3):322-7. Epub 1986/08/01.
17. Schuster FL. Ultrastructure of mitosis in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. Tissue & cell. 1975;7(1):1-11. Epub 1975/01/01.
18. Fulton C, Dingle AD. Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*. The Journal of cell biology. 1971;51(3):826-36. Epub 1971/12/01.
19. Preston TM, King CA. An experimental study of the interaction between the soil amoeba *Naegleria gruberi* and a glass substrate during amoeboid locomotion. Journal of cell science. 1978;34:145-58. Epub 1978/12/01.
20. Feldman MR. *Naegleria fowleri*: fine structural localization of acid phosphatase and heme proteins. Experimental parasitology. 1977;41(2):283-9. Epub 1977/04/01.
21. Chang SL. Cytological and ecological observations on the flagellate transformation of *Naegleria gruberi*. Journal of general microbiology. 1958;18(3):579-85. Epub 1958/06/01.
22. Patterson M, Woodworth TW, Marciano-Cabral F, Bradley SG. Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. Journal of bacteriology. 1981;147(1):217-26. Epub 1981/07/01.
23. Schuster F. An Electron Microscope Study of the Amoeba-Flagellate, *Naegleria Gruberi* (Schardinger). Ii. The Cyst Stage. The Journal of protozoology. 1963;10:313-20. Epub 1963/08/01.
24. Chavez-Munguia B, Omana-Molina M, Castanon G, Bonilla P, Gonzalez-Lazaro M, Hernandez-Martinez D, et al. Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. The Journal of eukaryotic microbiology. 2009;56(1):66-72. Epub 2009/04/02.
25. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev. 2002;15(3):342-54. Epub 2002/07/05.

26. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 2004;34(9):1001-27. Epub 2004/08/18.
27. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba sp.*: a preliminary report. *British medical journal.* 1965;2(5464):740-2. Epub 1965/09/25.
28. Butt CG, Baro C, Knorr RW. *Naegleria (sp.)* identified in amebic encephalitis. *American journal of clinical pathology.* 1968;50(5):568-74. Epub 1968/11/01.
29. Ugonabo JA, Gugnani HC. Nasal carriage of *Naegleria fowleri* and its environmental occurrence in Borno State, Nigeria. *The Journal of communicable diseases.* 1989;21(2):111-3. Epub 1989/06/01.
30. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris).* 2012. Epub 2012/04/24.
31. Gupta N, Bhaskar H, Duggal S, Ghalaut PS, Kundra S, Arora DR. Primary amoebic meningoencephalitis: first reported case from Rohtak, North India. *Braz J Infect Dis.* 2009;13(3):236-7. Epub 2010/03/02.
32. De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2011;11(7):1520-8. Epub 2011/08/17.
33. Martinez-Castillo M, Cardenas-Zuniga R, Coronado-Velazquez D, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M. *Naegleria fowleri* after 50 Years: Is it a neglected pathogen? *Journal of medical microbiology.* 2016. Epub 2016/07/07.
34. Valenzuela G, Lopez-Corella E, De Jonckheere JF. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78(4):558-9. Epub 1984/01/01.
35. Lopez-Corella E, De Leon B, de Jonckheere JF. [Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in an adolescent from Huetamo, Michoacan, Mexico]. *Boletin medico del Hospital Infantil de Mexico.* 1989;46(9):619-22. Epub 1989/09/01. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo, Michoacan, Mexico.
36. Lares-Villa F, De Jonckheere JF, De Moura H, Rechi-Iruretagoyena A, Ferreira-Guerrero E, Fernandez-Quintanilla G, et al. Five cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *J Clin Microbiol.* 1993;31(3):685-8. Epub 1993/03/01.

37. Cervantes-Sandoval I, de Serrano-Luna JJ, Tapia-Malagon JL, Pacheco-Yopez J, Silva-Olivares A, Galindo-Gomez S, et al. Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2007;59(5):342-7. Epub 2008/02/14.
38. John DT, Nussbaum SL. *Naegleria fowleri* infection acquired by mice through swimming in amebae-contaminated water. *The Journal of parasitology*. 1983;69(5):871-4. Epub 1983/10/01.
39. Martinez AJ, Nelson EC, Jones MM, Duma RJ, Rosenblum WI. Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1971;25(5):465-75. Epub 1971/11/01.
40. Martinez J, Duma RJ, Nelson EC, Moretta FL. Experimental naegleria meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1973;29(2):121-33. Epub 1973/08/01.
41. Sugita Y, Fujii T, Hayashi I, Aoki T, Yokoyama T, Morimatsu M, et al. Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Pathology international*. 1999;49(5):468-70. Epub 1999/07/27.
42. Grace E, Asbill S, Virga K. *Naegleria fowleri*: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment Options. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(11):6677-81. Epub 2015/08/12.
43. Sparagano O. Differentiation of *Naegleria fowleri* and other Naegleriae by polymerase chain reaction and hybridization methods. *FEMS microbiology letters*. 1993;110(3):325-30. Epub 1993/07/01.
44. Sparagano O, Drouet E, Brebant R, Manet E, Denoyel GA, Pernin P. Use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (cysts, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species. *Journal of clinical microbiology*. 1993;31(10):2758-63. Epub 1993/10/01.
45. Tiewcharoen S, Junnu V, Sassa-deepaeng T, Waiyawuth W, Ongrothchanakul J, Wankhom S. Analysis of the 5.8S rRNA and internal transcribed spacers regions of the variant *Naegleria fowleri* Thai strain. *Parasitology research*. 2007;101(1):139-43. Epub 2007/02/07.
46. Boyle AL, Friedman TA, Braunstein H, Tomasulo M. Rapid diagnosis of primary meningoencephalitis due to *Naegleria*: detection of organisms with bacterial stains. *Journal of clinical pathology*. 1979;32(3):306-7. Epub 1979/03/01.

47. Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F. A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water research*. 2007;41(1):118-26. Epub 2006/11/14.
48. Siddiqui R, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(8):e3017. Epub 2014/08/15.
49. Baig AM, Khan NA. Novel chemotherapeutic strategies in the management of primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2014;20(3):289-90. Epub 2014/01/25.
50. Carter RF. Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria sp.* isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. *Journal of clinical pathology*. 1969;22(4):470-4. Epub 1969/07/01.
51. Gautam PL, Sharma S, Puri S, Kumar R, Midha V, Bansal R. A rare case of survival from primary amoebic meningoencephalitis. *Indian J Crit Care Med*. 2012;16(1):34-6. Epub 2012/05/05.
52. Jain R, Prabhakar S, Modi M, Bhatia R, Sehgal R. *Naegleria meningitis*: a rare survival. *Neurology India*. 2002;50(4):470-2. Epub 2003/02/11.
53. Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 1999;1(4):273-83. Epub 2001/06/29.
54. Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clinical microbiology reviews*. 1996;9(4):512-31. Epub 1996/10/01.
55. Fritz-Laylin LK, Ginger ML, Walsh C, Dawson SC, Fulton C. The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Research in microbiology*. 2011;162(6):607-18. Epub 2011/03/12.
56. Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, et al. The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell*. 2010;140(5):631-42. Epub 2010/03/10.
57. Opperdoes FR, De Jonckheere JF, Tielens AG. *Naegleria gruberi* metabolism. *International journal for parasitology*. 2011;41(9):915-24. Epub 2011/07/05.
58. Band RN, Balamuth W. Hemin replaces serum as a growth requirement for *Naegleria*. *Applied microbiology*. 1974;28(1):64-5. Epub 1974/07/01.
59. Fulton C. Axenic cultivation of *Naegleria gruberi*. Requirement for methionine. *Experimental cell research*. 1974;88(2):365-70. Epub 1974/10/01.

60. Kyle DE, Noblet GP. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *The Journal of protozoology*. 1985;32(1):99-105. Epub 1985/02/01.
61. Fritz-Laylin LK, Fulton C. *Naegleria*: a classic model for de novo basal body assembly. *Cilia*. 2016;5:10. Epub 2016/04/06.
62. Fritz-Laylin LK, Levy YY, Levitan E, Chen S, Cande WZ, Lai EY, et al. Rapid centriole assembly in *Naegleria* reveals conserved roles for both de novo and mentored assembly. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2016;73(3):109-16. Epub 2016/02/14.
63. Clark CG, Cross GA, De Jonckheere JF. Evaluation of evolutionary divergence in the genus *Naegleria* by analysis of ribosomal DNA plasmid restriction patterns. *Molecular and biochemical parasitology*. 1989;34(3):281-96. Epub 1989/05/15.
64. Preston TM, Cooper LG, King CA. Amoeboid locomotion of *Naegleria gruberi*: the effects of cytochalasin B on cell-substratum interactions and motile behavior. *The Journal of protozoology*. 1990;37(4):6S-11S. Epub 1990/07/01.
65. Preston TM, King CA. Locomotion and phenotypic transformation of the amoeboflagellate *Naegleria gruberi* at the water-air interface. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 2003;50(4):245-51. Epub 2004/05/11.
66. Preston TM, O'Dell DS. Studies on the amoeboid and flagellate stages of *Naegleria*. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*. 1974;54(4-5):279-86. Epub 1974/01/01.
67. Fritz-Laylin LK, Cande WZ. Ancestral centriole and flagella proteins identified by analysis of *Naegleria* differentiation. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 23):4024-31. Epub 2010/11/04.
68. Fulton C, Walsh C. Cell differentiation and flagellar elongation in *Naegleria gruberi*. Dependence on transcription and translation. *The Journal of cell biology*. 1980;85(2):346-60. Epub 1980/05/01.
69. Fulton C, Lai EY, Remillard SP. A flagellar calmodulin gene of *Naegleria*, coexpressed during differentiation with flagellar tubulin genes, shares DNA, RNA, and encoded protein sequence elements. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(11):5839-48. Epub 1995/03/17.
70. Willmer EN. Further observations on the metaplasia of an amoeba, *Naegleria gruberi*. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1958;6(2):187-214. Epub 1958/06/01.
71. Dingle AD. Cellular and environmental variables determining numbers of flagella in temperature-shocked *Naegleria*. *The Journal of protozoology*. 1979;26(4):604-12. Epub 1979/11/01.

72. Mar J, Walsh CJ. Temperature-shock induction of multiple flagella induces additional synthesis of flagellum specific mRNAs and tubulin. *Experimental cell research*. 2008;314(4):896-902. Epub 2008/01/19.
73. Dingle AD. Control of flagellum number in *Naegleria*. Temperature shock induction of multiflagellate cells. *Journal of cell science*. 1970;7(2):463-81. Epub 1970/09/01.
74. Fritz-Laylin LK, Assaf ZJ, Chen S, Cande WZ. *Naegleria gruberi* de novo basal body assembly occurs via stepwise incorporation of conserved proteins. *Eukaryotic cell*. 2010;9(6):860-5. Epub 2010/04/20.
75. Han JW, Park JH, Kim M, Lee J. mRNAs for microtubule proteins are specifically colocalized during the sequential formation of basal body, flagella, and cytoskeletal microtubules in the differentiation of *Naegleria gruberi*. *The Journal of cell biology*. 1997;137(4):871-9. Epub 1997/05/19.
76. Kowitz JD, Fulton C. Programmed synthesis of tubulin for the flagella that develop during cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(7):2877-81. Epub 1974/07/01.
77. Lai EY, Remillard SP, Fulton C. The alpha-tubulin gene family expressed during cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *The Journal of cell biology*. 1988;106(6):2035-46. Epub 1988/06/01.
78. Chiovetti R, Jr. Re-encystment of the amoeboid flagellate *Naegleria gruberi*. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1976;95(1):122-4. Epub 1976/01/11.
79. De Jonckheere J, van de Voorde H. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Applied and environmental microbiology*. 1976;31(2):294-7. Epub 1976/02/01.
80. Engel JP, Rubin AJ, Sproul OJ. Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorinated cyanurates. *Applied and environmental microbiology*. 1983;46(5):1157-62. Epub 1983/11/01.
81. Werth JM, Kahn AJ. Isolation and preliminary chemical analysis of the cyst wall of the amoeba-flagellate *Naegleria gruberi*. *Journal of bacteriology*. 1967;94(4):1272-4. Epub 1967/10/01.
82. Chavez-Munguia B, Segovia-Gamboa N, Salazar-Villatoro L, Omana-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 2011;58(5):463-8. Epub 2011/09/08.

83. Potter JL, Weisman RA. Differentiation in *Acanthamoeba*: beta-glucan synthesis during encystment. *Biochimica et biophysica acta*. 1971;237(1):65-74. Epub 1971/04/20.
84. Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*. 2003;9(3-4):65-76. Epub 2003/07/17.
85. Dunn WA, Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in cell biology*. 1994;4(4):139-43. Epub 1994/04/01.
86. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal*. 1955;60(4):604-17. Epub 1955/08/01.
87. de Duve C. Lysosomes revisited. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1983;137(3):391-7. Epub 1983/12/15.
88. Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008;4(6):740-3. Epub 2008/06/24.
89. Huang WP, Klionsky DJ. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell structure and function*. 2002;27(6):409-20. Epub 2003/02/11.
90. Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. *Autophagy*. 2008;4(7):920-2. Epub 2008/08/23.
91. Ohsumi Y. [Autophagy in yeast, bulk protein degradation in the vacuole]. *Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society*. 1997;69(1):39-44. Epub 1997/01/01.
92. Ohsumi Y. [Autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme*. 1994;39(4):632-9. Epub 1994/03/01.
93. Ohsumi Y, Ohsumi M, Baba M. [Autophagy in yeast]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme*. 1993;38(1):46-52. Epub 1993/01/01.
94. Ohsumi Y. [Autophagy related genes in yeast, *S. cerevisiae*]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme*. 2006;51(10 Suppl):1453-6. Epub 2006/08/23.
95. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell research*. 2014;24(1):9-23. Epub 2013/12/25.
96. Ohsumi Y. [Historical overview of autophagy]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme*. 2006;51(10 Suppl):1444-7. Epub 2006/08/23.
97. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(3):211-6. Epub 2001/03/27.

98. Ohsumi Y. Molecular mechanism of autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. 1999;354(1389):1577-80; discussion 80-1. Epub 1999/12/03.
99. Ohsumi Y. [Thoughts on my studies on autophagy in yeast]. Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme. 2008;53(16 Suppl):2200-1. Epub 2008/12/01.
100. Ohsumi Y, Mizushima N. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. Seminars in cell & developmental biology. 2004;15(2):231-6. Epub 2004/06/24.
101. Ohsumi Y. Yoshinori Ohsumi: autophagy from beginning to end. Interview by Caitlin Sedwick. The Journal of cell biology. 2012;197(2):164-5. Epub 2012/04/18.
102. Brennand A, Gualdrón-Lopez M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PA. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. Molecular and biochemical parasitology. 2011;177(2):83-99. Epub 2011/02/15.
103. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Developmental cell. 2003;5(4):539-45. Epub 2003/10/11.
104. Klionsky DJ, Codogno P, Cuervo AM, Deretic V, Elazar Z, Fuego-Margareto J, et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. Autophagy. 2010;6(4). Epub 2010/05/21.
105. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO reports. 2008;9(9):859-64. Epub 2008/08/16.
106. Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. Molecular biology of the cell. 2008;19(8):3290-8. Epub 2008/05/30.
107. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Nature reviews Molecular cell biology. 2009;10(7):458-67. Epub 2009/06/06.
108. Rich KA, Burkett C, Webster P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. Cell Microbiol. 2003;5(7):455-68. Epub 2003/06/20.
109. King JS, Veltman DM, Insall RH. The induction of autophagy by mechanical stress. Autophagy. 2011;7(12):1490-9. Epub 2011/10/26.
110. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. The Journal of cell biology. 2000;150(6):1507-13. Epub 2000/09/20.

111. Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*. 2008;4(7):851-65. Epub 2008/08/02.
112. Foster DA, Toschi A. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle*. 2009;8(7):1026-9. Epub 2009/03/10.
113. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*. 2010;584(7):1287-95. Epub 2010/01/20.
114. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253(5022):905-9. Epub 1991/08/23.
115. Chan EY, Tooze SA. Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy*. 2009;5(6):758-65. Epub 2009/05/05.
116. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(4):1593-605. Epub 2005/01/22.
117. Suzuki K, Ohsumi Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS letters*. 2010;584(7):1280-6. Epub 2010/02/09.
118. Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdron-Lopez M, Colombo MI, Coombs GH, et al. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011;7(2):127-58. Epub 2010/10/22.
119. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(2):124-31. Epub 2009/12/26.
120. Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2:1528-34. Epub 2005/10/26.
121. Leabu M. Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):423-7. Epub 2006/06/27.
122. Rigden DJ, Michels PA, Ginger ML. Autophagy in protists: Examples of secondary loss, lineage-specific innovations, and the conundrum of remodeling a single mitochondrion. *Autophagy*. 2009;5(6):784-94. Epub 2009/06/02.
123. Ramya V, Rajasekharan R. ATG15 encodes a phospholipase and is transcriptionally regulated by YAP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. 2016;590(18):3155-67. Epub 2016/08/21.
124. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*. 2004;16(6):663-9. Epub 2004/11/09.

125. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(10):2679-88. Epub 2005/10/04.
126. Tekinay T, Wu MY, Otto GP, Anderson OR, Kessin RH. Function of the *Dictyostelium discoideum* Atg1 kinase during autophagy and development. *Eukaryotic cell*. 2006;5(10):1797-806. Epub 2006/10/13.
127. Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(20):17636-45. Epub 2003/03/11.
128. Klionsky DJ, Codogno P, Cuervo AM, Deretic V, Elazar Z, Fueyo-Margareto J, et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy*. 2010;6(4):438-48. Epub 2010/05/21.
129. Koopmann R, Muhammad K, Perbandt M, Betzel C, Duszenko M. *Trypanosoma brucei* ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa. *Autophagy*. 2009;5(8):1085-91. Epub 2009/09/09.
130. Brennand A, Rico E, Michels PA. Autophagy in trypanosomatids. *Cells*. 2012;1(3):346-71. Epub 2012/01/01.
131. Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infection and immunity*. 2008;76(1):278-88. Epub 2007/10/10.
132. Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Tsuboi K, Miyamoto E, Watanabe N, Kawakami E, et al. Atg8 is involved in endosomal and phagosomal acidification in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*. 2015;17(10):1510-22. Epub 2015/04/30.
133. Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH. Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2009;168(1):43-8. Epub 2009/06/30.
134. Song SM, Han BI, Moon EK, Lee YR, Yu HS, Jha BK, et al. Autophagy protein 16-mediated autophagy is required for the encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2012;183(2):158-65. Epub 2012/03/20.
135. Amar N, Lustig G, Ichimura Y, Ohsumi Y, Elazar Z. Two newly identified sites in the ubiquitin-like protein Atg8 are essential for autophagy. *EMBO reports*. 2006;7(6):635-42. Epub 2006/05/09.
136. Yamada Y, Suzuki NN, Hanada T, Ichimura Y, Kumeta H, Fujioka Y, et al. The crystal structure of Atg3, an autophagy-related ubiquitin carrier protein (E2)

enzyme that mediates Atg8 lipidation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(11):8036-43. Epub 2007/01/18.

137. Noda NN, Satoo K, Fujioka Y, Kumeta H, Ogura K, Nakatogawa H, et al. Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. *Molecular cell*. 2011;44(3):462-75. Epub 2011/11/08.

138. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488-92. Epub 2000/12/02.

139. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16.

140. Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Talloczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*. 2005;121(4):567-77. Epub 2005/05/24.

141. Schuster FL, Rechthand E. In vitro effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboid flagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1975;8(5):591-605. Epub 1975/11/01.

142. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics*. 1975;28(10):727-32. Epub 1975/10/01.

143. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics*. 1975;28(10):721-6. Epub 1975/10/01.

144. Cheng YR, Huang J, Qiang H, Lin WL, Demain AL. Mutagenesis of the rapamycin producer *Streptomyces hygroscopicus* FC904. *The Journal of antibiotics*. 2001;54(11):967-72. Epub 2002/02/06.

145. Bommarreddy A, Hahm ER, Xiao D, Powolny AA, Fisher AL, Jiang Y, et al. Atg5 regulates phenethyl isothiocyanate-induced autophagic and apoptotic cell death in human prostate cancer cells. *Cancer research*. 2009;69(8):3704-12. Epub 2009/04/02.

146. Benchimol M. Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 1999;91(3):165-74. Epub 1999/07/30.

147. Williams RA, Woods KL, Juliano L, Mottram JC, Coombs GH. Characterization of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Autophagy*. 2009;5(2):159-72. Epub 2008/12/11.

148. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO journal*. 2001;20(21):5971-81. Epub 2001/11/02.

149. Yin J, Ye AJ, Tan KS. Autophagy is involved in starvation response and cell death in *Blastocystis*. *Microbiology*. 2010;156(Pt 3):665-77. Epub 2009/11/17.

ANEXOS

Ubiquitin-like Atg8 protein is expressed during autophagy and the encystation process in *Naegleria gruberi*

Roberto Cárdenas-Zúñiga¹ · Virginia Sánchez-Monroy^{2,3} ·
Rosa María Bermúdez-Cruz⁴ · Mario Alberto Rodríguez¹ · Jesús Serrano-Luna⁵ ·
Mineko Shibayama¹ 

Received: 25 July 2016 / Accepted: 12 October 2016 / Published online: 28 October 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Members of the *Naegleria* genus are free-living amoebae, and the only pathogenic specie described to date for humans is *N. fowleri*. However, as the complete genome of this specie has not been reported, non-pathogenic *N. gruberi* is employed to describe molecular pathways in *N. fowleri*. Regardless, certain mechanisms, such as autophagy, have not yet been characterized in *N. gruberi*. Autophagy is involved in different cellular processes in some protozoa, including the recycling of unnecessary organelles, development, and cell differentiation. In this work, we characterized autophagy in *N. gruberi* using

the specific inducer rapamycin. The formation of autophagy vacuoles in treated trophozoites was observed by ultra-structural analysis, and real time quantitative PCR demonstrated overexpression of the *atg8* gene. In addition, we detected an increase in the vacuolar acidification of treated amoebae using the LysoTracker. Finally, confocal microscopy was utilized to identify Atg8 protein signal in the cytoplasm of *N. gruberi* trophozoites induced with rapamycin and even in trophozoites induced to encyst. In conclusion, *N. gruberi* possesses an Atg8 protein homolog that is overexpressed during the autophagic mechanism induced by rapamycin and also during encystation of this free-living amoeba.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00436-016-5293-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mineko Shibayama
mineko@cinvestav.mx

- ¹ Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico
- ² Multidisciplinary Laboratory of Research, Military School of Graduate in Health, University of the Army and Air Force, Cerrada de Palomas S/N, Col. Lomas de San Isidro, 11620 Mexico City, Mexico
- ³ Laboratory of Molecular Biomedicine, Institutional Program of Molecular Biomedicine, National School of Medicine and Homeopathy, St. Guillermo Massieu H. 239, Col. La escalera, 07320 Mexico City, Mexico
- ⁴ Department of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico
- ⁵ Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico

Keywords Atg8 protein · Autophagy · Encystation · *Naegleria gruberi* · Rapamycin

Introduction

Naegleria fowleri, a free-living amoeba, is considered the only pathogenic specie of the *Naegleria* genus and is the etiological agent of a fulminant infection of the central nervous system called primary amoebic meningoencephalitis (PAM) (Siddiqui and Khan 2014). Infected patients die within approximately 2 weeks after the appearance of symptoms. Unfortunately, no specific treatment is available to date (Kim et al. 2008). Investigation into the cellular biology of this pathogen has attracted attention in recent years because the number of reported cases has increased significantly worldwide (De Jonckheere 2011; Trabelsi et al. 2012). Despite the medical importance of pathogenic *N. fowleri*, non-pathogenic *N. gruberi* has been employed as a model for molecular studies, largely because its genome has recently been described (Fritz-Laylin et al. 2011; Fritz-Laylin et al.

2010). Nonetheless, there are some biological mechanisms that have not yet been characterized in this microorganism, including autophagy. Autophagy is an important and complex molecular pathway that is involved in the recycling of unnecessary molecules and complete organelles (Dunn 1994; Huang and Klionsky 2002; Wang and Klionsky 2003). A complex network of proteins has been described for autophagy, and more than 30 different molecules participating in this process have been identified in *Saccharomyces cerevisiae*; these molecules are termed autophagy (Atg)-related proteins (Huang and Klionsky 2002; Klionsky et al. 2010; Nakatogawa et al. 2009). One of the most representative steps of classical autophagy is the formation and labeling of specific vacuoles. There are two main labeling proteins: Atg12 and Atg8 (Geng and Klionsky 2008). Atg8 is a ubiquitin-like protein, processing at its C-terminal glycine residue by the cysteine protease Atg4 links a phosphatidylethanolamine (PE) in a reaction mediated by Atg7 and Atg3 (Ichimura et al. 2000). Atg8 is directly involved in controlling the size of autophagosomes (Xie et al. 2008a). These ubiquitin-like protein and other molecules involved in autophagy have been theoretically identified in some protozoa, including the free-living amoeba *N. gruberi* (Brennan et al. 2011).

Moreover, participating in the recycling of cytoplasmic components, autophagy is involved in the response to glucose restriction in *Trichomonas vaginalis*, during development in *Dictyostelium discoideum*, during the endosomal acidification of *Entamoeba histolytica*, in the starvation response and cell death of *Blastocystis hominis*, and during encystation in *Entamoeba invadens* and *Acanthamoeba castellanii* (Huang et al. 2014; Moon et al. 2009; Picazarri et al. 2008; Picazarri et al. 2015; Tekinay et al. 2006; Yin et al. 2010). Based on these findings, we sought to investigate the autophagy mechanism in *N. gruberi* and its participation during encystation. To accomplish this aim, we initiated a characterization of autophagy in *N. gruberi* using rapamycin, a specific inducer of this process (Foster and Toschi 2009). By TEM, we observed ultrastructural changes in rapamycin-treated trophozoites such as the presence of autophagic vacuoles at 9 and 12 h post-induction. Moreover, the LysoTracker labeling revealed an important increase in cytoplasmic vacuole acidification at 24 h. We also applied qRT-PCR to analyze the relative mRNA expression of an *atg8* homolog in *N. gruberi* and found overexpression of this molecule at 3, 9, and 12 h post-induction. Finally, specific polyclonal antibodies against the NgAtg8 recombinant protein were employed to evaluate the immunolocalization of native Atg8 in trophozoites induced toward autophagy and during the encystation of *N. gruberi*. In conclusion, our results showed the existence of the autophagy mechanism in *N. gruberi* and this process may be involved in cell differentiation from trophozoite to cyst in this amoeba.

Materials and methods

Amoebic culture, rapamycin interaction, and viability assays

Axenic cultures of *N. gruberi* were grown in 2 % bactocasitone medium (Becton Dickinson, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) at 25 °C. Trophozoites were harvested at the logarithmic growth phase. The induction of autophagy was achieved pharmacologically using the TOR/kinase-inhibitor rapamycin (Invitrogen, Life Technologies, USA). To analyze the effect of rapamycin in *N. gruberi* viability, 3×10^6 trophozoites were incubated in bactocasitone medium supplemented with fetal bovine serum, in serum-free medium, in serum-free medium containing 5 μ M rapamycin, or in serum-free medium with 2.5 μ l/ml DMSO (vehicle control) for 1, 3, 9, 12, 18, 24, and 48 h. The cells were then washed with PBS and harvested to evaluate percent viability using the trypan blue exclusion dye and microscope (Nikon eclipse i90, Nikon Instruments, Japan) visualization. Three independent experiments were performed for each condition.

Transmission electron microscopy (TEM)

To evaluate the ultrastructural changes induced by rapamycin, the treated amoebae were processed for TEM. Briefly, 2×10^7 trophozoites were incubated with rapamycin for 9 and 12 h and fixed with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. The samples were post-fixed with 1 % osmium tetroxide, dehydrated with ethanol and propylene oxide, and embedded in epoxy resin. Semi-thin sections were stained with toluidine blue. The thin sections (60–90 nm) were then contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed under a Zeiss EM-910 transmission electron microscope (Carl Zeiss, Germany).

LysoTracker labeling

Control trophozoites and those induced with 5 μ M of rapamycin were incubated with the LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen, Life Technologies, USA) at 50 nM in PBS for 30 min at 25 °C. The cells were fixed with 2 % paraformaldehyde for 30 min, and nuclei were stained with 0.2 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, USA) for 20 min. The cells were then analyzed using a confocal microscope LSM 700 (Carl Zeiss, Germany). The intensity of the fluorescent LysoTracker signal was determined using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). The total number of pixels of 150 cells from different fields of three independent experiments was evaluated to analyze the fluorescence intensity. The statistical significance was determined by comparing the treated samples against the untreated control (time 0 h) using two-way ANOVA with the GraphPad Prism 6 software.

In silico analyses of the NgAtg8 protein

The amino acid sequence of the Atg8 protein from *S. cerevisiae* (ScAtg8, gi|6319393) was employed as query for a BLASTP search in the *N. gruberi* genome database. The homolog sequence of Atg8 from *N. gruberi* (NgAtg8, gi|284092542) was then analyzed by a multiple alignment using ClustalW Protein Tool from the Biology Workbench database (<http://workbench.sdsc.edu>). In this analysis, we included the Atg8 protein sequences from *S. cerevisiae*, *N. gruberi*, *A. castellanii* (AcAtg8, gi|197321090), *Dictyostelium discoideum* (DdAtg8, gi|28395469), *Drosophila melanogaster* (DmAtg8, gi|24641085), *Homo sapiens* (HsAtg8, gi|6005768), *T. vaginalis* (TvAtg8, gi|123475330), and *E. histolytica* (EhAtg8, gi|67466014).

