



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS-IPN**



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

**“Caracterización, identificación y purificación
de una mucinasa producida por *Naegleria fowleri*”**

Tesis que presenta

M en C. Martínez Castillo Moisés Pablo

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de tesis

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

México, Distrito Federal

Enero, 2017

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas.

Así mismo, se contó con las asesorías del Dr. José de Jesús Serrano Luna, Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dr. José Manuel Galván Moroyoqui y Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT N° 237523)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis mentores y amigos, a la pareja que con su estímulo y paciencia ha forjado el amor y el gusto a la investigación. Gracias Dra. Mineko Shibayama y Dr. Jesús Serrano.

Gracias a todo el equipo de trabajo en particular a la auxiliar Angélica Silva Olivares por su apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros Roberto Cárdenas, Daniel Coronado, Nadia Flores y Paula Guzmán por su tolerancia y compañerismo.

Gracias a todo el cuerpo de investigadores que evaluaron y tuvieron tiempo para dirigir este trabajo desde su planteamiento hasta la conclusión del mismo.

Gracias a mis padres por su infinito amor, su paciencia, empuje y fortaleza para que alcanzara una de mis metas.

Gracias a mis hermanos por acompañarme desde la infancia y acompañarme hombro con hombro a saltar las adversidades y enseñarme a disfrutar de la vida.

Gracias al CONACyT por el apoyo recibido. Espero que el estímulo a la ciencia y a la educación siempre sea brindado ya que un país con ciencia y con pilares educativos siempre será un país de progreso.

DEDICATORIA

A mis padres

Sin duda a mi madre por darme su inmenso amor, apoyo y tiempo. Por mostrarme que en este mundo se pueden alcanzar las metas a pesar de surgir de la cuna humilde, que nunca hay que bajar los brazos ni doblegarse en la adversidad, por mostrarme que hay que expresar la opinión sin imponer las ideas y a levantar la voz cuando se es necesario.

A mi padre, le dedico este esfuerzo ya que sin él mi mundo sería incompleto, porque él ha sido el pilar que vino a equilibrar la familia, por mostrarme el orden y el cómo arreglar las eventualidades de la vida.

A mis hermanos

A mis compañeros de juego y de enseñanza, a mis complementos en la vida los amo Jazmín y Caín Castillo.

A mi cómplice

A la mujer que me ha impulsado como ser humano, gracias por no soltar mi mano en la fortuna y mucho menos en la adversidad. Lorena Santos. Gracias.

ÍNDICE

	pp
Resumen	
Abstract	
1. Introducción.....	1
1.1 Taxonomía y distribución.....	2
1.2 Morfología y ciclo de vida	3
1.3 Epidemiología.....	5
1.4 Diagnostico y cuadro clínico.....	6
1.5 Tratamiento.....	7
2. Respuesta del hospedero	8
2.1 Respuesta humoral	8
2.2 Respuesta celular	9
2.3 Inmunidad innata	10
3. Mecanismos de patogenicidad.....	11
4. Proteasas	12
4.1 Tipos de proteasas	13
4.2 Clasificación de cisteína proteasas.....	13
4.3 Proteasas en protozoarios	15
5. Mucinas y mucinasas	17
5.1 Mucinas en vías aéreas superiores	17
5.2 Mucinasas en protozoarios	19
6. Antecedentes directos	20
7. Justificación	22
8. Hipótesis	22
9. Objetivo general	23
10. Objetivos particulares	23
11 Material y métodos	24
11.1 Cultivo de amibas.....	24
11.2 Cultivo celular.....	24
11.3 Preparación de los productos de secreción (PS) y extracto total amibiano (ETA).....	24
11.4 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio y etanol	25
11.5 Determinación de actividades proteolíticas por zimografía.....	25

11.6 Especificidad de degradación de sustrato	26
11.7 Estimulación de la producción de mucinasas	26
11.8 Determinación bioquímica parcial de la actividad mucinolítica	27
11.9 Cromatografía de intercambio iónico	27
11.10 Electroforesis bidimensional.....	27
11.11 Espectrometría de masas MALDI-TOF-MS.....	28
11.12 Ensayo de glicosidasas en <i>N. fowleri</i>	29
11.13 Diseño de péptidos e inmunización de conejos.....	30
11.14 Detección y localización de la glicosidasa (GH) y dipeptidil aminopeptidasa en <i>N. fowleri</i>	31
11.15 Inhibición del efecto citopático utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP.....	32
11.16 Inhibición de la degradación de MUC5AC utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP.....	33
11.17 Curvas de supervivencia en presencia de anticuerpos anti-GH y anti-DAP.....	34
12. Resultados	35
12.1 Determinación de proteasas en los PS y ETA de <i>N. fowleri</i>	35
12.2 Detección de actividades mucinolíticas en PS de <i>N. fowleri</i>	37
12.3 Degradación específica de la MSB por PS de <i>N. fowleri</i>	39
12.4 Estimulación de la secreción de mucinasas en los trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	41
12.5 Inhibición de mucinasas con inhibidores de cisteína y serina proteasas.....	42
12.6 Identificación de proteínas mucinolíticas por espectrometría de masas.....	43
12.7 Purificación parcial de mucinasas por medio de cromatografía de intercambio iónico.....	44
12.8 Análisis bidimensional de proteínas mucinolíticas en <i>N. fowleri</i>	45
12.9 Actividad de glicosidasas secretadas por <i>N. fowleri</i>	46
12.10 Diseño de péptidos de la glicosil hidrolasa y de la aminopeptidasa secretadas por <i>N. fowleri</i>	47
12.11 Detección de la GH y de la DAP en <i>N. fowleri</i>	49

12.12 Inhibición del efecto citopático inducido por trofozoítos de <i>N. fowleri</i> utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP.....	52
12.13 Inhibición de la degradación de la mucina MUC5AC utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP.....	54
12.14 Anticuerpos anti-GH y/o DAP retrasan la mortalidad de la MAP experimental.....	55
13. Discusión	57
14. Conclusión	63
15. Perspectivas	64
13. Bibliografía	65
14. Anexo.....	74

Índice de figuras

Introducción		
Figura 1	Ciclo de vida de <i>N. fowleri</i>	4
Resultados		
Figura 1	Perfil de proteínas y Wb de los productos de secreción (PS) y extracto crudo amibiano (ETA) de <i>N. fowleri</i>	36
Figura 2	Perfil proteolítico de los PS y del ETA de <i>N. fowleri</i> a diferentes valores de pH utilizando gelatina como sustrato...	36
Figura 3	Perfil proteolítico de los PS y del ETA de <i>N. fowleri</i> a diferentes valores de pH utilizando mucina como sustrato.....	37
Figura 4	Detección de actividades mucinolíticas en los PS tratados con con sulfato de amonio.....	38
Figura 5	Detección de actividades mucinolíticas en los PS precipitados con etanol	39
Figura 6	Degradación específica de la MSB	40
Figura 7	Inducción de la secreción de mucinasas	41
Figura 8	Inhibición de la actividad mucinolítica.....	42
Figura 9	Purificación de la actividad mucinolítica utilizando cromatografía de intercambio iónico.....	44
Figura 10	Análisis bidimensional de la fracción enriquecida con mucinasa.....	45
Figura 11	Degradación de sustratos glicosídicos por glicosidasas secretadas de <i>N. fowleri</i>	46
Figura 12	Predicción 3D de las proteínas mucinolíticas e identificación de las regiones inmunogénicas	48
Figura 13	Titulación de anticuerpos generados contra la GH y la DAP.....	49
Figura 14	Detección de la GH y DAP en la FEM de <i>N. fowleri</i>	50
Figura 15	Inmunolocalización de la GH y DAP en los trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	51
Figura 16	Protección del efecto citopático inducido por <i>N. fowleri</i> en presencia de anticuerpos contra la GH o contra la	