Relative expression of the *ngatg8* gene by qRT-PCR

Changes in the expression level of the *N. gruberi atg8* gene (ref. XM_002678882.1) were analyzed by qRT-PCR using the *small subunit ribosomal 18s* gene (ref. XM_002682911) as an internal control. Specific primers were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, USA) and synthesized commercially (Invitrogen, Life Technologies, USA). The primers employed for *subunit ribosomal 18s* were F: 5'-GTTATCTGCCAAGGATATGCACAA-3', R: 3'-AGCGTAGAAAGGACTCTCGGG-5'; those for the *atg8* gene were F: 5'-GCCGATCTTACAGTGGCACA-3', R: 3'-CATCATCGTCCTTTTGTCTTCAT-5'. Total RNA from control (untreated amoebae) and trophozoites induced with rapamycin for 0.5, 1, 3, 9, 12, and 18 h was obtained using the TRIzol reagent (Ambion, USA). DNA contamination was eliminated with RNase-free DNase I (Invitrogen, Life Technologies, USA). cDNA was synthesized with the SuperScript First-strand kit (Invitrogen, Life Technologies, USA). qRT-PCR was performed using an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). Melting curve protocols were used to ensure the specificity of the amplification products. The arithmetic formula $2^{-\Delta CT}$ was applied to validate the relative expression of *small subunit ribosomal 18s* as an endogenous control (Livak and Schmittgen 2001). The relative quantification of *atg8* was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001). The statistical significance between untreated and treated trophozoites was calculated by comparison of the means using Tukey's test with the Sigma Stat statistical software version 2.0.

Production of recombinant NgAtg8 and polyclonal antibodies against NgAtg8

We designed primers to amplify the complete coding sequence according to the mRNA sequence of *ngatg8* (gi|290992611).

The primers used were Forward change by F: 5'-CACCATGAAATATAAGGAAGACCCA-3' and Reverse change by R: 5'-CGAATCGTGTGTGATGGTGG-3'. Total RNA purification and cDNA synthesis were performed as was previously mentioned. Amplification was performed using the Platinum PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen, Life Technologies, USA), and the PCR product was inserted into the Champion pET100 D-TOPO vector (Invitrogen, Life Technologies, USA). The construct was sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) to evaluate the integrity.

Overexpression of the recombinant protein was performed in *Escherichia coli* strain BL21 Star (DE3) by incubating with 0.5 mM IPTG for 2 h. Induction of the recombinant protein was visualized by 15 % SDS-PAGE and western blotting using a commercial monoclonal antibody against the polyhistidine tag (Roche Diagnostics, USA). To produce a specific polyclonal antibody against the NgAtg8 protein, 100 µg of recombinant protein was employed to immunize a New Zealand rabbit by subcutaneous inoculation using the TiterMax Classic (Sigma-Aldrich, USA) as an adjuvant. Two subsequent weekly intramuscular immunizations with 100 µg of NgAtg8 were performed to induce the switch to IgG antibodies. The production of antibodies was evaluated by WB assays using pre-immune and immune sera against the recombinant protein.

Immunolocalization of Atg8

Trophozoites induced toward autophagy by rapamycin treatment for 9 and 12 h were fixed in 2 % paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature. The samples were washed with PBS and permeabilized with 0.2 % Triton X-100 for 15 min. Non-specific sites were blocked with 1 % bovine serum albumin for 1 h at 37 °C. The samples were then incubated with the anti-NgAtg8 antibody diluted 1:20 in PBS for 2 h at 37 °C and subsequently with an FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen, Life Technologies, USA) 1:100 in PBS for 1 h at room temperature. The cells were washed and mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, USA). The samples were examined by confocal microscopy (LSM 700; Carl Zeiss, Germany).

Induction of encystation

N. gruberi encystation was induced as previously described for pathogenic *N. fowleri* trophozoites (Chavez-Munguia et al. 2011). Trophozoites of *N. gruberi* were maintained for 5, 10, and 15 days at 25 °C on non-nutritive agar plates in the presence of heat-inactivated *Enterobacter aerogenes*, and the cysts were collected using a cell scraper (Costar, USA). The production of cysts was evaluated morphologically and by staining with 1 % calcofluor white (Merck, USA) for 1 h.

The fluorescent cysts were observed using a confocal microscope LSM 700 (Carl Zeiss, Germany). Control and encystation-induced amoebae were processed for Atg8 immunolabeling as mentioned above.

Results

N. gruberi viability and morphology are not affected by rapamycin

To analyze whether the specific autophagy inducer rapamycin (TOR-kinase inhibitor) has deleterious effects on *N. gruberi* trophozoites, we incubated trophozoites with rapamycin at 5 μ M for different time periods and then evaluated their viability using trypan blue exclusion dye. The results showed percent viability up to 95 % for all samples (Fig. S1a). Additionally, it was observed that the morphology of the rapamycin-treated trophozoites was similar to that of cells incubated in complete bactocastone medium, serum-free, or DMSO (vehicle control) after 48 h (Fig. S1b).

Rapamycin induces autophagic vacuoles in *N. gruberi* trophozoites

TEM was performed to analyze the ultrastructural changes induced by rapamycin in *N. gruberi* trophozoites. Untreated trophozoites showed a typical amoebic morphology, with several dumbbell-shaped mitochondria and abundant vacuoles present in the cytoplasm. A prominent nucleus with an evident nucleolus was also observed (Fig. 1a). In contrast, trophozoites at 9 h post-induction showed the formation of autophagic vacuoles apparently containing cytoplasmic material; in some vacuoles, only organelles, such as mitochondria, were observed (Fig. 1b). Autophagic vacuoles enclosing remnants of cytoplasmic material were also observed at 12 h (Fig. 1c).

Rapamycin induces intracellular acidic vacuoles in *N. gruberi*

We used the LysoTracker Red to evaluate acidification of the vacuoles induced by rapamycin in *N. gruberi* trophozoites, and the results revealed no positive signal in treated amoebae at 1, 3, 9, 12, and 18 h after addition of the drug. However, an important increase in the LysoTracker signal was observed at 24 h post-treatment compared with untreated control trophozoites; nevertheless, the fluorescence decreased at 48 h post-induction (Fig. S2a). Controls at each time did not show a positive signal of the fluorescent label (data not shown). The intensity of fluorescence of each time point after the addition of rapamycin showed a statistically significant increase compared with the control only at 24 and 48 h (Fig. S2b) (** $p \leq 0.003$).

N. gruberi possesses a putative Atg8 protein

To examine whether *N. gruberi* possesses an Atg8 homolog, we performed an in silico analysis using the NCBI database with the Atg8 sequence from *S. cerevisiae* (ScAtg8). We detected a polypeptide of 118 amino acids (gi|284092542) showing 66 % identity to ScAtg8 (Fig. 2b). Additionally, this *N. gruberi* polypeptide exhibits from 29 to 74 % identity with Atg8 proteins from other organisms, though is more divergent from *T. vaginalis* and *E. histolytica* (Fig. 2c). Moreover, the *N. gruberi* polypeptide possesses Atg8-specific motifs, such as an Atg7-binding site and a tubulin-binding site (Fig. 2b). It also contains a conserved glycine residue at position 116 (Fig. 2a), which in Atg8 proteins is conjugated to PE for attachment to the autophagosomal membrane. These results indicate that the gi|284092542 polypeptide corresponds to an Atg8 homolog protein in *N. gruberi* (NgAtg8).

Expression of the *ngatg8* gene in trophozoites incubated with rapamycin

The relative expression of the *atg8* gene in *N. gruberi* trophozoites incubated with rapamycin was evaluated by qRT-PCR. Based on the Atg8 protein sequence, we obtained the mRNA from the NCBI nucleotide database, and specific primers were designed to amplify a 151 bp fragment of the gene. In rapamycin-treated trophozoites, *atg8* showed a non-significant increase in expression at 0.5 and 1 h of induction. However, a significant increase of 2.4-fold was observed at 3 h, and the highest expression of 3.5-fold occurred at 9 h. After this time, *atg8* decreased to 2.3-fold at 12 h, showing a progressive decline until returning to the basal level at 18 h (Fig. 3).

Expression and localization of the Atg8 protein in *N. gruberi* trophozoites induced with rapamycin

To confirm participation of the NgAtg8 protein in autophagy, we analyzed the localization of this protein in rapamycin-induced trophozoites. First, to obtain specific antibodies against NgAtg8, its full-length encoding gene was amplified, inserted into a prokaryotic expression vector, and expressed in *E. coli*. Protein extracts of IPTG-induced bacteria displayed expression of an 18 kDa protein, which corresponds to the expected molecular weight of the NgAtg8-his6x recombinant protein (Fig. 4a). This result was corroborated by western blotting using a monoclonal antibody against his6x (Fig. 4b). The recombinant protein was then purified and used for immunization, as described above. According to western blot assays, the antibodies obtained recognize the 18 kDa band in the extracts of IPTG-induced bacteria (Fig. 4c), whereas no recognition was detected using pre-immune serum (Fig. 4d). However, the anti-NgAtg8 antibodies did not detect any band in total crude extracts of *N. gruberi* trophozoites (data not

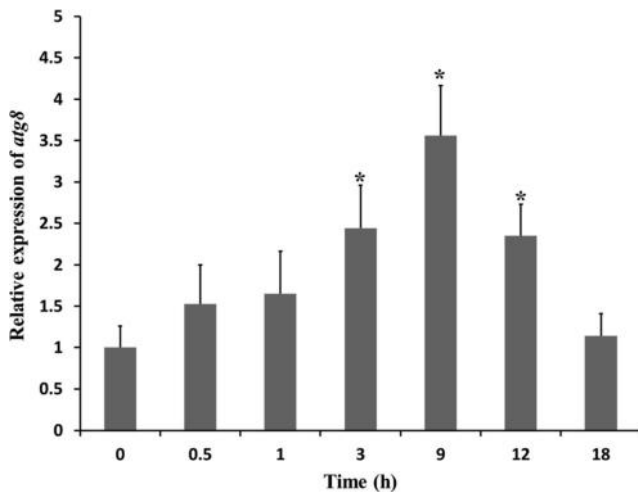


Fig. 3 Overexpression of the *atg8* gene in *N. gruberi* trophozoites incubated with rapamycin. Relative expression of *atg8* mRNA in *N. gruberi* was evaluated by qRT-PCR. In rapamycin-treated trophozoites, *atg8* showed a non-significant increase at 0.5 and 1 h. However, a significant increase was observed at 3, 9, and 12 h; the highest expression compared with the control was found at 9 h. (Asterisk) $p \leq 0.05$ vs. control group (time 0 h)

obtained at 15 days of induction, presenting typical morphology with an evident double-wall (Fig. 6a). The cysts were stained with 1 % calcofluor white dye (Fig. 6b) as confirmation. For the NgAtg8 immunolocalization assays, we evaluated different time periods of encystation (0, 5, 10, and 15 days). Compared with negative control trophozoites, the most intensive label (FITC) was observed at 5 days post-induction (Figs. 6c and d). However, the amoebae showed a decrease in the Atg8 signal at 10 days

(Fig. 6e), which disappeared at 15 days, a time when the cysts are completely formed (Fig. 6f).

Discussion

Autophagy has been described as participating in different mechanisms such as cellular growth, starvation, and programmed cell death as well as during cell differentiation, including encystation (Levine and Yuan 2005; Moon et al. 2009; Picazarri et al. 2008; Picazarri et al. 2015; Tsujimoto and Shimizu 2005). The participation of autophagy during encystation has been reported in the free-living amoeba *A. castellanii* and in the amphibian parasite *E. invadens* (Duszenko et al. 2011; Picazarri et al. 2008; Picazarri et al. 2015; Tekinay et al. 2006). In addition, cytoplasmic structures similar to autophagy vacuoles have been observed by ultra-structural analysis during treatment of *N. gruberi* and *N. fowleri* with amphotericin B (Schuster and Rechthand 1975). More recently, the complete autophagic machinery predicted in the genome of *N. gruberi* has been described by in silico studies (Brennan et al. 2011). However, experimental characterization of this mechanism has not yet been reported for this amoeba. In the present work, we designed for the first time experiments to investigate the autophagy mechanism in *N. gruberi* by inhibiting the serine/threonine kinase TOR using rapamycin, which is able to induce autophagy by blocking the TORC1 complex (Diaz-Troya et al. 2008; Dumont et al. 1990; Foster and Toschi 2009; Heitman et al. 1991; Jung et al. 2010).

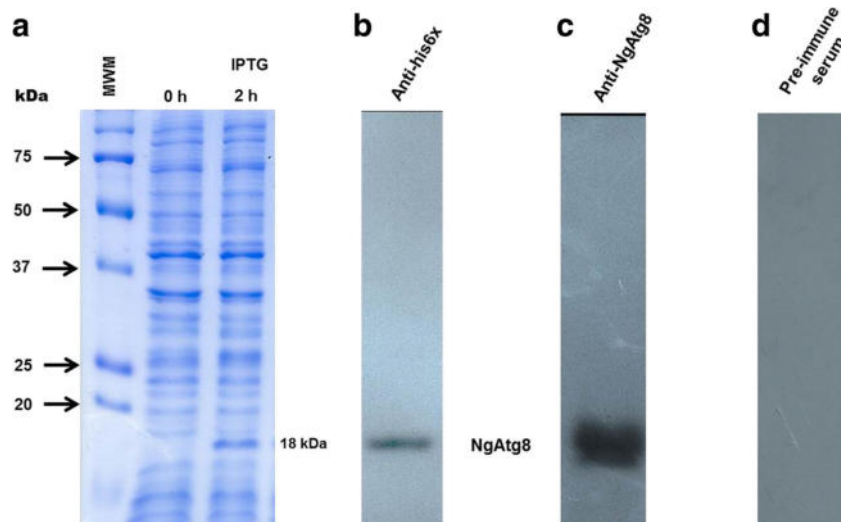


Fig. 4 Production of antibodies against the recombinant *N. gruberi* Atg8 protein. The full-length gene coding for the NgAtg8 protein was amplified and cloned into the pET/100 directional TOPO expression vector. The construct was introduced into *E. coli* BL21 star (DE3) to produce the recombinant NgAtg8 protein. **a** Induction of the recombinant protein was examined by 15 % SDS-PAGE stained with Coomassie blue. Atg8 was

observed at 18 kDa. **b** The recombinant protein was purified and identified by WB using monoclonal anti-his6x tag antibodies. The purified recombinant protein was employed to generate specific polyclonal anti-NgAtg8 antibodies. **c** WB of the purified recombinant NgAtg8 protein using anti-NgAtg8 antibodies. **d** WB of the purified recombinant using pre-immune serum

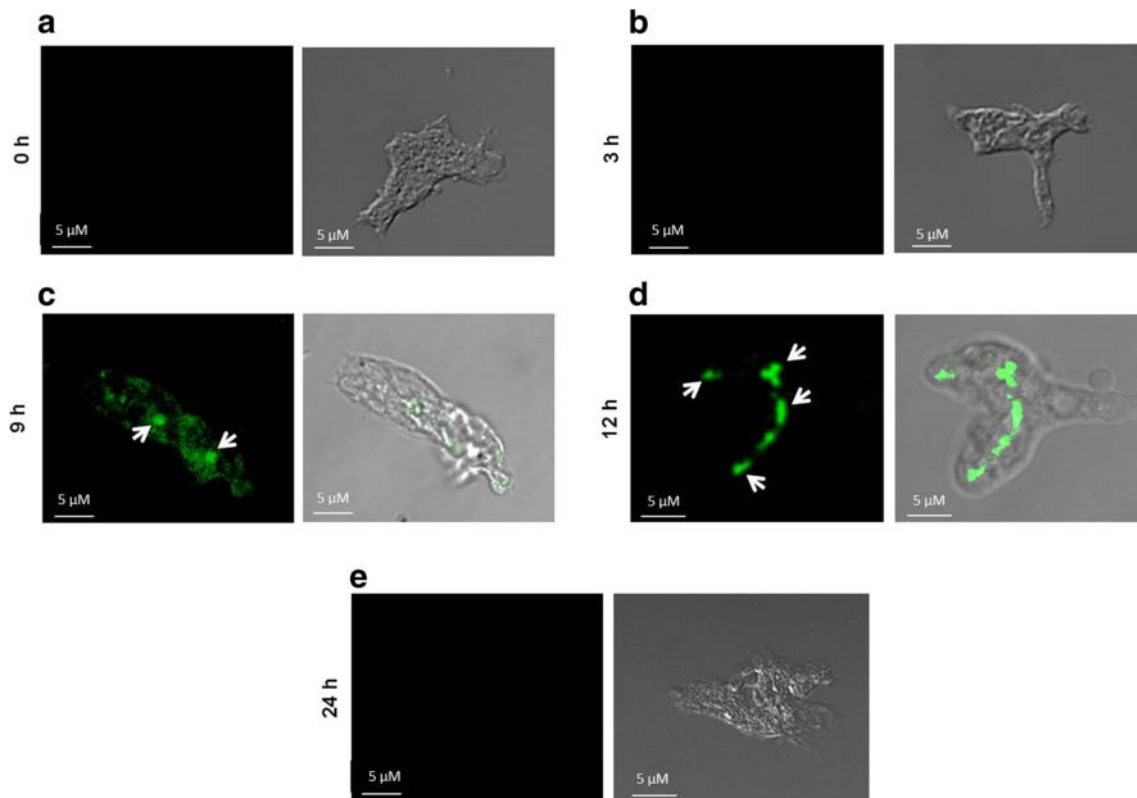


Fig. 5 Immunolocalization of the Atg8 protein in *N. gruberi* rapamycin-induced trophozoites. Antibodies against recombinant Atg8 were employed to analyze the cellular localization of native Atg8 in trophozoites induced with rapamycin. **a** Amoeba control, the Atg8 protein signal

was absent. **c, d** Rapamycin-treated trophozoites were positive for Atg8 at 9 and 12 h post-induction. The signal was detected in cytoplasmic vesicles (arrows). **b, e** The Atg8 signal was not observed at 3 and 24 h post-induction

One of the most important changes observed during autophagy is the formation of vacuoles that contain cytoplasmic material to be degraded by the lysosomal pathway, as described in *S. cerevisiae* (Nakatogawa et al. 2009). Based on TEM in *Tritrichomonas foetus*, it was reported that hydrogenosomes are located inside vacuoles in the autophagic process during starvation (Benchimol 1999). These reports are in accordance with the results for *N. gruberi*, in which we observed the formation of vacuoles containing evident cytoplasmic material and even complete mitochondria.

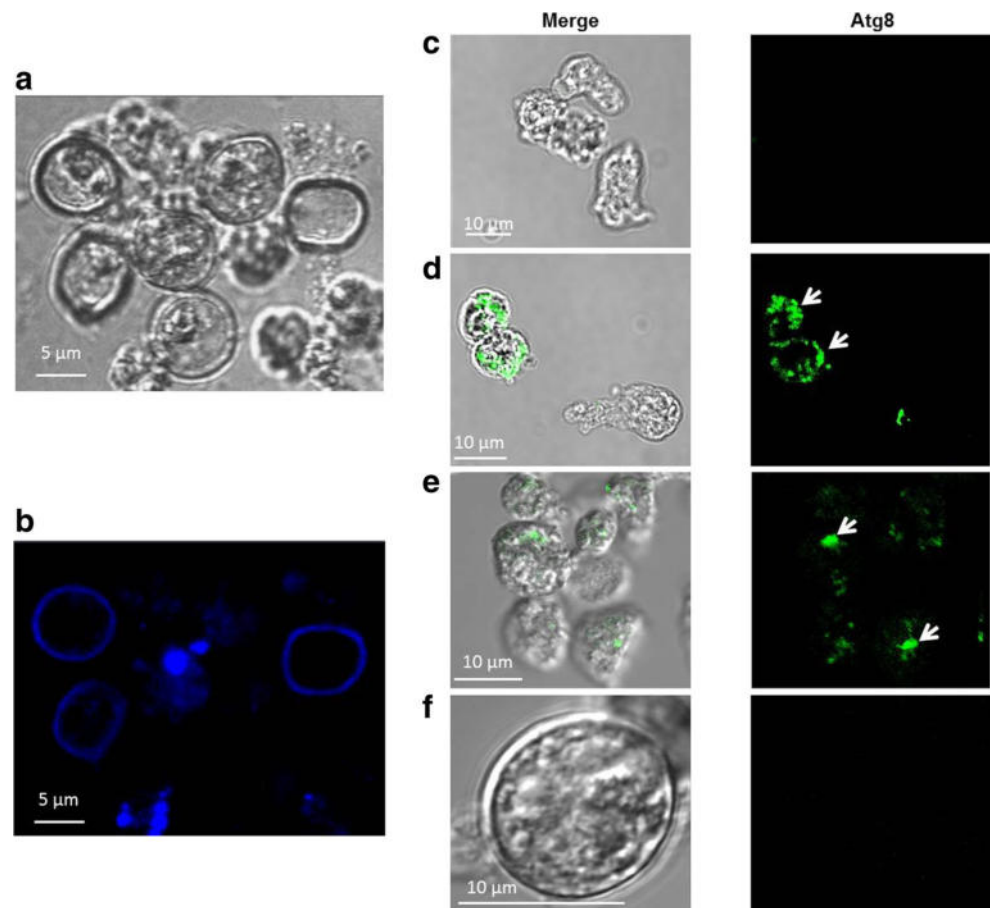
The induction of autophagy is usually related to an increase in the number of lysosomes for degradation inside acidic vacuoles (Huang and Klionsky 2002; Wang and Klionsky 2003). When we evaluated intracellular acidification using LysoTracker RED, rapamycin-treated trophozoites exhibited an increase in acidic vacuoles; the result was statistically significant at 24 h post-induction, reaching a maximum level at this time, compared with the non-induced control (time 0 h). However, the fluorescence decreased importantly at 48 h, indicating that the autophagy process might be complete in *N. gruberi* trophozoites at this time point.

In this work, the Atg8 protein was explored because it is one of the most important Atg molecules of autophagy; it is a ubiquitin-like protein involved in the labeling of autophagic

vacuoles and in actively controlling their formation (Xie et al. 2008a). Indeed, this ubiquitin-like protein is typically employed as an authentic marker of autophagy (Picazarri et al. 2008). Our in silico analyses confirmed that *N. gruberi* possesses a putative Atg8 protein. The NgAtg8 protein is 118 amino acids long and presents high identity (29–74 %) with the Atg8 proteins from different organisms. In addition, specific regions, such as an Atg7-binding site was also found in NgAtg8. The Atg7 domain is considered important for Atg8 processing and other functions, and the association of Atg8 with Atg7 has been reported in *D. discoideum*, whereby the lack of Atg7 affected autophagy during starvation in this free-living amoeba (Noda et al. 2011; Otto et al. 2003). We also found a glycine residue at position 116 of NgAtg8, the putative site where PE is linked by Atg7 and Atg3 (Duszenko et al. 2011; Huang and Klionsky 2002; Noda et al. 2011; Xie et al. 2008b).

To investigate whether the putative NgAtg8 protein participates in the autophagy process, first we analyzed the possible association of rapamycin-induced vacuoles with an increase in the relative expression of the *atg8* transcript. Using qRT-PCR, we observed overexpression of this gene in rapamycin-treated trophozoites at 3 and 9 h, prior to the formation of the autophagy vacuoles observed by TEM at 9 and 12 h. These findings suggest that Atg8 could function in the autophagy process of *N. gruberi*.

Fig. 6 Immunolocalization of Atg8 in *N. gruberi* trophozoites induced to encyst. **a** Cysts were observed at 15 days after induction in non-nutritive medium. An evident double wall surrounding the cells was observed. Bars 5 μ m. **b** The cyst wall was stained using calcofluor white. Bars 5 μ m. **c** Immunolocalization of Atg8 was evaluated in control trophozoites, with no signal detected. **d, e** During cyst differentiation (pre-cysts) at 5 and 10 days post-induction, a positive label was observed inside the cells (arrows). **f** At 15 days, the signal in the mature cysts had disappeared. Bars 10 μ m



We then amplified the complete sequence of *ngatg8* from *N. gruberi* trophozoites with the aim of generating a recombinant protein and specific polyclonal antibodies against NgAtg8 for use in immunolocalization assays. Our results showed an increase in the positive signal for the NgAtg8 protein in rapamycin-treated trophozoites at 9 and 12 h post-treatment compared with the controls. NgAtg8 was observed in the cytoplasm in small vacuoles. In fact, these structures showed a remarkable concentration of NgAtg8 signal, which has been directly related with autophagic vacuole formation (Xie et al. 2008a); thus, we postulate that they could be the pre-autophagosomal structure (Nakatogawa et al. 2009; Suzuki et al. 2001; Suzuki and Ohsumi 2010; Xie et al. 2008a).

Our multiple alignment analysis showed that orthologs of Atg8 are evolutionarily conserved in other parasites such as *T. vaginalis*, in which Atg8 was described as participating in the response to stress conditions of glucose deprivation (Huang et al. 2014). Some authors have described Atg8 participation during encystation in *E. invadens* and *A. castellanii* (Moon et al. 2009; Picazari et al. 2008). Based on these reports, we evaluated whether autophagy could be activated during cell differentiation in *N. gruberi*. The encystation of this amoeba was

induced using non-nutritive conditions, as described previously for *N. fowleri* (Chavez-Munguia et al. 2011). Our results showed a positive signal of NgAtg8 in *N. gruberi* pre-cysts, indicating that autophagy could be involved during the encystation process. However, the Atg8 signal decreased when the cysts were completely formed, similar to the reports of encystation in *A. castellanii* and *E. invadens*, in which the Atg8 protein signal was diminished at the later stages of encystation (Moon et al. 2009; Picazari et al. 2008). These data suggest that autophagy is required during the early stages of cyst formation.

Based on all these results, we conclude that the autophagy process exists in *N. gruberi* and that the amoeba possesses an Atg8 protein (NgAtg8), the expression of which can be stimulated with rapamycin. In addition, we suggest that autophagy is involved during cell encystation in this protozoan, a process that allows *N. gruberi* to survive under adverse conditions.

Acknowledgments We are grateful to Angelica Silva-Olivares, Maria Luisa Bazán-Tejeda, and Gabriel Maldonado-Shibayama for their valuable technical assistance. This work was supported by grant number 237523 of the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT).

Compliance with ethical standards

Ethical standards The animal management protocol was approved by the institutional committee (CICUAL, protocol number 0152–15). Our institution fulfills all the technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals, which is certified by official national law NOM-062-ZOO-1999. The rabbit was euthanized by an overdose of sodium pentobarbital at the end of the experiments and handled according to the guidelines of the AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (2013 Edition).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Benchimol M (1999) Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol Cell* 91:165–174
- Brennan A, Gualdron-Lopez M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PA (2011) Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol* 177:83–99. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.02.003
- Chavez-Munguia B, Segovia-Gamboa N, Salazar-Villatoro L, Omana-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A (2011) *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *J Eukaryot Microbiol* 58:463–468. doi:10.1111/j.1550-7408.2011.00574.x
- De Jonckheere JF (2011) Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 11:1520–1528. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.023
- Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4:851–865
- Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH (1990) Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol* 144:251–258
- Dunn WA Jr (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* 4:139–143
- Duszenko M, Ginger ML, Brennan A, Gualdron-Lopez M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, de Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano PS, Stoka V, Turk B, Michels PA (2011) Autophagy in protists. *Autophagy* 7:127–158
- Foster DA, Toschi A (2009) Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle* 8:1026–1029
- Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, Kuo A, Paredez A, Chapman J, Pham J, Shu S, Neupane R, Cipriano M, Mancuso J, Tu H, Salamov A, Lindquist E, Shapiro H, Lucas S, Grigoriev IV, Cande WZ, Fulton C, Rokhsar DS, Dawson SC (2010) The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* 140:631–642. doi:10.1016/j.cell.2010.01.032
- Fritz-Laylin LK, Ginger ML, Walsh C, Dawson SC, Fulton C (2011) The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Res Microbiol* 162:607–618. doi:10.1016/j.resmic.2011.03.003
- Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. ‘Protein modifications: beyond the usual suspects’ review series. *EMBO Rep* 9:859–864. doi:10.1038/embor.2008.163
- Heitman J, Movva NR, Hall MN (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905–909
- Huang WP, Klionsky DJ (2002) Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct* 27:409–420
- Huang KY, Chen YY, Fang YK, Cheng WH, Cheng CC, Chen YC, Wu TE, Ku FM, Chen SC, Lin R, Tang P (2014) Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochim Biophys Acta* 1840:53–64. doi:10.1016/j.bbagen.2013.08.008
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408:488–492. doi:10.1038/35044114
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584:1287–1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017
- Kim JH, Jung SY, Lee YJ, Song KJ, Kwon D, Kim K, Park S, Im KI, Shin HJ (2008) Effect of therapeutic chemical agents in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4010–4016. doi:10.1128/AAC.00197-08
- Klionsky DJ, Codogno P, Cuervo AM, Deretic V, Elazar Z, Fueyo-Margareto J, Gewirtz DA, Kroemer G, Levine B, Mizushima N, Rubinsztein DC, Thumm M, Tooze SA (2010) A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy* 6:438–448. doi:10.4161/auto.6.4.12244
- Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115:2679–2688. doi:10.1172/JCI26390
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH (2009) Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Mol Biochem Parasitol* 168:43–48. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.06.005
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:458–467. doi:10.1038/nrm2708
- Noda NN, Satoo K, Fujioka Y, Kumeta H, Ogura K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F (2011) Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. *Mol Cell* 44:462–475. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.035
- Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH (2003) Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 278:17636–17645. doi:10.1074/jbc.M212467200
- Picazari K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T (2008) Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infect Immun* 76:278–288. doi:10.1128/IAI.00636-07
- Picazari K, Nakada-Tsukui K, Tsuboi K, Miyamoto E, Watanabe N, Kawakami E, Nozaki T (2015) Atg8 is involved in endosomal and phagosomal acidification in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 17:1510–1522. doi:10.1111/cmi.12453
- Schuster FL, Rechthand E (1975) In vitro effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* 8:591–605
- Siddiqui R, Khan NA (2014) Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3017. doi:10.1371/journal.pntd.0003017
- Suzuki K, Ohsumi Y (2010) Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett* 584:1280–1286. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.001

- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20:5971–5981. doi:10.1093/emboj/20.21.5971
- Tekinay T, Wu MY, Otto GP, Anderson OR, Kessin RH (2006) Function of the *Dictyostelium discoideum* Atg1 kinase during autophagy and development. *Eukaryot Cell* 5:1797–1806. doi:10.1128/EC.00342-05
- 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* 60:399–405. doi:10.1016/j.patbio.2012.03.002
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 12(Suppl 2):1528–1534. doi:10.1038/sj.cdd.4401777
- Wang CW, Klionsky DJ (2003) The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 9:65–76
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ (2008a) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19:3290–3298. doi:10.1091/mbc.E07-12-1292
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ (2008b) Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. *Autophagy* 4:920–922
- Yin J, Ye AJ, Tan KS (2010) Autophagy is involved in starvation response and cell death in *Blastocystis*. *Microbiology* 156:665–677. doi:10.1099/mic.0.033944-0

Review

Naegleria fowleri after 50 years: is it a neglected pathogen?