	DAP.....	53
Figura 17	Inhibición de la degradación de MUC5AC utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP	54
Figura 18	Anticuerpos anti-GH y/o anti-DAP retrasan la mortalidad de los ratones inducidos a MAP.....	56

Índice de Tablas

Tabla 1.	Proteasas e hidrolasas identificadas por espectrometría de masas	43
----------	--	----

RESUMEN

La meningoencefalitis amibiana primaria fulminante ocurre cuando el agua contaminada con trofozoítos de *Naegleria fowleri* entran por la cavidad nasal, posteriormente las amibas migran al cerebro. La capacidad de este patógeno para evadir la respuesta inmune de la mucosa olfatoria ha sido asociada con las proteasas presentes en los extractos crudos amibianos. Sin embargo, la actividad mucinolítica no había sido determinada en los productos de secreción. En el presente trabajo, se detectaron las actividades mucinolíticas de >250, 94 y 53 kDa secretadas por *N. fowleri*, de las cuales solo la actividad de 94 kDa fue inducible por mucina y su actividad fue abatida con pHMB. La identificación de las proteínas de la actividad de 94 kDa por MALDITOF-MS reveló la presencia de una glicosil hidrolasa (GH) y una dipeptidil aminopeptidasa (DAP). La actividad de GH fue confirmada por medio del uso de carbohidratos acoplados al grupo cromogénico 4-nitrofenil. Basados en los resultados de espectrometría de masas se diseñaron y produjeron anticuerpos contra la GH y la DAP, los cuales fueron utilizados para inhibir el efecto citopático y la degradación de la mucina MUC5AC causada por *N. fowleri in vitro*. Adicionalmente, se demostró que trofozoítos pre-incubados con los anticuerpos anti-GH y/o anti-DAP fueron capaces de retrasar la mortalidad de los ratones infectados hasta por 10 días comparado con los ratones instilados con amibas sin tratamiento con anticuerpos inducidos a la MAP experimental. Nuestros hallazgos sugieren fuertemente que las actividades mucinolíticas secretadas por *N. fowleri* tienen un papel importante en la degradación de la mucina humana MUC5AC y en consecuencia esto permita la invasión de los trofozoítos al sistema nervioso central.

ABSTRACT

Fulminant primary amoebic meningoencephalitis occurs when water containing *Naegleria fowleri* trophozoites enters the nasal cavity, followed by migration of the amoebae to the brain. This pathogen evades the innate immune response in the olfactory mucosa. Additionally, its capacity to evade the mucus layer has been associated with proteases present in total protein extracts. However, the mucinolytic activity in secretory products (SPs) has not been determined. Here, we detected mucinolytic activities at >250, 94 and 53 kDa released by *N. fowleri*. Moreover, only the 94 kDa activity was inducible by mucin and its activity was abolished with the pHMB inhibitor. MALDI-TOF-MS analysis from 94 kDa identified a glycoside hydrolase (GH) and dipeptidyl aminopeptidase (DAP). The enzymatic activity of GH could be confirmed using carbohydrates coupled to 4-nitrophenyl as chromogenic substrates. Based on the mass spectrometry identity, a synthetic peptide was designed to produce antibodies against the GH and DAP; these antibodies could inhibit the cytopathic effect and the MUC5AC mucin degradation induced by *N. fowleri* in *in vitro* assays. Furthermore, mainly anti-GH antibodies could delay mice mortality up to 17 post-infection days using the mouse model. Our data strongly suggest that mucinolytic activities secreted by *N. fowleri* are playing a relevant role in the human mucus degradation and consequently allowing the invasion of *N. fowleri* trophozoites to the central nervous system.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de los protozoarios existen numerosas especies que son capaces de infectar al ser humano. Los protozoarios pertenecientes a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y más recientemente *Sappinia* están catalogados por la comunidad científica como amibas de vida libre (AVL) debido a su capacidad de realizar su ciclo celular en la naturaleza sin la necesidad de un hospedero para su supervivencia, transmisión o diseminación. Sin embargo, se tienen numerosos reportes en donde las AVL pueden comportarse como protozoarios parásitos, tanto del hombre como de otros mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces [1-3] por lo cual se les considera organismos anfitriónicos. Las AVL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diferentes muestras de suelo y agua en todo el mundo [4]. Los reportes de infecciones por parte de este grupo de microorganismos han incrementado de manera significativa en los últimos 10 años [4], esto debido probablemente a las variaciones climáticas que favorecen su desarrollo, así como también al crecimiento poblacional que conlleva a asentamientos humanos en espacios donde normalmente se distribuyen este tipo de protozoarios. Durante una infección por este tipo de microorganismos principalmente se afecta el sistema nervioso central (SNC) y otros órganos como la piel, los pulmones y ojos [5].

Desde el reconocimiento de *Naegleria fowleri*, como agente causal de la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) se han realizado numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* para comprender los mecanismos de patogenicidad e invasión de este protozoario [6, 7]. La MAP es una infección aguda que en la mayoría de los casos afecta a niños y adultos jóvenes aparentemente sanos [5, 8]. La infección es generalmente asociada a la exposición a cuerpos de agua contaminados con el protozoario como son: estanques, lagos, canales de riego o albercas mal cloradas e incluso existen reportes de infecciones con el agua de uso doméstico y prácticas religiosas como la ablución. Desafortunadamente la mayoría de los casos de MAP culminan con la muerte de los individuos entre el tercero y décimo días posteriores a la aparición de los primeros síntomas [9, 10].