Moisés Martínez-Castillo,¹ Roberto Cárdenas-Zúñiga,¹ Daniel Coronado-Velázquez,¹ Anjan Debnath,² Jesús Serrano-Luna³ and Mineko Shibayama¹

Correspondence

Mineko Shibayama
mineko@cinvestav.mx

¹Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Av. IPN 2508, Mexico City 07360, Mexico

²Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA

³Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Av. IPN 2508, Mexico City 07360, Mexico

It has been 50 years since the first case of primary amoebic meningoencephalitis (PAM), an acute and rapidly fatal disease of the central nervous system (CNS), was reported in Australia. It is now known that the aetiological agent of PAM is *Naegleria fowleri*, an amoeba that is commonly known as 'the brain-eating amoeba'. *N. fowleri* infects humans of different ages who are in contact with water contaminated with this micro-organism. *N. fowleri* is distributed worldwide and is found growing in bodies of freshwater in tropical and subtropical environments. The number of PAM cases has recently increased, and the rate of recovery from PAM has been estimated at only 5%. Amphotericin B has been used to treat patients with PAM. However, it is important to note that there is no specific treatment for PAM. Moreover, this amoeba is considered a neglected micro-organism. Researchers have exerted great effort to design effective drugs to treat PAM and to understand the pathogenesis of PAM over the past 50 years, such as its pathology, molecular and cellular biology, diagnosis and prevention, and its biological implications, including its pathogenic genotypes, its distribution and its ecology. Given the rapid progression of PAM and its high mortality rate, it is important that investigations continue and that researchers collaborate to gain better understanding of the pathogenesis of this disease and, consequently, to improve the diagnosis and treatment of this devastating infection of the CNS.

Introduction

Protozoal infections of the central nervous system (CNS) are major causes of morbidity and mortality worldwide, second only to HIV infection (Mishra *et al.*, 2009). Recently, diseases caused by members of the free-living amoebae (FLA) group have been included in these statistics (Mishra *et al.*, 2009; WHO, 2009). FLA are protists that are distributed worldwide. *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. and *Balamuthia mandrillaris* are the most common FLAs with medical implications; these micro-organisms can produce severe and fatal infections in the CNS of humans and other mammals (Rodríguez-Zaragoza, 1994). In this review, we will focus on the pathogenic behaviour of *N. fowleri*, which is the

aetiological agent of primary amoebic meningoencephalitis (PAM), an acute and fulminant disease of the CNS (Schuster & Visvesvara, 2004). *N. fowleri* infections have been reported in healthy children and young adults who have recently participated in swimming activities in water sources contaminated with this amoeba (Marciano-Cabral, 1988) and in developing countries with a lack of control procedures or preventive information against *N. fowleri* (Siddiqui & Khan, 2014).

CNS infection by *N. fowleri* occurs by the amoebae passing through the nasal cavity, penetrating the olfactory neuroepithelium, migrating through the olfactory nerves (Fig. 1a) and crossing the cribriform plate until they reach the olfactory bulbs (OBs) (Martinez *et al.*, 1973; Jarolim *et al.*, 2000; Rojas-Hernández *et al.*, 2004).

Once the amoebae reach the brain, they can proliferate and induce an acute inflammatory reaction (Fig. 1b), leading to patient death in approximately 1 week (Cervantes-Sandoval

Abbreviations: AmB, amphotericin B; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; FLA, free-living amoeba; FT, flagellation test; OB, olfactory bulb; PAM, primary amoebic meningoencephalitis.

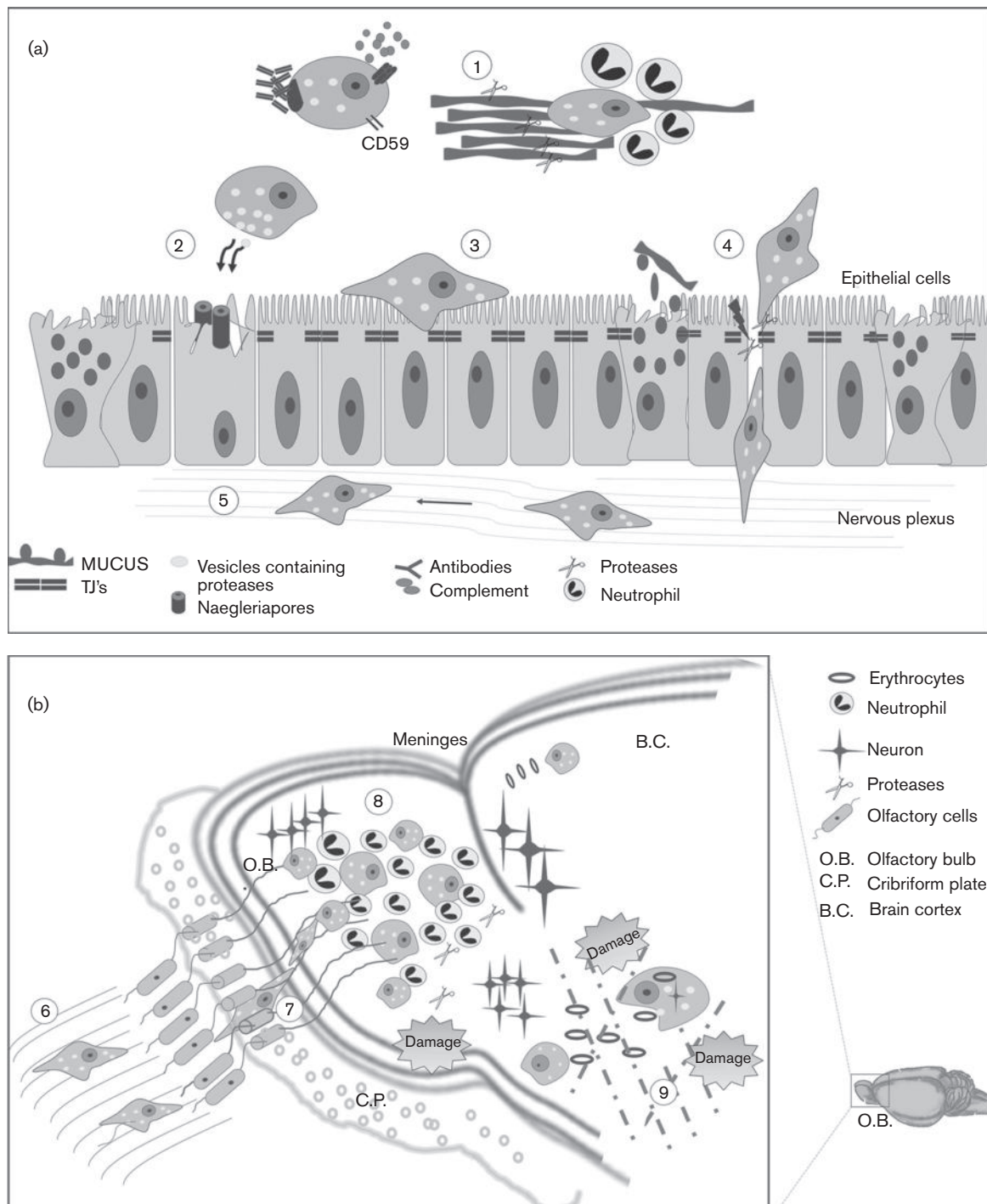


Fig. 1. Schematic representation of *N. fowleri* infection. (a) Initial stages of PAM. (1) Evasion of innate immune response, (2) independent-contact cytotoxicity (naegleriapores), (3) adhesion to epithelial cells, (4) invasion of the neuroepithelium, (5) migration to OBs. (b) Late stages of PAM. (6) Contact with olfactory phyla, (7) amoeba crossing the cribriform plate, (8) *N. fowleri* proliferation and inflammatory reaction in the OBs, (9) tissue damage (haemorrhage, phagocytosis and protease release).

et al., 2008a). The clinical symptoms consist of several bi-frontal headaches, neck stiffness, vomiting and coma. *N. fowleri* can be isolated from soil, tap water, swimming pools, freshwater lakes and thermal springs (Marciano-

Cabral, 1988). Pathogenic strains have been isolated from water at 10–45 °C, pond mud at 16 °C and soil at 8 °C; amoebae found in soil have been reported to serve as vectors for other micro-organisms (Tyndall & Domingue,

1982). The interaction between *N. fowleri* and humans occurs accidentally, given that this amoeba is not considered an obligate parasite. More recently, the infection has been associated with religious and cultural practices (Siddiqui & Khan, 2014) and, in some cases, with hygienic procedures, such as sinus irrigation using contaminated water (Diaz & Boudreaux, 2013). When an infection of the protozoan occurs, it can damage tissues after the invasion to the CNS. A broad battery of mechanisms, such as pore-forming proteins, proteases and adhesion-mediating glycoproteins, among others, are involved in the pathogenic mechanisms through which *N. fowleri* acts (Aldape *et al.*, 1994; Herbst *et al.*, 2002; Serrano-Luna *et al.*, 2007; Shibayama *et al.*, 2013) (Fig. 1a). However, to date, not all of the biological mechanisms utilized by *N. fowleri* have been elucidated, and many studies are required to provide a better understanding of its molecular pathogenesis. It is important to mention that, in the past few years, the death rate of the reported cases has been greater than 95%. This situation may be due to the symptoms and signs of PAM being similar to those of bacterial or viral meningitis or to the lack of a timely diagnosis and, therefore, the lack of a specific and appropriate treatment (Heggie, 2010).

Taxonomy

The classification system for protozoal unicellular eukaryotes developed by Levine *et al.* (1980) was based primarily on ultrastructural studies. The new system for classifying unicellular eukaryotes utilizes modern data obtained using morphological approaches, biochemical-pathway analysis and molecular phylogeny (Adl *et al.*, 2005). In this classification system, *Naegleria* spp. are included in the paraphyletic supergroup Excavata (Simpson, 2003; Cavalier-Smith *et al.*, 2015), in the group Heterolobosea (Adl *et al.*, 2005) and the family Vahlkampfiidae (De Jonckheere, 2004; Adl *et al.*, 2005). The *N. fowleri* genome is not yet available; however, some studies aimed at classifying *Naegleria* spp. have been performed, particularly focussing on their molecular and genetic characteristics. The origin and evolution of *Naegleria* have been evaluated: this genus includes more than 40 species, but *N. fowleri* is the only species that is

known to infect and cause disease in humans (De Jonckheere, 2011). The most accepted system for the identification of *N. fowleri* species was created by De Jonckheere (2011). This molecular typing system, which is based on the sequences of internal transcribed spacers (ITS1) and 5.8S rDNA, revealed the existence of at least eight different genotypes of *N. fowleri*. These genotypes are unevenly distributed on different continents: there are three genotypes (I, II and III) in America, seven genotypes (II, III, IV, V, VI, VII and VIII) in Europe, one genotype (V) in Oceania and two genotypes (II and III) in Asia. Of these eight genotypes, only four have been identified in patients (types I, II, III and V) (De Jonckheere, 2011, 2014). Recent findings regarding the molecular machinery and biochemical pathways of *Naegleria gruberi* could provide important information that will allow phylogenetic reorganization of members of the *Naegleria* genus (Fritz-Laylin *et al.*, 2010, 2011).

Ecology and morphology

Members of the genus *Naegleria* are distributed worldwide in soil and water (De Jonckheere, 2012) and have been isolated from fresh and warm-water lakes, streams, spas, heated but non-chlorinated swimming pools, hot springs, hydrotherapy and remedial pools, aquaria, sewage and even the nasal passages and throats of healthy individuals (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Trabelsi *et al.*, 2012). This amoeba has also been isolated from various animals, including reptiles, amphibians and fishes (Dyková *et al.*, 2001; Pantchev & Tappe, 2011). However, this micro-organism has not been recovered from seawater, suggesting its sensitivity to elevated osmolarity. The vertical distribution of *N. fowleri* in water has been correlated with the presence of cyanobacteria and eubacteria; therefore, it is possible that the natural function of *Naegleria* genus is regulating bacterial populations (Kyle & Noblet, 1985). Additionally, the distribution of *Naegleria* has been associated with the concentrations of manganese and iron in the water column (Kyle & Noblet, 1985; Martínez-Castillo *et al.*, 2015). *N. fowleri* is thermophilic and can survive temperatures of up to 45 °C (Kyle & Noblet, 1987). Therefore, these amoebae proliferate mainly during the summer months, when the environmental temperature is likely to be high (Sifuentes *et al.*, 2014).

The length of trophozoites is approximately 15–25 µm. In an axenic culture, cytoplasmic lobopodia, which are used for locomotion, are present (Fig. 2a). In addition, these organisms have cytoplasmic projections called food cups that allow them to phagocytose bacteria, yeast, erythrocytes and cellular debris (Fig. 3) (Scaglia *et al.*, 1991).

Ultrastructural morphology of trophozoites revealed the typical features of eukaryotic cells (Schuster, 1963). Ancestral proteins related to centrioles have recently been identified (Fritz-Laylin & Cande, 2010). The cytoplasmic membrane is approximately 10 nm thick. The cytoplasm contains a large number of free ribosomes, along with ribosomes that are associated with the membranes that form

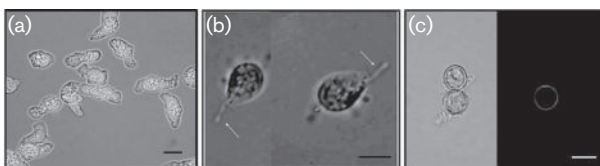


Fig. 2. Different cell stages of *N. fowleri*. (a) Typical morphology of *N. fowleri* trophozoites in axenic culture. (b) Flagellar form induced by isotonic saline solution for 2 h. The flagella (arrows) are evident. (c) Cyst induced by 1323 Page's amoeba saline solution. The cyst wall was stained with calcofluor white reagent. The images were obtained with a Nikon Eclipse 80i microscope. Magnification, $\times 60$.

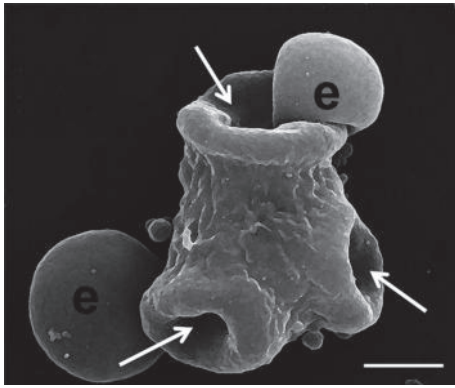


Fig. 3. Scanning electron microscopy of *N. fowleri* trophozoites interacted with erythrocytes. Three phagocytic mouths are seen (arrows), red blood cells (e). Jeol (JSM-6510LV) microscopy. Bar, 5 μ m.

the rough endoplasmic reticulum. The cytoplasm also contains a smooth endoplasmic reticulum. Other membranes that are associated with a large number of vesicles and are organized similarly to the Golgi apparatus have been identified. In addition, abundant vacuoles of different sizes, either empty or containing different types of materials, have been observed. The mitochondria of these micro-organisms have a characteristic curved 'dumb-bell' shape. Lysosomes have also been identified using histochemical staining for acid phosphatases (Feldman, 1977). The presence of contractile vacuoles has been reported in several species of *Naegleria* (Chávez-Munguía *et al.*, 2009).

The most evident organelle is the nucleus because of its conspicuous nucleolus (Fig. 4). The nucleus has a double membrane and a large number of pores, and the outer

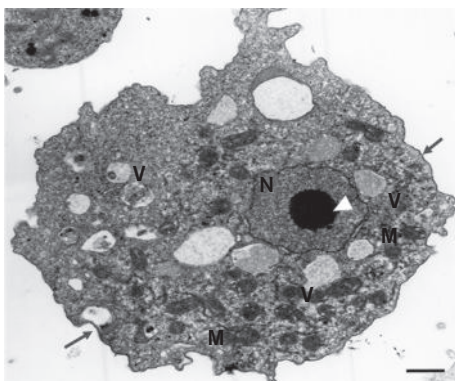


Fig. 4. Transmission electron microscopy. Ultrastructural morphology of *N. fowleri*. Trophozoite cultured in Bacto-casitone medium shows a normal nucleus (N) with a prominent nucleolus (arrowhead). The integrity of the cytoplasmic membrane (arrows) is also observed, and multiple normal mitochondria (M) and vacuoles (V) are shown. EM-910 Zeiss. Bar, 1 μ m.

nuclear membrane has associated ribosomes. When *N. fowleri* trophozoites are incubated in solutions free of nutrients (saline solution), they can differentiate into transitional flagellates that cannot divide or feed (Fig. 2b). This flagellate differentiation involves a change in the cell shape from the pleomorphic trophozoites to a pear-shaped form with a pair or more flagella at the distal end.

The mature flagellar apparatus has the canonical 9+2 structure and is surrounded by a cytoplasmic membrane sheet (Patterson *et al.*, 1981; Fritz-Laylin & Cande, 2010). Finally, the resistant form of *N. fowleri*, the cyst, is usually spherical, smooth, double walled and refractive, and measures approximately 20 μ m in diameter (Fig. 2c); the wall is composed mainly of polysaccharides (Chávez-Munguía *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014). The cysts contain pores that are sealed by a thin mucoid layer. During the early stages of cyst formation, elongated mitochondria and an endoplasmic reticulum with widened cisterns are also observed. The material of the cyst wall is synthesized and packaged by the rough endoplasmic reticulum. Once the cyst is mature, its nucleus and nucleolus are less pronounced than they were during the trophozoite stage (Marciano-Cabral, 1988; Chávez-Munguía *et al.*, 2009, 2011).

Epidemiology

The amoeboflagellate *N. fowleri* has attracted attention because PAM is a rapidly fatal disease. The number of reports worldwide is unclear; some authors have reported 235 cases (De Jonckheere, 2011), whereas others have reported 300 cases (Trabelsi *et al.*, 2012). Unfortunately, only a few epidemiological studies have focussed on determining its geographic distribution (De Jonckheere, 2011, 2014).

The first case of PAM was reported in 1965 in southern Australia, where the patient died of an unknown acute pyogenic meningitis (Fowler & Carter, 1965). Three more patients with a similar medical history were also mentioned. The authors described the presence of amoebic forms distinct from *Entamoeba histolytica* and similar to FLA (Fowler & Carter, 1965). Although the aetiological agent was not identified by autopsy, later, the scientific community considered that *N. fowleri* was the aetiological agent (Carter, 1969; Carter *et al.*, 1981; Marciano-Cabral, 1988). After these reports, many cases of PAM were reported in different countries, such as the USA (Butt *et al.*, 1968; Marciano-Cabral & Cabral, 2007; Yoder *et al.*, 2010), Australia (Fowler & Carter, 1965; Norton *et al.*, 2010) and the Czech Republic (Cerva & Novak, 1968). A retrospective study of PAM showed that approximately 16 cases were identified using histological samples between 1962 and 1968 (Cerva & Novak, 1968; Cerva *et al.*, 1968; Cerva, 1969).

In 1982, 108 cases were reported in different countries of Europe, Africa, Oceania and America (John, 1982). Almost all of the cases have been mainly reported from the USA and Europe; however, the disease has spread to all of the

continents except Antarctica (Valenzuela *et al.*, 1984; Lares-Villa *et al.*, 1993; Cogo *et al.*, 2004; Cubero-Menéndez & Cubero-Rego, 2004; Hara & Fukuma, 2005; Jaffar-Bandjee *et al.*, 2005; De Jonckheere, 2011; Siddiqui & Khan, 2014). The first case in Mexico was reported in 1989 in Baja California (López-Corella *et al.*, 1989). Since then, more than 30 cases of PAM have been reported in this country (Valenzuela *et al.*, 1984; López-Corella *et al.*, 1989; Lares-Villa *et al.*, 1993; Lares-Villa, 2001; Lares-Villa & Hernández-Peña, 2010).

Recently, several clinical cases of PAM have been reported in Pakistan. These cases were not related to recreational swimming but rather to performing ablutions (Shakoor *et al.*, 2011). In other work, it was reported that 38 % of domestic water samples were positive for pathogenic FLA, of which 30 % contained *Acanthamoeba* spp. and only 8 % had *N. fowleri* (Yousuf *et al.*, 2013). Although many PAM cases have been reported in the literature, the incidence of this disease is considered to be underestimated (De Jonckheere, 2011). It is important to note that the epidemiological information consists mainly of clinical and research reports. Therefore, it is believed that more specific and complete epidemiological studies are necessary to determine the rate of *N. fowleri* infection.

Pathogenesis

N. fowleri causes PAM, an acute, severe and fatal disease in humans. To understand the interplay between the amoeba and its host, several *in vivo* studies have been conducted (Martinez *et al.*, 1971, 1973; Jarolim *et al.*, 2000; Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a), in which the mouse is the most common animal model used to study the different stages of PAM. The process of *N. fowleri* invasion through the neuroepithelium was described in 1973. Transmission electron microscopic studies showed that *N. fowleri* trophozoites cross through the intercellular junctions of sustentacular cells to reach the olfactory nerve plexus, moving through the mesaxonal spaces of the Schwann cells. This invasion occurs without causing an inflammatory reaction (Martinez *et al.*, 1971, 1973). Investigations of the early stages of PAM demonstrated that 1 h after instillation of the amoebae, they interacted with the mucus present in the nasal cavity and that, at 6 h post-inoculation, the trophozoites were surrounded by an acute inflammatory reaction, mainly consisting of neutrophils (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a); however, this innate response appeared to be insufficient to eliminate *N. fowleri*. Then, at 12 h post-inoculation, the amoebae attached to and penetrated the olfactory neuroepithelium (Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a; Shibayama *et al.*, 2013). Furthermore, at 30 h post-infection, trophozoites were found in the cribriform plate, and at 48–72 h post-infection, amoebae reached the OBs without causing an inflammatory reaction (Jarolim *et al.*, 2000; Rojas-Hernández *et al.*, 2004). At 102 h post-infection, a severe inflammatory focus consisting of eosinophils and neutrophils was observed, and the number of trophozoites in the OBs was increased. Finally, during the later stages of

infection (5–7 days), extensive areas of lytic necrosis and haemorrhaging were observed, and red blood cells were found within the amoebae, suggesting that erythrophagocytosis had occurred (Rivera-Aguilar *et al.*, 2000) (Fig. 5).

Mechanisms of pathogenicity

One of the first events that occurs during pathogen invasion is adhesion. Much effort has been exerted to identify the specific adhesion molecules of *N. fowleri*. For example, an integrin-like protein of 60 kDa was found in its outer membrane (Han *et al.*, 2004). Recently, the capacity of *N. fowleri* to bind to extracellular proteins, such as collagen type I, fibronectin and laminin-I, was evaluated. Interestingly, the authors demonstrated that *N. fowleri* and *Naegleria lovaniensis* (a non-pathogenic amoeba) expressed a differential pattern of adhesion (Jamerson *et al.*, 2012). Another *in vitro* study demonstrated the differential carbohydrate expression of *N. fowleri* and *N. gruberi* (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010). These findings were supported by those of Carrasco-Yepez *et al.* (2013), who reported that mannose residues are essential for *N. fowleri* to adhere to mouse nasal mucosa.

Proteases play crucial roles in parasite biology and pathogenesis. Although *N. fowleri* is not considered a strict parasite, proteases are involved in PAM progression. One of the first reports of its protease activity was published by Martinez *et al.* (1971), in which the authors proposed that ‘the destruction and lysis of the olfactory epithelium may occur from yet-to-be-defined cytolytic substances produced by amoebae’. Another report describing the secretion of proteolytic enzymes was published by Chang (1979). Herein, the author reported that pathogenic *Naegleria* degraded sphingomyelin that was attributed to its phospholipolytic enzymes. Three years later, phospholipases were identified in amoebic secretion products (Hysmith & Franson, 1982). During the same year, studies of isoenzyme expression revealed the presence of phosphatase

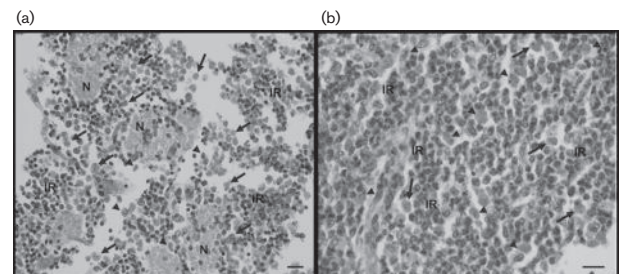


Fig. 5. Histopathology of the OBs infected with *N. fowleri* (mouse model). (a) Sections of OBs 6 days after instillation with the amoebae (arrows). Trophozoites appear to be ingested erythrocytes (arrowheads); lytic necrosis is also seen (N). Magnification, $\times 40$. (b) Important inflammatory reaction is observed (IR). Amoebae are observed inside the inflammation areas (arrowheads). Magnification, $\times 60$.

and leucine aminopeptidase (De Jonckheere, 1982). The first isolated and partially characterized protease released by *N. fowleri* is a member of the cysteine protease family. This protease, which has an MW of 30 kDa, has a cytopathic effect on BHK cells. This degradative effect was abrogated by Z-Phe-Ala fluoromethyl ketone, an irreversible cysteine protease inhibitor (Aldape *et al.*, 1994). Other important proteolytic proteins include the naegleriapores A and B (N-A and N-B), which are toxic to human cells. During the biochemical processing of N-A and N-B, the participation of cysteine proteases was essential (Herbst *et al.*, 2002).

In 2004, two groups of researchers demonstrated the presence of cysteine proteolytic activities in both total crude extracts and the secretion products of *N. fowleri* using gelatin zymograms. However, the specific substrate was not identified, and it was not possible to correlate these activities with PAM development (Mat Amin, 2004; Tiewcharoen *et al.*, 2004). Another study showed the presence of a differential pattern of degradation between *N. fowleri* and *N. gruberi* in total crude extracts and in the conditioned medium. The authors found mainly cysteine proteases and small amounts of serine proteases in *N. fowleri* (Serrano-Luna *et al.*, 2007). The same group demonstrated a mucinase activity in total crude extracts of *N. fowleri* (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b). Recently, cathepsin B and cathepsin-B-like cysteine proteases have been cloned and purified. These proteases can degrade a variety of human substrates, such as IgA, IgG, IgM, collagen, fibronectin, haemoglobin and albumin (Lee *et al.*, 2014). Considering all of these findings, the proteases of *N. fowleri* might be excellent targets of chemotherapeutic agents directed against this pathogen (Klemba & Goldberg, 2002; Sajid & McKerrow, 2002; McKerrow *et al.*, 2008).

Other important pathogenic mechanisms that are associated with the capacity of *N. fowleri* to invade the CNS are the active locomotion (Fulton, 1977) and phagocytosis of various host cells, including erythrocytes, microglial and neuroblastoma cells (Marciano-Cabral & John, 1983; Alonso & Zubiaur, 1985). Recently, Nf-actin was associated with phagocytosis (Lee *et al.*, 2007). This protein was localized mainly in phagosome-cup structures (amoebostomes) and in the cytoplasm and pseudopodia during phagocytosis (Sohn *et al.*, 2010). Similarly, contact-independent lysis triggered by *N. fowleri* trophozoites has been reported (Kim *et al.*, 2008b). This lysis was performed in a non-contact system, and the results showed morphological changes, such as cell membrane destruction and a reduction in the number of human microglial cells, due to the secretion of *N. fowleri* proteins. Moreover, a significant increase in the percentage of apoptotic cells (16%) was observed in the non-contact system compared with that in *N. fowleri* lysates (Kim *et al.*, 2008b). Another important molecule described is Nf-cHSP70: the biological roles of this protein are not clear, but it is thought that it may protect amoebae from environmental damage, particularly that caused by high temperatures. Likewise, Nf-cHSP70 has been associated with the pathogenicity and proliferation of *N. fowleri* (Song

et al., 2007, 2008). Additionally, *N. fowleri* utilizes mechanisms to evade the immune response, such as capping formation, and this strategy is sufficient for evading immunoglobulins (IgA and IgG) (Shibayama *et al.*, 2003). *N. fowleri* can also avoid complement-mediated lysis, a property that has been associated with the presence of a 'CD59-like' molecule (Ferrante & Thong, 1979). All of the molecules and mechanisms described above have been correlated with the capacity of *N. fowleri* to produce damage. Investigations of this amoeba conducted by different groups throughout the world can contribute to a better understanding of the physiopathology of PAM and improve the management and treatment of this devastating CNS infection.

Clinical features

The typical symptoms of PAM appear during the first week after infection with *N. fowleri* trophozoites. There are no distinctive clinical features to differentiate PAM from other types of meningitis. Therefore, it is very important that physicians obtain a detailed clinical history of the patients (Jain *et al.*, 2002; Naqi & Azeemuddin, 2013). The earliest symptoms include severe headache, a high fever and neck stiffness, followed by anorexia, vomiting, irritability, photophobia and neurological abnormalities, including diplopia, lethargy, seizures and coma. Cranial nerve palsies may indicate brain oedema (Trabelsi *et al.*, 2012; Budge *et al.*, 2013). Death occurs between the third and seventh days after symptom onset (Valenzuela *et al.*, 1984; Yoder *et al.*, 2012). Autopsies of PAM patients have revealed brain inflammation with severe tissue damage throughout the area of invasion, with ulceration of the olfactory mucosa and necrosis of the olfactory nerves (Sugita *et al.*, 1999; Visvesvara, 2013). Microscopically, the OBs were almost completely disorganized by fibrin-purulent exudates and by haemorrhaging from necrotic blood vessels, and the adjacent frontal cortex exhibited the invasion of a considerable number of amoebae (Hannisch & Hallagan, 1997).