1.1 Taxonomía y distribución

Recientes clasificaciones con marcadores moleculares y características taxonómicas ubican a este protozooario dentro del phylum Percolozoa [1, 2]. Sin embargo, recientemente se ha logrado secuenciar el genoma completo de *Naegleria gruberi*, por lo cual es muy probable una re-estructuración sistemática y taxonómica de este género [3, 4]. El género *Naegleria* tiene una distribución cosmopolita [2, 5, 6], se le encuentra tanto en climas tropicales o subtropicales y se le aísla del suelo, lagos, albercas mal cloradas, suministros de agua doméstica y aguas residuales [6, 7]. El lavado de los suelos por la lluvia favorece la distribución de las amibas a los diversos tipos de cuerpos de agua. La distribución vertical de este protozooario se ha correlacionado con parámetros físicos, químicos y biológicos. En cuanto a los factores biológicos se refiere, estudios realizados por Kyle y Noblet (1985) encontraron relación directa entre el número de amibas en las capas de agua con la cantidad de cianobacterias y otras eubacterias presentes, por lo que se sugiere que estos microorganismos pueden servirles como fuente de alimento [5]. Por otro lado, se han aislado un mayor número de amibas en estratos con altos índices de hierro y manganeso. Así mismo, *N. fowleri* tiene la capacidad de crecer en ambientes con un amplio rango de pH [5, 8]. Los intervalos de temperatura parece ser un factor importante en su distribución, aunque se han aislado amibas patógenas en agua dulce a 10°C y del suelo a 8°C. Sin embargo, *N. fowleri* han sido aisladas de aguas con temperaturas elevadas principalmente (de hasta 45°C). Se ha observado que la temperatura es un factor importante que favorece el aumento poblacional ya que a diferencia de otros microorganismos donde la temperatura impacta negativamente la densidad poblacional; en el caso de *N. fowleri* se favorece la colonización debido a que se elimina la competencia con otros microbios. En estudios de ecología de poblaciones en México, se ha reportado que el número de amibas aumenta notablemente durante los meses más cálidos del año, los cuales son de junio a septiembre, esto para el caso del estado de Sonora, donde se reportó por el método del “número más probable” (NMP) que la máxima concentración fue de 201 amibas NMP/L y una mínima de 18 NMP/L [9]. La cantidad de trofozoítos de *N. fowleri* en los cuerpos de agua tiene una implicación directa con el riesgo para adquirir la infección.

1.2 Morfología y ciclo de vida de *N. fowleri*

En el género *Naegleria* se conocen tres estadios diferentes: el trofozoíto, el flagelado y el quiste (Fig 1). Los trofozoítos miden de 15 a 25 μm y son la forma vegetativa en su ciclo de vida; en esta fase el microorganismo puede llevar a cabo sus funciones metabólicas, así como también es capaz de realizar la división celular. Los aislados cultivados en laboratorio son muy activos y presentan la morfología pleomórfica típica amibiana. Su desplazamiento y adherencia están asociados a las proyecciones citoplasmáticas conocidas como lobópodos [10-12]. Además, presentan otras proyecciones citoplasmáticas conocidas como copas alimenticias las cuales están asociadas a su capacidad fagocítica [13, 14]. A nivel ultraestructural, los trofozoítos presentan las características típicas de las células eucariontes [15, 16], incluso recientemente se han aislado los centriolos o cuerpos basales en *N. fowleri* [17]. La membrana plasmática es de aproximadamente 10 nm de espesor y el citoplasma contiene retículo endoplásmico liso y un gran número de ribosomas libres o asociados al retículo endoplásmico rugoso. Se tiene descrito un complejo de membranas y vesículas el cual es un análogo del aparato de Golgi, Por microscopía de luz se pueden observar abundantes vacuolas de diferentes tamaños y numerosas mitocondrias en diversas formas. La presencia de lisosomas fue determinada por medio de tinción para fosfatasa ácida [18]. El núcleo es prominente con respecto al tamaño celular y contiene un nucléolo muy evidente, la envoltura nuclear es típica a la de los demás eucariontes, presenta una doble membrana y gran cantidad de poros; mientras que la membrana nuclear externa se encuentra asociada a ribosomas. La división de los trofozoítos de *N. fowleri* es de tipo pro-mitótica, donde la membrana nuclear y el nucléolo permanecen intactos durante la cariocinesis [19-21]. El trofozoíto cuando cesa un déficit de nutrientes en el medio o bien las condiciones de salinidad o de pH varían, sufre un cambio tanto morfológico como funcional, dando lugar a la fase de flagelado. Esta condición puede ser inducida en el laboratorio, colocando a los trofozoítos en solución salina isotónica o agua destilada estéril [22]. La diferenciación a flagelado involucra cambios morfológicos importantes transformándose de la forma pleomórfica del trofozoíto a una forma de pera con un par o más flagelos en un polo distal. El aparato flagelar maduro por lo general consiste de dos

flagelos, dos cuerpos basales y microtúbulos. Estos flagelos presentan la disposición típica de 9 + 2 y están rodeados de una lámina continua de membrana plasmática [17, 23]. La fase de flagelado es reversible cuando las condiciones son favorables. Se sabe que el flagelado de *N. fowleri* no es capaz de dividirse o alimentarse. Por otra parte, se ha observado que los trofozoítos de *N. fowleri* mantenidos por largos periodos en cultivos axénicos pierden la capacidad de flagelarse y esta propiedad no puede recuperarse por ningún método conocido a la fecha [20].

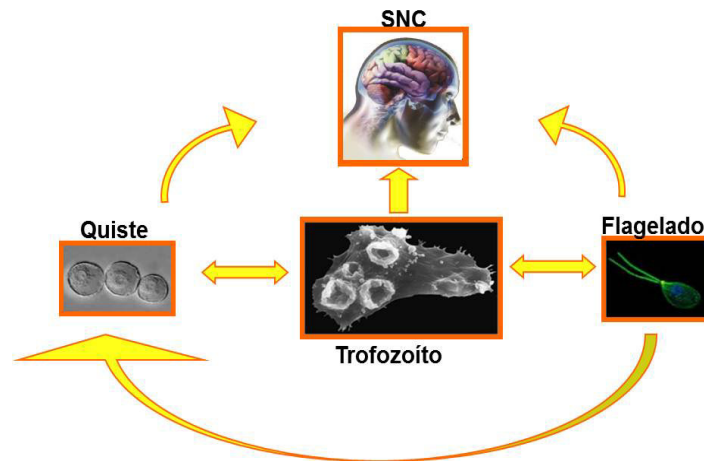


Fig. 1. Ciclo de vida del genero *Naegleria fowleri*

Finalmente, la fase de resistencia o quiste se induce cuando las condiciones ambientales son adversas, como la desecación, la ausencia extrema de nutrientes, la acumulación de productos de desecho, la ausencia de oxígeno, cambios de pH, alta salinidad e incluso por sobrepoblación [15, 24]. El proceso de enquistamiento comienza con la expulsión de agua, la reorganización de su citoplasma y la síntesis de una doble pared celular [25]. El quiste está compuesto de una doble membrana de aproximadamente 20 nm de espesor y se considera que está formada principalmente por mucopolisacáridos y celulosa [26]. Esta pared celular presenta poros sellados por una delgada capa mucoide. Se ha observado que las características morfológicas del quiste cambian en relación a las condiciones del cultivo. Esta situación fue una causa importante para eliminar la taxonomía tradicional para clasificar al tipo de *Naegleria* por la morfología de la pared quística. Durante las etapas tempranas de enquistamiento, las mitocondrias se alargan y las cisternas del retículo endoplásmico se ensanchan. El material de la pared celular del quiste es sintetizado y empaquetado por el retículo endoplásmico rugoso. Durante el

desenquistamiento de *N. fowleri*, la pared del quiste permanece intacta y el trofozoíto emerge a través de los poros [25, 27, 28]. El quiste vuelve a su forma vegetativa cuando las condiciones del ambiente favorecen el desenquistamiento. Se ha observado experimentalmente que tanto el trofozoíto como el flagelado son las fases infectivas en la MAP [29], aunque no se descarta que el quiste también pueda penetrar por la vía nasal y diferenciarse rápidamente a trofozoíto [30]; sin embargo, en las piezas post-mortem humanas de cerebro sólo se ha encontrado la fase trófica.