Diagnosis

To develop an appropriate therapy for the rapidly fatal PAM, accurate and early diagnosis is necessary because PAM is often misdiagnosed as was previously mentioned (Da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). Therefore, it is imperative to perform a complete and precise clinical history. Physicians should obtain information regarding any recent patient contact with freshwater, including hot springs, and data regarding rhinitis, allergies and other diseases of the upper respiratory tract.

Computed tomography or magnetic resonance imaging studies of the brains of patients with PAM showed multifocal parenchymal lesions, pseudotumoural lesions, meningeal exudates, haemorrhagic infarcts and necrosis in the brain. In addition, Kidney & Kim (1998) reported oedema

and hydrocephalus in patients with PAM. However, these methodologies cannot differentiate among cases of meningitis with different aetiologies. A correct and prompt diagnosis can be reached by a microscopic examination of the cerebrospinal fluid (CSF) to detect motile trophozoites. The colour of the CSF of a PAM patient may range from greyish to yellowish-white, and the CSF is sometimes tinged red due to the presence of a few erythrocytes (250 cells mm^{-3}). However, the red blood cell count increases during the later stages of the disease (24 600 cells mm^{-3}) (Visvesvara *et al.*, 2007).

The microscopic examination of the CSF can be supported by staining using Giemsa, haematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff and Wright stains. However, the Gram stain is not useful in identifying *Naegleria* trophozoites (Martinez & Visvesvara, 1997; CDC, 2013). Under the microscope, *N. fowleri* trophozoites exhibit a typical amoeboid form. To corroborate this morphological observation, it is necessary to perform differential identification using the flagellation test (FT). To perform the FT, the CSF is incubated in an isotonic saline solution for 2 h. The FT is a useful tool because other amoeboid species, such as *E. histolytica*, *Acanthamoeba* spp., *Sappinia* spp. and *B. mandrillaris*, can also infect the CNS. Some *N. fowleri* isolates are poorly flagellated under laboratory conditions, causing their misidentification (Behets *et al.*, 2003). In this case, immunofluorescence techniques or ELISAs using specific antibodies can be used to reach the proper diagnosis (Martinez & Visvesvara, 1997). Different modalities of the PCR (real-time, nested and multiplex PCR) can also be employed in clinical diagnostic and research laboratories. Sensitive PCR assays to detect the presence of *N. fowleri* in clinical and environmental samples with high specificity have been utilized (Réveiller *et al.*, 2002). A nested-PCR assay has been developed to detect *N. fowleri* amoebae in environmental samples. This method is based on the amplification of a 166 bp fragment of the *Mp2Cl5* gene, which is related to the virulence of the amoeba (Réveiller *et al.*, 2002; Maclean *et al.*, 2004).

Other researchers developed an ITS-based PCR assay that allows the identification of *Naegleria* spp. (Pélandakis *et al.*, 2000; Hara & Fukuma, 2005; Robinson *et al.*, 2006; Madarová *et al.*, 2010). To improve the clinical diagnosis, a multiplex real-time PCR assay using probes specific for 18S rRNA has been developed, which allows the simultaneous detection of *N. fowleri*, *B. mandrillaris* and *Acanthamoeba* in the same sample (Qvarnstrom *et al.*, 2009). However, despite the development of various sensitive PCR assays, they cannot be widely applied, and most clinical cases are confirmed by post-mortem biopsies employing haematoxylin and eosin staining (Martinez & Visvesvara, 1991). Another procedure for identifying *N. fowleri* trophozoites is culturing CSF samples in nutritive agars to obtain axenic cultures of amoebae (Carter, 1970). More recently, it has been proposed that a diagnosis could be made by recovering motile trophozoites from the nasal cavity by washing it with a saline solution (Baig & Khan, 2015).

Treatment

It is important to highlight that an appropriate diagnosis is the key to choosing an appropriate treatment. However, PAM is not commonly confirmed during the early stages of infection, and most people infected with this organism die. Because of the high mortality rate, more effective drugs are urgently needed. Drug discovery research has improved since the first report of PAM (Fowler & Carter, 1965; Carter, 1969; Rice *et al.*, 2015). In 1969, Carter employed several drugs; he found that only amphotericin B (AmB) had an amoebicidal effect *in vitro* and a protective effect *in vivo* (Carter, 1969). Since then, AmB has been employed alone or in combination with other drugs to the treatment of PAM (Table 1). The effect of AmB on *Naegleria* was corroborated by Schuster & Rechthand (1975). They reported that the effects of AmB differed depending on the stage of the cultures, observing an amoebicidal effect during the lag phase and a proliferation-inhibitory effect during the log phase (Schuster & Rechthand, 1975). It is important to note that the AmB does not specifically target against *N. fowleri*. The biochemical mechanism underlying the effect of AmB involves lysis of the cell membrane, specifically through interaction with sterols in the membrane, even those of human cells (and more efficiently through interaction with ergosterol in fungal cells) (Brajtburg & Bolard, 1996), which is why AmB is considered toxic, mainly causing renal toxicity. AmB is generally employed at low concentrations for the treatment of fungal infections. However, clinical doses in the range 0.25–1.5 mg kg^{-1} day^{-1} have been employed to treat PAM (Apley *et al.*, 1970; Pongvarin & Jariya, 1991; Tiphine *et al.*, 1999).

The first report of clinical cases of humans for whom AmB was employed to treat PAM appeared in 1970 (Apley *et al.*, 1970). In this report, three cases involving children in Great Britain were reported. One of the cases was fatal, despite early diagnosis and treatment, whereas the treatment was successful for the other two patients. However, one of the patients was initially diagnosed with a severe sore throat and was treated with oral penicillin. Subsequently, pyogenic meningitis was diagnosed, and the treatment was changed to intravenous administration of AmB at a dose of 0.25–1 mg kg^{-1} plus sulphadiazine at a dose of 750 mg kg^{-1} . Unfortunately, the patient died approximately 2 weeks after admission. In contrast, the other two patients were treated with the same regimen of AmB and sulphadiazine but not with penicillin. They had a complete symptom-free recovery (Apley *et al.*, 1970). Later, AmB was continuously employed during the treatment of PAM, even when used in combination with other drugs. In 2002, a 26-year-old female was diagnosed with PAM and was treated with AmB at a dosage of 1 mg kg^{-1} daily, rifampicin at 450 mg kg^{-1} daily and ornidazole at a dosage of 1500 mg day^{-1} until she recovered completely, which took 3 weeks (Jain *et al.*, 2002). To date, AmB is the antibiotic for which there is the most clinical evidence of the successful treatment of humans with PAM. However, only 15 cases of recovery have been reported worldwide (Apley *et al.*, 1970; Duma *et al.*, 1971; Anderson & Jamieson, 1972; Brown, 1991;

Table 1. Clinical reports of PAM associated with AmB treatment

Authors	Year	Treatment	Study
Apley <i>et al.</i>	1970	AmB, sulphadiazine	Clinical report
Duma <i>et al.</i>	1971	AmB	Clinical report
Anderson & Jamieson	1972	AmB	Clinical report
Brown	1991	AmB	Clinical report
Poungvarin & Jariya	1991	AmB, rifampicin, ketoconazole	Clinical report
Loschiavo <i>et al.</i>	1993	AmB	Clinical report
Wang <i>et al.</i>	1993	AmB, rifampicin, chloramphenicol	Clinical report
Jain <i>et al.</i>	2002	AmB, rifampicin and ornidazole	Clinical report
Vargas-Zepeda <i>et al.</i>	2005	AmB, dexamethasone, fluconazole, rifampicin	Clinical report
Yadav <i>et al.</i>	2013	AmB, rifampicin, fluconazole	Clinical report
Sood <i>et al.</i>	2014	AmB, rifampicin, fluconazole	Clinical report
Sharma <i>et al.</i>	2015	AmB	Clinical report
Linam <i>et al.</i>	2015	AmB, rifampin, fluconazole, azithromycin, miltefosine, dexamethasone	Clinical report
Cope <i>et al.</i>	2016	AmB, rifampin, fluconazole, azithromycin, miltefosine, dexamethasone	Clinical report

Poungvarin & Jariya, 1991; Loschiavo *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Jain *et al.*, 2002; Vargas-Zepeda *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2013; Sood *et al.*, 2014; Linam *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Cope *et al.*, 2016). Recently, an investigational breast cancer and anti-*Leishmania* drug, miltefosine (Dorlo *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2015), has shown promise when used in combination with other drugs, and a PAM patient was successfully treated using miltefosine and hypothermia; however, the patient suffered permanent brain damage (Cope *et al.*, 2016). Because of the toxicity of AmB and the low rate of recovery from PAM (5%), researchers are interested in finding new and more effective treatments for this disease. Additionally, some adjunctive therapies have been employed in the treatment of PAM such as the use of anti-inflammatory agents (e.g. dexamethasone) and non-pharmacological procedures like CSF drainage, hyperosmolar therapy, moderate hyperventilation and hypothermia (Cope *et al.*, 2016). Some of the studies aimed at finding novel therapeutic drugs focussed on compounds such as acrolein, isoflavans, rokitomicin, miltefosine/chlorpromazine, corifungin and certain amidino derivatives that showed amoebicidal effects in *Naegleria* cultures and conferred protection in a mouse model (Zhang *et al.*, 1988; Belofsky *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008a, c; Debnath *et al.*, 2012; Rice *et al.*, 2015).

Conclusion

PAM is an acute and fatal disease that has recently become more common in both developed and underdeveloped countries. The number of PAM cases may increase due to global warming, global overpopulation and increased industrial activities. It is urgent that the health community, including medical and diagnostic laboratory technicians, be aware of this disease in order to make timely diagnosis that

could save patients' lives. The knowledge of the biology and pathogenesis of *N. fowleri* in the past 50 years could be used to make faster diagnosis and design new drugs against specific targets to eliminate the amoeba and increase the survival of the patients.

Acknowledgements

We are grateful to Angélica Silva-Olivares for her technical assistance in obtaining the transmission and scanning electron microscopy images of *N. fowleri*. This study was supported by CONACyT grant number 237523.

References

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A. & other authors (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 399–451.
- Aldape, K., Huizinga, H., Bouvier, J. & McKerrow, J. (1994). *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp Parasitol* **78**, 230–241.
- Alonso, P. & Zubiaur, E. (1985). Phagocytic activity of three *Naegleria* strains in the presence of erythrocytes of various types. *J Protozool* **32**, 661–664.
- Anderson, K. & Jamieson, A. (1972). Agglutination test for the investigation of the genus *Naegleria*. *Pathology* **4**, 273–278.
- Apley, J., Clarke, S. K., Roome, A. P., Sandry, S. A., Saygi, G., Silk, B. & Warhurst, D. C. (1970). Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br Med J* **1**, 596–599.
- Baig, A. M. & Khan, N. A. (2015). Tackling infection owing to brain-eating amoeba. *Acta Trop* **142**, 86–88.
- Behets, J., Seghi, F., Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A. & Ollevier, F. (2003). Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Sci Technol* **47**, 117–122.