1.3 Epidemiología

Las infecciones en el sistema nervioso central (SNC) son la segunda causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, solo después de la infección con VIH [31]. La búsqueda de medidas apropiadas de control de las infecciones al SNC requiere de la comprensión y entendimiento de los mecanismos de respuesta del hospedero según el órgano infectado. Los reportes de infecciones del SNC por *N. fowleri* se han documentados y el número de casos sigue en aumento. La amplia distribución de estos microorganismos presentes en cualquier cuerpo de agua con una alta cantidad de materia orgánica, así como parques acuáticos recreativos mal clorados son un riesgo potencial de infección. Hasta el momento se tienen reportados alrededor de 300 casos de MAP en todo el mundo, de los cuales la mayoría se han presentado en Norte América [2, 6, 32, 33]. El Centro de Control de enfermedades de Atlanta (CDC), EUA, reporta de 4 a 6 casos anuales de MAP. La adquisición de la MAP como ya se mencionó está asociada a la actividad acuática en cuerpos donde el protozoario está presente. *N. fowleri* entra por las fosas nasales y viaja a través del neuroepitelio olfatorio hasta alcanzar el SNC [30, 34, 35]. Sin embargo, la incidencia de la MAP es baja, considerando el número de personas que realizan actividades acuáticas en ríos y lagos en donde se encuentra presente *N. fowleri*. Cabanes *et al* (2001), construyeron un modelo matemático para calcular el riesgo de infección por *N. fowleri*; y se determinó un riesgo máximo de 10 trofozoítos de *N. fowleri*/l de agua [36]; con este estudio los autores determinaron que el número de trofozoítos presentes en los cuerpos de agua puede ser un factor importante en la incidencia de MAP. Sin embargo, pudieran existir otros factores (i.e genéticos,

infecciosos, deficiencias o alteraciones en el sistema inmune, etc.) que predispongan a una invasión por este patógeno.

México no es la excepción en casos de MAP dadas las condiciones geográficas y climáticas, así como también las condiciones socioeconómicas y el mal cuidado de las reservas de la biosfera. En nuestro país el primer reporte oficial de la MAP se realizó en 1978 el cual se presentó en un joven de 16 años de edad, el cual remitió como historial clínico el antecedente de haber nadado en canales de riego del valle de Mexicali, Baja California. Este caso fue publicado en 1984 [37] y desde entonces los casos de MAP han aumentado y hasta el momento se tienen al menos 35 casos bien documentados de MAP, incluyendo dos sobrevivientes. Cabe mencionar que más del 80% de los casos en México están referidos a los estados de Baja California y Sonora [38-41]. En esta última entidad federativa, en la zona del Valle del Yaqui se encuentra el último caso de un sobreviviente de la MAP reportado en el mes de abril del 2003. Así mismo, en esta región del norte del país se tiene el reporte del último caso fatal ocurrido en el mes de julio del 2008. Debido a la alta incidencia de casos de MAP, los estados antes mencionados han implementado cada temporada de verano el Sistema de Vigilancia Epidemiológica para el control de la MAP [42]. Desafortunadamente en la actualidad no se cuentan con estudios epidemiológicos y por ello no existe un registro exacto de casos de MAP que se presentan en todo el país.

Es muy importante remarcar que la incidencia real de esta enfermedad se encuentra subvalorada debido al desconocimiento por parte de la comunidad médica de este patógeno, ya que no indican la realización de pruebas de diagnóstico específicas para discriminar entre casos de meningitis bacteriana, viral o causadas por *N. fowleri* [2, 43].

1.4 Diagnóstico y cuadro clínico

El periodo de incubación dura de tres a siete días y los síntomas de la enfermedad comienzan uno o dos días después de la exposición al agua contaminada. Los pacientes acuden al médico por un dolor de cabeza intenso y persistente, principalmente localizado en la zona frontal. Este malestar puede estar acompañado de fiebre (38-40°C), distorsiones en la percepción del sabor y olor, somnolencia, confusión, fotosensibilidad, fiebre, vómito en proyectil y rigidez de cuello [44]. En ocasiones pueden presentarse

crisis convulsivas y algunos síntomas de compromiso respiratorio. Todo este cuadro puede llegar incluso a un estado de coma profundo y en el 90% de los casos a la muerte [31]. La muerte puede ocurrir entre el tercero y el décimo día después de la aparición de los síntomas [45]. El diagnóstico clínico suele confundirse con la sintomatología de otro tipo de meningitis (viral, bacteriana o por hongos), lo cual puede retardar el reconocimiento de la enfermedad. Una aparente meningoencefalitis asociada a una historia reciente de natación debe alertar a los médicos de una posible MAP. Por ello es recomendable realizar un análisis microscópico de líquido cefalorraquídeo (LCR) en fresco. En el LCR se debe buscar la presencia de trofozoítos móviles con emisión de pseudópodos digitiformes. Para discriminar entre *N. fowleri* y células del hospedero (macrófagos) o de otras amibas como el caso de *Entamoeba histolytica*, se puede realizar la prueba de enflagelación la cual consiste en colocar una muestra de sedimento de LCR e incubarla en solución salina isotónica durante 2 h a 37°C; después del tiempo de incubación se debe buscar la presencia de organismos piriformes flagelados muy activos [43]. El diagnóstico se puede corroborar mediante inmunodetección o con técnicas de biología molecular, si se cuentan con las sondas específicas para realizar diferentes tipos de PCR. El cultivo del LCR y la prueba de virulencia en el ratón pueden ser confirmatorios para el diagnóstico. A pesar de que las instituciones públicas de salud del país no cuenten con equipos para un diagnóstico oportuno, el conocimiento y divulgación de esta patología, permitirá tomar las consideraciones pertinentes para ofrecer un diagnóstico sensible, específico y económico para el manejo oportuno de la enfermedad que pueda evitar la muerte de los pacientes.

1.5 Tratamiento

Una vez diagnosticada la MAP, debe comenzarse inmediatamente el tratamiento dada la evolución aguda de esta enfermedad. Como agente terapéutico empleado contra la MAP se utiliza la amfotericina B. Aunque el tratamiento no es específico contra el protozooario, es el fármaco que ha mostrado eficiencia clínica solo o en combinación con otros fármacos en los 15 casos de recuperación reportados a nivel mundial [46]. Es importante mencionar que en estos pacientes el diagnóstico y el tratamiento fueron oportunos. Algunas de las drogas que se han utilizado en combinación con amfotericina

B son: rifampicina, azitromicina, miltefosina, clorpromacina y/o roquitamicina [46]. El mecanismo de acción de la amfotericina B radica en su capacidad de alterar las membranas celulares, por su gran afinidad al ergosterol, tanto de hongos como de células eucariontes, lo cual provoca la pérdida de iones potasio y de otros contenidos celulares. Estudios in vitro demostraron que este fármaco provoca en los trofozoítos de *N. fowleri*, alteraciones en la morfología nuclear, alteraciones en la membrana citoplásmica y del retículo endoplásmico liso y rugoso, así como disminución en el número de vacuolas [47]. Este fármaco ha demostrado gran eficacia; sin embargo, no en todos los casos ha sido exitoso, así como también se conoce su efecto nefrotóxico. Por otra parte, se ha propuesto el uso de azitromicina para el tratamiento de la MAP [48], mostrando una eficacia del 100% de protección en la MAP experimental en el modelo murino (a dosis de 75mg/kg/día), en comparación con la amfotericina B que sólo protege al 50% (a dosis de 7.5mg/kg/día). Así mismo, otros fármacos que han mostrado actividad amebicida son la miltefosina, clorpromacina y roquitamicina, presentando una sobrevivencia de 55%, 75% y 80%, respectivamente en comparación a la amfotericina B de solo 40% utilizando el modelo murino, además de que estos fármacos no presentan citotoxicidad en el modelo animal [49]. Recientemente también se ha reportado el uso de otro fármaco denominado corifungin, el cual ha mostrado que tiene gran capacidad amebicida ya que muestra un 100% de sobrevivencia de los ratones instilados con *N. fowleri* [50].

2. RESPUESTA DEL HOSPEDERO

2.1 Respuesta humoral

La respuesta humoral no es una respuesta inmediata ante una infección por *N. fowleri*, considerando que el desarrollo de esta patología es aguda y fulminante en el 90% de los casos y que tiene una evolución de entre 3 y 10 días, por lo cual la generación de anticuerpos por parte de hospedero pudiera no ser efectiva. Sin embargo, existen reportes del posible papel protector de los anticuerpos de la clase IgA e IgM. En el año 2001 Rivera *et al*, determinaron la presencia de estos anticuerpos en saliva y suero en individuos residentes en zonas endémicas de este patógeno y que padecían enfermedades del tracto respiratorio superior, los compararon con muestras de individuos sanos de la

misma zona, así como también con individuos sanos de una región no endémica. Los autores demostraron en muestras de saliva y suero de pacientes con enfermedades del tracto respiratorio superior, la presencia de anticuerpos que reconocen antígenos de *N. fowleri*. Los autores sugieren que esto podría ser el resultado del transporte activo de los anticuerpos a través de las células epiteliales o a través de trasudación por los capilares dañados y que la presencia de estos anticuerpos puede deberse a una inmunización específica o por la infección con otros antígenos de amibas, como es el caso de *E. histolytica* que producen reacción cruzada [51]. Algunos estudios demuestran el posible papel de la inmunidad humoral en la protección contra la MAP y que esta protección sea dada a través de la inmovilización de las amibas, evitando su rápida migración hacia el cerebro, facilitando la lisis mediada por complemento y neutralizando moléculas citotóxicas de la amiba [43]. Se ha sugerido que la presencia de anticuerpos específicos contra *N. fowleri* se debe a contactos previos con las amibas u otros antígenos de reacción cruzada y que estos contactos previos son los responsables de tener un efecto protector para infecciones subsecuentes evitando la invasión al SNC [51]. Por el contrario, existen estudios de inmunidad pasiva con sueros inmunes de la clase IgG y además con un anticuerpo monoclonal α -*N. fowleri*, con estos estudios los autores demostraron que los anticuerpos por sí solos son incapaces de conferir protección efectiva en contra de un reto letal con trofozoítos de *N. fowleri* [52]. Shibayama *et al* (2003), demostraron que los trofozoítos de *N. fowleri* son capaces de realizar “capping”, internalización y degradación de anticuerpos, por lo que la inmunidad humoral por sí misma no sería un factor importante en la resistencia a la infección por *N. fowleri* [53]. El modelo de la MAP experimental, ha sido utilizado para determinar el efecto de la inmunización a través de la administración repetida con amibas fijadas, extractos amibianos, medio condicionado y dosis sub-letales de amibas vivas. En todos estos esquemas de inmunización se observa una marcada respuesta humoral; sin embargo, sólo se produce una modesta protección contra retos subsecuentes con trofozoítos de *N. fowleri* [54]. En resumen, el conjunto de resultados de estudios con humanos y con animales de laboratorio sugiere que la inmunidad humoral puede participar, pero de manera muy limitada en la MAP; sin embargo, no es la principal línea de defensa en contra de *N. fowleri*.

2.2 Respuesta celular

Con la finalidad de evaluar la respuesta celular se ha valorado la migración de macrófagos no activados. Sin embargo, Reilly *et al* (1983), concluyeron que la inmunidad celular no tiene un impacto relevante en la defensa contra *N. fowleri*, los autores demostraron que el dietilestilbestrol, que abate la hipersensibilidad de tipo retardada, no altera la resistencia a *N. fowleri* en ratones B₆C₃F₁ [54]. Además, Newsome y Arnold (1985) demostraron que ratones congénitamente atímicos y ratones normales, son igualmente susceptibles a la infección por *N. fowleri*, lo que sugiere que la inmunidad celular no juega un papel importante en la resistencia a infecciones por *N. fowleri* [55].

2.3 Inmunidad innata

El acceso de esta amiba hacia su hospedero es a través de la mucosa nasal, por este motivo, el papel de las barreras que constituyen la inmunidad innata deben ejercer, un papel fundamental en el control de la invasión por *N. fowleri*. La eficiencia de estas barreras podría explicar la baja incidencia de MAP en la población. El reconocimiento de moléculas de superficie por parte de las células epiteliales, la barrera física proporcionada por las uniones celulares [56] y las mucosas son los primeros mecanismos de defensa por parte del huésped; se conoce que en las etapas tempranas de la infección, el moco permite la eliminación de trofozoítos de *N. fowleri* [57, 58]. Sin embargo, se ha observado en el modelo murino, que la producción de moco es insuficiente para evitar la invasión de los trofozoítos al neuroepitelio olfatorio y la posterior invasión al SNC, ya que se ha reportado que *N. fowleri* posee una mucinasa de 37 kDa que es capaz de degradar el moco [59]. Por otra parte, los péptidos antimicrobianos como las defensinas producidas por las células del tracto respiratorio, podrían también estar implicadas en la protección contra *N. fowleri* [60].