- Belofsky, G., Carreno, R., Goswick, S. M. & John, D. T. (2006).** Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic amoeba *Naegleria fowleri*. *Planta Med* **72**, 383–386.
- Brajtburg, J. & Bolard, J. (1996).** Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol Rev* **9**, 512–531.
- Brown, R. L. (1991).** Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *Arch Intern Med* **151**, 1201–1202.
- Budge, P. J., Lazensky, B., Van Zile, K. W., Elliott, K. E., Dooyema, C. A., Visvesvara, G. S., Beach, M. J. & Yoder, J. S. (2013).** Primary amebic meningoencephalitis in Florida: a case report and epidemiological review of Florida cases. *J Environ Health* **75**, 26–31.
- Butt, C. G., Baro, C. & Knorr, R. W. (1968).** *Naegleria* (sp.) identified in amebic encephalitis. *Am J Clin Pathol* **50**, 568–574.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013).** Investigational drug available directly from CDC for the treatment of infections with free-living amoebae. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **62**, 666.
- Carrasco-Yepey, M., Campos-Rodriguez, R., Godinez-Victoria, M., Rodriguez-Monroy, M. A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., De Oca, A. C. & Rojas-Hernandez, S. (2013).** *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of alpha-D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitol Res* **112**, 3615–3625.
- Carter, R. F. (1969).** Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria* sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. *J Clin Pathol* **22**, 470–474.
- 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**, 217–244.
- Carter, R. F., Cullity, G. J., Ojeda, V. J., Silberstein, P. & Willaert, E. (1981).** A fatal case of meningoencephalitis due to a free-living amoeba of uncertain identity – probably *Acanthamoeba* sp. *Pathology* **13**, 51–68.
- Cavalier-Smith, T., Fiore-Donno, A. M., Chao, E., Kudryavtsev, A., Berney, C., Snell, E. A. & Lewis, R. (2015).** Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Mol Phylogenet Evol* **83**, 293–304.
- Cerva, L. (1969).** Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science* **163**, 576.
- Cerva, L. & Novak, K. (1968).** Amoebic meningoencephalitis: 16 fatalities. *Science* **160**, 92.
- Cerva, L., Novak, K. & Culbertson, C. G. (1968).** An outbreak of acute, fatal amebic meningoencephalitis. *Am J Epidemiol* **88**, 436–444.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2008a).** Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol Int* **57**, 307–313.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2008b).** Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology* **154**, 3895–3904.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Pacheco-Yépez, 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**, 695–701.
- Chang, S. L. (1979).** Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba. *Folia Parasitol* **26**, 195–200.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., Castañón, 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**, 66–72.
- Chávez-Munguía, B., Segovia-Gamboa, N., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M. & Martínez-Palomo, A. (2011).** *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *J Eukaryot Microbiol* **58**, 463–468.
- Cogo, P. E., Scagli, M., Gatti, S., Rossetti, F., Alaggio, R., Laverda, A. M., Zhou, L., Xiao, L. & Visvesvara, G. S. (2004).** Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerg Infect Dis* **10**, 1835–1837.
- Cope, J. R., Conrad, D. A., Cohen, N., Cotilla, M., DaSilva, A., Jackson, J. & Visvesvara, G. S. (2016).** Use of the novel therapeutic agent miltefosine for the treatment of primary amoebic meningoencephalitis: report of 1 fatal and 1 surviving case. *Clin Infect Dis* **62**, 774–776.
- Cubero-Menéndez, O. & Cubero-Rego, D. (2004).** Primary amoebic meningoencephalitis: a case report. *Rev Neurol* **38**, 336–338.
- da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B. & Marciano-Cabral, F. (2009).** Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdis Perspect Infect Dis* **2009**, 1–14.
- De Jonckheere, J. F. (1982).** Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann Microbiol* **133**, 319–342.
- De Jonckheere, J. F. (2004).** Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist* **155**, 89–103.
- De Jonckheere, J. F. (2011).** Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* **11**, 1520–1528.
- De Jonckheere, J. F. (2012).** The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiol* **7**, 5–7.
- De Jonckheere, J. F. (2014).** What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp Parasitol* **145**, 1–8.
- 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. *Antimicrobial Agen Chemother* **56**, 5450–5457.
- Diaz, J. H. & Boudreaux, J. P. (2013).** Emerging trends in free-living amebic infections of the brain: implications for organ transplantation. *J La State Med Soc* **165**, 314–318.
- Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H. & De Vries, P. J. (2012).** Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **67**, 2576–2597.
- Duma, R. J., Rosenblum, W. I., McGehee, R. F., Jones, M. M. & Nelson, E. C. (1971).** Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. *Ann Intern Med* **74**, 923–931.
- Dyková, I., Kyselová, I., Pecková, H., Oborník, M. & Lukes, J. (2001).** Identity of *Naegleria* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Dis Aquat Organ* **46**, 115–121.
- Feldman, M. R. (1977).** *Naegleria fowleri*: fine structural localization of acid phosphatase and heme proteins. *Exp Parasitol* **41**, 283–289.
- Ferrante, A. & Thong, Y. H. (1979).** Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* **9**, 599–601.
- Fowler, M. & Carter, R. F. (1965).** Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* **2**, 740–742.
- Fritz-Laylin, L. K. & Cande, W. Z. (2010).** Ancestral centriole and flagella proteins identified by analysis of *Naegleria* differentiation. *J Cell Sci* **123**, 4024–4031.
- Fritz-Laylin, L. K., Prochnik, S. E., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Carpenter, M. L., Field, M. C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J. & other authors (2010).** The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**, 631–642.
- 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**, 607–618.
- Fulton, C. (1977).** Intracellular regulation of cell shape and motility in *Naegleria*. First insights and a working hypothesis. *J Supramol Struct* **6**, 13–43.
- Han, K. L., Lee, H. J., Shin, M. H., Shin, H. J., Im, K. I. & Park, S. J. (2004).** The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol Res* **94**, 53–60.
- Hannisch, W. & Hallagan, L. F. (1997).** Primary amoebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature. *Wild Environ Med* **8**, 211–213.
- Hara, T. & Fukuma, T. (2005).** Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Parasitol Int* **54**, 219–221.
- Heggie, T. W. (2010).** Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis* **8**, 201–206.
- Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F. & Leippe, M. (2002).** Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoan *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* **277**, 22353–22360.
- Hysmith, R. M. & Franson, R. C. (1982).** Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim Biophys Acta* **711**, 26–32.
- Jaffar-Bandjee, M. C., Alessandri, J. L., Molet, B., Clouzeau, J., Jacquemot, L., Sampéris, S. & Saly, J. C. (2005).** Primary amoebic meningoencephalitis: 1st case observed in Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* **98**, 11–13.
- Jain, R., Prabhakar, S., Modi, M., Bhatia, R. & Sehgal, R. (2002).** *Naegleria* meningitis: a rare survival. *Neurol India* **50**, 470–472.
- 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**, 791–803.
- 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 amoebic meningoencephalitis in mice. *J Parasitol* **86**, 50–55.
- John, D. T. (1982).** Primary amoebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Ann Rev Microbiol* **36**, 101–123.
- Kaur, H., Seifert, K., Hawkes, G. E., Coumbarides, G. S., Alvar, J. & Croft, S. L. (2015).** Chemical and bioassay techniques to authenticate quality of the anti-leishmanial drug miltefosine. *Am J Trop Med Hyg* **92**, 31–38.
- Kidney, D. D. & Kim, S. H. (1998).** CNS infections with free-living amoebas: neuroimaging findings. *AJR Am J Roentgenol* **171**, 809–812.
- Kim, J. H., Jung, S. Y., Lee, Y. J., Song, K. J., Kwon, D., Kim, K., Park, S., Im, K. I. & Shin, H. J. (2008a).** Effect of therapeutic chemical agents *in vitro* and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agen Chemother* **52**, 4010–4016.
- Kim, J. H., Kim, D. & Shin, H. J. (2008b).** Contact-independent cell death of human microglial cells due to pathogenic *Naegleria fowleri* trophozoites. *Korean J Parasitol* **46**, 217–221.
- Kim, J. H., Lee, Y. J., Sohn, H. J., Song, K. J., Kwon, D., Kwon, M. H., Im, K. I. & Shin, H. J. (2008c).** Therapeutic effect of rokitamycin *in vitro* and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Int J Antimicrob Agen* **32**, 411–417.
- Klemba, M. & Goldberg, D. E. (2002).** Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* **71**, 275–305.
- Kyle, D. E. & Noblet, G. P. (1985).** Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J Protozool* **32**, 99–105.
- Kyle, D. E. & Noblet, G. P. (1987).** Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J Protozool* **34**, 10–15.
- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J. F., De Moura, H., Rechi-Irretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C. & Visvesvara, G. S. (1993).** Five cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *J Clin Microbiol* **31**, 685–688.
- Lares-Villa, F. (2001).** Free-living amoebae infections in Mexico. In *Proceedings IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae*. Paris, France: John Libbey Eurotext.
- Lares-Villa, F. & Hernández-Peña, C. (2010).** Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007–October 2008). *Exp Parasitol* **126**, 33–36.
- Lee, J., Kim, J. H., Sohn, H. J., Yang, H. J., Na, B. K., Chwae, Y. J., Park, S., Kim, K. & Shin, H. J. (2014).** Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitol Res* **113**, 2765–2776.
- Lee, Y. J., Kim, J. H., Jeong, S. R., Song, K. J., Kim, K., Park, S., Park, M. S. & Shin, H. J. (2007).** Production of Nfa1-specific monoclonal antibodies that influences the *in vitro* cytotoxicity of *Naegleria fowleri* trophozoites on microglial cells. *Parasitol Res* **101**, 1191–1196.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J. & other authors (1980).** A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**, 37–58.
- Linam, W. M., Ahmed, M., Cope, J. R., Chu, C., Visvesvara, G. S., Da Silva, A. J., Qvarnstrom, Y. & Green, J. (2015).** Successful treatment of an adolescent with *Naegleria fowleri* primary amoebic meningoencephalitis. *Pediatrics* **135**, e744–748.
- Loschiavo, F., Ventura-Spagnolo, T., Sessa, E. & Bramanti, P. (1993).** Acute primary meningoencephalitis from *Naegleria fowleri*: report of a clinical case with a favourable outcome. *Acta Neurol* **15**, 333–340.
- López-Corella, E., De León, B. & De Jonckheere, J. F. (1989).** Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in an adolescent from Huetamo, Michoacan, Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex* **46**, 619–622.
- Macleán, R. C., Richardson, D. J., LePardo, R. & Marciano-Cabral, F. (2004).** The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitol Res* **93**, 211–217.
- Madarová, L., Trnková, K., Feiková, S., Klement, C. & Obernauerová, M. (2010).** A real-time PCR diagnostic method for detection of *Naegleria fowleri*. *Exp Parasitol* **126**, 37–41.
- Marciano-Cabral, F. & John, D. T. (1983).** Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study. *Infect Immun* **40**, 1214–1217.
- Marciano-Cabral, F. (1988).** Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* **52**, 114–133.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. A. (2007).** The immune response to *Naegleria fowleri* amoebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**, 243–259.
- Martinez, 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**, 465–475.
- Martinez, A. J. & Visvesvara, G. S. (1991).** Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. *Clin Lab Med* **11**, 861–872.
- Martinez, A. J. & Visvesvara, G. S. (1997).** Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas. *Brain Pathol* **7**, 583–598.
- Martinez, 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**, 121–133.
- Martínez-Castillo, M., Ramírez-Rico, G., Serrano-Luna, J. & Shibayama, M. (2015).** Iron-binding protein degradation by cysteine proteases of *Naegleria fowleri*. *Biomed Res Int* **2015**, 416712–416718.

- Mat Amin, N. (2004).** Proteinases in *Naegleria fowleri* (strain NF3), a pathogenic amoeba: a preliminary study. *Trop Biomed* **21**, 57–60.
- McKerrow, J. H., Rosenthal, P. J., Swenerton, R. & Doyle, P. (2008).** Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr Opin Infect Dis* **21**, 668–672.
- Mishra, B. B., Gundra, U. M. & Teale, J. M. (2009).** Toll-like receptors in CNS parasitic infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **336**, 83–104.
- Naqi, R. & Azeemuddin, M. (2013).** *Naegleria* infection of the central nervous system, CT scan findings: a case series. *J Pak Med Assoc* **63**, 399–402.
- Norton, R., Harris, P., Ryan, P. & Simpson, S. (2010).** Another killer of the Australian bush: a rapidly fatal meningoencephalitis in a child. *Clin Infect Dis* **50**, 1422–1424.
- Pantchev, N. & Tappe, D. (2011).** Pentastomiasis and other parasitic zoonoses from reptiles and amphibians. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **124**, 528–535.
- Patterson, M., Woodworth, T. W., Marciano-Cabral, F. & Bradley, S. G. (1981).** Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. *J Bacteriol* **147**, 217–226.
- Poungvarin, N. & Jariya, P. (1991).** The fifth nonlethal case of primary amoebic meningoencephalitis. *J Med Assoc Thai* **74**, 112–115.
- Pélandakis, M., Serre, S. & Pernin, P. (2000).** Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* **47**, 116–121.
- Qvarnstrom, Y., Da Silva, A. J., Schuster, F. L., Gelman, B. B. & Visvesvara, G. S. (2009).** Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* **199**, 1139–1142.
- Rice, C. A., Colon, B. L., Alp, M., Goker, H., Boykin, D. W. & Kyle, D. E. (2015).** Bis-Benzimidazole hits against *Naegleria fowleri* discovered with new high-throughput screens. *Antimicrob Agen Chemother* **59**, 2037–2044.
- Rivera-Aguilar, V., Hernández-Martínez, D., Rojas-Hernández, S., Oliver-Aguillón, G., Tsutsumi, V., Herrera-González, N. & Campos-Rodríguez, R. (2000).** Immunoblot analysis of IgA antibodies to *Naegleria fowleri* in human saliva and serum. *Parasitol Res* **86**, 775–780.
- Robinson, B. S., Monis, P. T. & Dobson, P. J. (2006).** Rapid, sensitive, and discriminating identification of *Naegleria* spp. by real-time PCR and melting-curve analysis. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5857–5863.
- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994).** Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* **20**, 225–241.
- 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**, 31–36.
- Réveiller, F. L., Cabanes, P. A. & Marciano-Cabral, F. (2002).** Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* **88**, 443–450.
- Sajid, M. & McKerrow, J. H. (2002).** Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* **120**, 1–21.
- Scaglia, M., Gatti, S., Brustia, R., Chichino, G. & Rondanelli, E. G. (1991).** Phagocytosis of human erythrocytes by *Naegleria* is not related to species pathogenicity. A phase-contrast cinemicrographic study. *Microbiologica* **14**, 45–53.
- Schuster, F. (1963).** An electron microscope study of the amoeba-flagellate, *Naegleria gruberi* (Schardinger). I. The amoeboid and flagellate stages. *J Protozool* **10**, 297–313.
- Schuster, F. L. & Rechthand, E. (1975).** *In vitro* effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboid flagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* **8**, 591–605.
- Schuster, F. L. & Visvesvara, G. S. (2004).** Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* **34**, 1001–1027.
- 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**, 411–417.
- Shakoor, S., Beg, M. A., Mahmood, S. F., Bandea, R., Sriram, R., Noman, F., Ali, F., Visvesvara, G. S. & Zafar, A. (2011).** Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* **17**, 258–261.
- Sharma, A. & Guleria, S. (2015).** Successful treatment of a case of primary amoebic meningoencephalitis: how important is history taking. *Indian J Crit Care Med* **19**, 126–127.
- Shibayama, M., Serrano-Luna, J., Rojas-Hernández, S., Campos-Rodríguez, R. & Tsutsumi, V. (2003).** Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Can J Microbiol* **49**, 164–170.
- Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Navarro-García, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi, V. & Serrano-Luna, J. (2013).** Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology* **159**, 392–401.
- Siddiqui, R. & Khan, N. A. (2014).** Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3017.
- Sifuentes, L. Y., Choate, B. L., Gerba, C. P. & Bright, K. R. (2014).** The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. *J Environ Sci Health, Part A* **49**, 1322–1330.
- Simpson, A. G. (2003).** Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1759–1777.
- Sohn, H. J., Kim, J. H., Shin, M. H., Song, K. J. & Shin, H. J. (2010).** The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* **106**, 917–924.
- Song, K. J., Song, K. H., Na, B. K., Kim, J. H., Kwon, D., Park, S., Pak, J. H., Im, K. I. & Shin, H. J. (2007).** Molecular cloning and characterization of a cytosolic heat shock protein 70 from *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* **100**, 1083–1089.
- 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**, 313–317.
- Sood, A., Chauhan, S., Chandel, L. & Jaryal, S. C. (2014).** Prompt diagnosis and extraordinary survival from *Naegleria fowleri* meningitis: a rare case report. *Indian J Med Microbiol* **32**, 193–196.
- Sugita, Y., Fujii, T., Hayashi, I., Aoki, T., Yokoyama, T., Morimatsu, M., Fukuma, T. & Takamiya, Y. (1999).** Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Pathol Int* **49**, 468–470.
- Tiewcharoen, S., Komalamisra, N. & Junnu, V. (2004).** Zymogram patterns of *Naegleria* spp isolated from natural water sources in Taling Chan district, Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* **35**, 275–280.
- Tiphine, M., Letscher-Bru, V. & Herbrecht, R. (1999).** Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis* **1**, 273–283.
- 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* **60**, 399–405.
- Tyndall, R. L. & Domingue, E. L. (1982).** Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* **44**, 954–959.

- Valenzuela, G., López-Corella, E. & De Jonckheere, J. F. (1984).** Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **78**, 558–559.
- Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A. V., Vásquez-Morales, J. A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J. F. & Lares-Villa, F. (2005).** Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch Med Res* **36**, 83–86.
- 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**, 1–26.
- Visvesvara, G. S. (2013).** Infections with free-living amoebae. *Handb Clin Neurol* **114**, 153–168.
- Wang, A., Kay, R., Poon, W. S. & Ng, H. K. (1993).** Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *Clin Neurol Neurosurg* **95**, 249–252.
- WHO (2009).** www.who.int/topics/epidemiology/en/.
- Yadav, D., Aneja, S., Dutta, R., Maheshwari, A. & Seth, A. (2013).** Youngest survivor of *Naegleria meningitis*. *Indian J Pediatr* **80**, 253–254.
- Yoder, J. S., Eddy, B. A., Visvesvara, G. S., Capewell, L. & Beach, M. J. (2010).** The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962–2008. *Epidemiol Infect* **138**, 968–975.
- Yoder, J. S., Straif-Bourgeois, S., Roy, S. L., Moore, T. A., Visvesvara, G. S., Ratard, R. C., Hill, V. R., Wilson, J. D., Linscott, A. J. & other authors (2012).** Primary amoebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clin Infect Dis* **55**, e79–85.
- Yousuf, F. A., Siddiqui, R., Subhani, F. & Khan, N. A. (2013).** Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. *J Water Health* **11**, 371–375.
- Zhang, L., Marciano-Cabral, F. & Bradley, S. G. (1988).** Effects of cyclophosphamide and a metabolite, acrolein, on *Naegleria fowleri* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 962–965.