En cuanto al sistema del complemento, se conoce que se activa la vía alterna del complemento [61]. En otro estudio se demostró que las cepas de *N. fowleri* de elevada

virulencia presentan una mayor resistencia a la lisis por el complemento en comparación con trofozoítos de la cepa no patógena *N. gruberi* [62]. Aparentemente esta resistencia es regulada por mecanismos dependientes de Ca^{2+} [63]. La glicoproteína CD59 cuya función es la de inhibir la formación del complejo de ataque de membrana, como mecanismo regulador intrínseco de varias estirpes celulares, recientemente fue caracterizada en los trofozoítos de *N. fowleri* [64]. En lo que concierne a los macrófagos, se sabe que cuando son activados inespecíficamente por diferentes inmunomoduladores como el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), son capaces de destruir a los trofozoítos de *N. fowleri* a través de un proceso dependiente de contacto, así como también por la secreción de factores citolíticos solubles [65]. Ferrante *et al* (1988) observaron que en ratones carentes de neutrófilos se desarrollaban lesiones cerebrales más extensas y con una mayor mortalidad después de un reto con *N. fowleri*. Así mismo, demostraron que los neutrófilos estimulados con $\text{TNF-}\alpha$, tienen la capacidad de destruir a trofozoítos de *N. fowleri*, previamente opsonizados con anticuerpos o proteínas del complemento. En resumen, se sabe que todos estos mecanismos de defensa en conjunto participan activamente en la protección contra *N. fowleri*, así como de otros microorganismos patógenos. Cabe mencionar que estos estudios básicamente se han realizado en sistemas *in vitro* en el modelo murino.

3. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Durante una infección por *N. fowleri* se sabe que el protozoario despliega diversos mecanismos de patogenicidad para lograr su invasión e instalación en el SNC. El primer mecanismo que se requiere es la adhesión a la célula blanco. Se han descrito algunas proteínas de adhesión como son: la proteína de 60 kDa que es capaz de unirse fuertemente a la fibronectina [66], más recientemente se ha descrito que *N. fowleri*, posee una expresión diferencial de proteínas que tienen afinidad a colágeno-I, fibronectina y laminina-I en comparación con cepas no patógenas [67]. También se ha reportado la presencia de glicoconjugados de manosa y fucosa presentes en los trofozoítos de *N. fowleri* los cuales también fueron identificados en la amiba no patógena *N. gruberi* pero en menor proporción. Adicionalmente, se determinó que estos glicoconjugados participan en la adhesión de los trofozoítos a células epiteliales

(MDCK) [68]. Otro mecanismo con el que cuenta este protozoario para poder invadir el neuroepitelio olfatorio y así acceder al SNC es la locomoción ameboidea la cual le permite migrar entre los tejidos del hospedero [69, 70]. Por otro lado, Serrano-Luna *et al* (2007) caracterizaron las proteasas presentes en *N. fowleri* y determinaron que la actividad proteolítica se lleva a cabo principalmente por cisteína proteasas. Así mismo, el grupo de trabajo determinó que las condiciones óptimas para la actividad de estas proteasas correlacionan con las condiciones fisiológicas de los mamíferos como pH de 7 y temperatura de 37°C [71]. Además, en un modelo *in vitro* se ha sugerido que estas proteasas son capaces de causar alteraciones en las uniones estrechas de los epitelios lo que permitiría a la amiba migrar hasta los bulbos olfatorios [56]. Por otro lado, se han reportado proteínas formadoras de poro denominadas naeglerioporos A y B, las cuales muestran una elevada citotoxicidad en células humanas [72]. Hysmith *et al* (1982) reportaron en estudios *in vitro* que *N. fowleri* también posee niveles elevados de fosfolipasa A y de lisofosfolipasa en comparación con las especies no patógenas [73, 74]. Recientemente se han podido identificar genes relacionados con la virulencia de *N. fowleri* como *nfa1* [75]; se determinó que este gen codifica para una proteína que se localiza sobre la membrana y en las bocas fagocíticas de las amibas y que la expresión aumenta hasta un 60% cuando los trofozoítos se ponen en contacto con células CHO [76]. Otros mecanismos de patogenicidad involucrados son la fagocitosis [13, 28], la lisis contacto dependiente [65], la identificación de la proteína de choque térmico HSP70 [77, 78], la formación de casquete en la membrana plasmática como un posible mecanismo de evasión de las defensas del hospedero [53] y la estimulación de la producción de óxido nítrico [79]. Otra proteasa que ha sido descrita más recientemente y que presenta actividad mucinolítica es la denominada mucinasa de 37 kDa [59].

4. PROTEASAS

Las enzimas que degradan proteínas mediante hidrólisis de los enlaces peptídicos se denominan proteasas. La nomenclatura actual de las enzimas proteolíticas establece que el término proteasa es sinónimo de peptidasa, la forma corta de la expresión “hidrolasa de enlace peptídico”. Se denominan proteinasa o endoproteinasa a las proteasas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos internos de las proteínas y a las proteasas que

catalizan la ruptura de uno o dos enlaces peptídicos de aminoácidos de los extremos, se les llama exopeptidasa de acuerdo al extremo de la molécula que rompe [80]. Las hidrolasas, proteasas o peptidasas catalizan el rompimiento de enlaces peptídicos en proteínas macromoleculares y en péptidos oligoméricos. Las proteasas han sido identificadas en sistemas biológicos desde virus hasta vertebrados. Los proyectos de secuenciación de genomas han llegado a determinar que un 2% de los genes de un organismo codifican para proteasas y que son expresados con poca variación entre especies [81]. Las proteasas varían desde monómeros de 10 kDa a complejos multiméricos de varios cientos de kilodaltones (kDa). La catálisis puede ser iniciada dentro de una cadena polipeptídica (endoproteasa) o bien desde los extremos amino o carboxilo (exopeptidasas).

La mayoría de las proteasas son exopeptidasas que cortan uno o unos cuantos aminoácidos del extremo amino o carboxilo terminal. Las exopeptidasas que actúan en el amino terminal liberan un solo residuo de aminoácidos (aminopeptidasas) o un dipéptido o tripéptido (dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas). Las que actúan en el extremo carboxilo terminal liberan un solo residuo (carboxipeptidasas) o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas). Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos o eliminan residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por puentes isopeptídicos [82].

4.1 Tipos de proteasas

Las endopeptidasas o proteinasas actúan internamente en las cadenas de los polipéptidos y son clasificadas con base al mecanismo catalítico usado durante el proceso hidrolítico. Dentro de esta clasificación se encuentran las serina proteasas (una serina en el sitio activo), metaloproteasas (un ion metal en el sitio activo), cisteína proteasas (una cisteína en el sitio activo) y aspartato proteasas (dos ácidos aspárticos en el sitio activo) [81].

4.2 Clasificación de las cisteína-proteasas

Las cisteína proteinasas requieren un residuo cisteína esencial en el sitio activo para la hidrólisis. Los aminoácidos alrededor de la cisteína del sitio activo (Cis 25 en la

papaína) y de la histidina (His-159 en la papaína) son importantes en el mecanismo catalítico [81].

El grupo tiol es definido como centro nucleofílico debido a la cercanía de una histidina del sitio activo la cual actúa como base general donadora de protones. El grupo sulfhidrilo o -SH de una cisteína y el imidazol de una histidina, dan origen a una díada liberadora de carga tiolato-imidazol. Frecuentemente una asparagina y una glutamina altamente conservadas forman el hueco oxianión, un elemento crucial en la formación de un centro electrofílico para estabilizar al intermediario durante la hidrólisis [80]. Los dos grupos ionizables de la díada tiolato-imidazol permite un amplio rango de pH en la actividad enzimática, consistente con un pKa de cisteína alrededor de 4 y un pKa de ionización de histidina de alrededor de 8.5. La carga se libera al sistema y es estabilizada por el ambiente químico del sitio activo. Para poder realizar la hidrólisis de las uniones peptídicas, una proteasa debe unir la proteína al sustrato peptídico en su sitio activo. La eficiencia de unión es una función tanto de los ambientes químicos respectivos que los sub-sitios crean, como de la naturaleza química del péptido que interactúa directamente con el surco del sitio activo. [80]. Los factores que afectan las interacciones incluyen: tamaño, polaridad, carga, hidrofobicidad y accesibilidad. Aunque una sola unión peptídica sea rota durante la catálisis, varios aminoácidos de ambos lados del sitio de rompimiento son importantes en la especificidad de la enzima. Las secuencias que flanquean el sitio activo de cisteína e histidina son altamente conservadas y éstas han sido utilizadas para clasificar a las proteasas y clonar genes ortólogos mediante genética inversa. Las cisteína proteasas se encuentran en bacterias, microorganismos eucarióticos, plantas y animales y están representadas por tres superfamilias evolutivamente relacionadas, que son: a) la familia de la papaína de *Carica papaya*, b) la familia de la proteinasa de *Streptococcus pneumoniae* y c) la proteinasa de *Clostridium histolytica*. La superfamilia más amplia es la papaína e incluye a las cisteína proteasas de plantas superiores y las catepsinas B, L, H y S de los lisosomas de las células de mamífero [83]. Estas enzimas se inhiben por agentes bloqueadores del grupo tiol, como el p-hidroximercuribenzoato (pHMB) y por agentes alquilantes como el iodoacetato, la iodoacetamida y la N-etilmaleimida (NEM) y se activan por reactivos que generan

grupos tiol a partir de puentes disulfuro, tales como el β -mercaptoetanol y el ditioneitol (DTT) [83, 84].

4.3 Proteasas en protozoarios

En los organismos patógenos se ha demostrado que la acción de proteasas juega un papel directo en la patogénesis de la enfermedad. Tal es el caso de la serina proteasa de secreción presente en *Schistosoma mansoni* [85]. La secreción de una elastasa en *Entomophthora coronata* la cual se determinó que se sintetizaba solo en contacto con un hospedero (humano) pero no en condiciones naturales [86]. Así mismo, dentro de las primeras identificaciones de la participación de las proteasas en las enfermedades en el humano fue el estudio de las proteasas de *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* [87, 88].

Se han logrado obtener algunos avances en el combate de las enfermedades infecciosas, pero las infecciones con parásitos protozoarios continúan impactando tanto económica como socialmente a la humanidad, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. La identificación y caracterización de los procesos mediados por proteasas en los protozoarios parásitos ha avanzado de forma notable. Se ha observado que en estos organismos las proteasas llevan a cabo funciones constitutivas que son comunes en los eucariotas, así como también se han vislumbrado funciones altamente específicas en los ciclos de vida de los parásitos. Las proteasas de una variedad de protozoarios han sido caracterizadas a nivel tanto celular como molecular y varios de los papeles que desempeñan estas proteasas han sido estudiados con mayor profundidad. Dentro de los diversos papeles en los que participan estas proteasas son: invasión a células del huésped e invasión a los tejidos, tienen una influencia en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento, catabolismo en la toma de nutrientes, diferenciación y división celular, citoadherencia, estimulación y evasión de la respuesta inmune, entre otros [89]. En el caso del género *Plasmodium falciparum* se conoce que los parásitos utilizan a las serina proteasas (PFSUB-1 y 2) para poder infectar las células del huésped, estas proteasas son expresadas en la fase de esquizonte y merozoíto, así como también emplean las serina proteasas denominadas P76/P68, las cuales son liberadas a través de la vía PKC, participando en los procesos de invasión [90, 91].

En el caso de la tripanosomiasis americana la generación de variaciones en el Ca^{2+} intracelular son reguladas por la secreción de la oligopeptidasa B (OPB) [92]. La OPB es un factor soluble cuya constitución pertenece al tipo de las serina proteasas. Adicionalmente, en este protozooario se reportó la proteasa de 80 kDa (TC 80 kDa) la cual tiene actividad proteolítica sobre colágena tipo I y IV y se ha vinculado con la capacidad de invasión aunque no ha sido del todo sustentado [89].

En el caso de protozoarios extracelulares como *Giardia spp* se ha determinado que la inhibición de las cisteína proteasas participan activamente en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento [93]. Adicionalmente, en *G. lamblia* fue aislada y purificada la cisteína proteasa 2 (CP2) y el análisis filogenético las colocó en el grupo de las catepsinas B [94]. Recientemente se ha observado que la liberación de proteasas participan en los fenómenos de apoptosis y en la desestabilización de las uniones estrechas, por medio de la degradación de las proteínas ZO-1, ocludina, y de miembros de la familia de las claudinas [95]. En enfermedades de transmisión sexual como *Trichomonas vaginalis* la secreción de proteasas ha sido vinculada con los fenómenos de citoadherencia. En *T. vaginalis* se han determinado alrededor de 440 genes que codifican para proteasas, algunas de las cuales están a nivel de membrana o bien son secretadas por el protozooario, algunas de ellas han sido aisladas, caracterizadas y secuenciadas dada su importancia en esta parasitosis [96]. En la amibiasis intestinal humana causada por *E. histolytica* y durante los procesos de colonización, invasión y migración a otros órganos (hígado, pulmón y cerebro) los trofozoítos despliegan diversos mecanismos de patogenicidad, dentro de ellos el más importante es la secreción de productos altamente proteolíticos que dañan los tejidos, así *E. histolytica* posee alrededor de 50 genes que codifican para cisteína proteasas [85]; algunas de estas proteasas se ha demostrado que presentan un elevado poder citolítico debido a la actividad de la EhCP5 y EhCP2 [97]. También se ha demostrado que algunas de estas proteasas son secretadas y otras se presentan a nivel de la membrana celular (EhCP112) [96, 98]. El estudio de estas proteasas en *E. histolytica* es un campo muy activo ya que se busca continuamente la síntesis de fármacos para su inhibición con la finalidad de tener un fármaco mejor dirigido contra el parásito [96].

En el caso del grupo de las amibas de vida libre como es el género *Acanthamoeba* se han realizado estudios in vitro e in vivo y se determinó que los trofozoítos poseen enzimas altamente hidrolíticas, como son: colagenasas, elastasa, fosfolipasas, serina proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas las cuales participan durante los procesos de invasión al hospedero [96]. Finalmente, en el género *Naegleria* el cual es de nuestro interés se ha reportado la presencia de adhesinas, proteínas formadoras de poros, fosfolipasas, efecto de lisis dependiente de contacto, elastasas y la secreción de proteasas durante su invasión al SNC. Aldape *et al* (1994), realizaron la purificación parcial de una proteasa de 30 kDa con dos isoformas, la actividad de éstas fue inhibida con el inhibidor de cisteína proteasas E-64 observándose la inhibición de la degradación de colágena y elastina [99]. En el año 2007 Serrano-Luna *et al*, describieron la actividad proteolítica de *N. fowleri* y de la especie no patógena *N. gruberi*. Se demostró que ambas especies presentan principalmente cisteína proteasas de secreción capaces de degradar Azocoll y que estas proteasas tienen una actividad óptima a pH de 7 y a 37°C [71]. Cervantes-Sandoval *et al* (2008) reportaron la presencia de una proteasa tipo cisteína de 37 kDa capaz de degradar mucina bovina [59]. Finalmente, Kim *et al* (2009), analizaron las proteínas de secreción y excreción de *N. fowleri* y su relación con la patogenicidad, se identificaron seis proteínas con pesos de 58, 40, 24, 21, 18 y 16 kDa las cuales fueron secuenciadas y comparadas en las bases de datos, arrojando proteínas tipo catepsinas B principalmente, aunque también se identificaron peroxirredoxinas y lipasas [100]. Sin embargo, a la fecha solo pocas proteasas se han caracterizado y estudiado a profundidad en este género.

5. MUCINAS Y MUCINASAS

5.1 Mucinas en vías aéreas superiores

La principal función de las mucinas, entre otras, es atrapar a microorganismos y partículas e impedir que alcancen las células del epitelio, para eventualmente ser expulsados. El gel mucoso y el epitelio ciliado junto con el estornudo, son esenciales para el mantenimiento de la esterilidad de los tejidos del aparato respiratorio superior. El principal componente de esta capa mucosa son las mucinas. Estas moléculas son glicoproteínas complejas que pueden alcanzar varias micras de longitud una vez que se

polimerizan [101], estas son codificadas por un grupo variable de genes conocido como genes *muc* [102]. Existen dos tipos diferentes de mucinas, aquellas que se encuentran asociadas a la membrana celular y son monoméricas y aquellas que son secretadas y cuando se polimerizan forman un gel denso. La estructura bioquímica de estas moléculas consta de una parte central protéica, constituida por un número variable de repetidos de aminoácidos arreglados en tandem, quienes poseen un alto contenido en serinas, treoninas y prolinas (hasta cientos). Estos dominios son conocidos como VNTR por sus siglas en inglés (variable number of tandem repeats) y es la característica que las diferencia de otras glicoproteínas. La variabilidad en estos repetidos es enorme, ya que muchas de estas proteínas tienen alelos polimórficos que varían en el número de repetidos. Variaciones adicionales ocurren por cambios menores en la longitud y la secuencia de la unidad repetida. Por lo tanto, diferentes individuos pueden expresar diferentes formas del mismo producto de un determinado gen *muc*. Los VNTRs son únicos en tamaño y secuencia y definen las características de cada mucina. Estos pueden variar de entre 5 a 37 aminoácidos y de 5 a 395 repetidos [102].

Entre los repetidos en tándem se encuentran regiones intercaladas ricas en cisteínas, por medio de las cuales forman enlaces disulfuro con otras unidades de mucina formando la estructura polimérica [102]. Hacia los extremos de la proteína se encuentran regiones repetidas con similitud al dominio D del factor Von Willebrand, las cuales no están glicosiladas y se piensa que igualmente son importantes para la formación de dímeros y oligómeros de mucina [103]. Los residuos de aminoácidos de serinas, treoninas y prolinas que contienen los VNTRs son los sitios de las O-glicosilaciones, que por lo general se unen a N-acetilgalactosamina o a diferentes oligosacáridos. La glicosilación en estas proteínas es tan elevada que los carbohidratos pueden constituir desde un 50% hasta un 80% del peso total de la mucina. La glicosilación se lleva a cabo en el aparato de Golgi y requiere de diferentes glicosiltransferasas dependiendo de la estructura final de la O-glicosilación. La glicosilación puede variar enormemente y se piensa que los residuos finales son los que confieren las diferentes propiedades físicas y biológicas de las mucinas dadas por su hidrofobicidad o carga. Hasta el momento se han descrito alrededor de 20 genes de mucinas humanas, los cuales se denominan con las letras MUC seguidas de un número. De estos 10 son mucinas ancladas a membrana (MUC1,

MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 y MUC20) y 8 son de secreción (MUC2, MUC5B, MUC5AC, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, y MUC19) y existen tres mucinas más las cuales carecen de los repetidos en tándem (MUC14, MUC15 y MUC18), por lo que puede o no considerárseles como mucinas [104]. El gen MUC5AC es el principal responsable de la secreción de mucinas en la mucosa respiratoria de humanos y ratones, y su expresión se puede disparar por una gran variedad de estímulos, i. e. lipopolisacárido [105], extracto de tabaco [106], forbol miristato (PMA) [107], entre otros.

5.2 Mucinasas en protozoarios

Como se mencionó anteriormente, el núcleo de las proteínas tipo mucina contiene repetidos en tándem ricos en treonina, prolina y/o residuos de serina. Estos sitios proveen numerosos sitios de anclaje de los oligosacáridos. Los patrones de glicosilación afectan las propiedades de las mucinas, como son la rigidez, resistencia a proteasas y la capacidad de formar matrices gelatinosas [108]. Los oligosacáridos protegen el núcleo proteico de las proteasas preservando la integridad de los polímeros de la mucina. La adición de sulfatos o la sustitución de ácidos siálicos al final de los oligosacáridos, confiere una resistencia adicional a la degradación por sialidasas [109]. El N- y C-terminal, son regiones pobremente glicosiladas conformadas principalmente de residuos de cisteína. Las mucinas secretadas frecuentemente contienen tres dominios D1, D2 y D3 en la región amino y el dominio D4 en el C-terminal. Los dominios D son ricos en cisteína y forman enlaces disulfuro, estas regiones son muy vulnerables al ataque proteolítico [110]. La producción de glicosidasas por parte de *E. histolytica* pueden ser capaces de degradar oligosacáridos de las mucinas [111]. Sin embargo, la secreción de cisteína proteasas son efectivas en la degradación de las regiones pobremente glicosiladas de la mucina, causando así la pérdida de la estructura polimérica [97].

La adhesión de *T. vaginalis* al epitelio vaginal es esencial para el establecimiento del parásito en el hospedero; durante esta adhesión *T. vaginalis* logra la degradación de la mucina por medio de proteasas, la capacidad de degradación está dada principalmente por cisteína y serina proteasas ya que al utilizar inhibidores específicos contra estas proteasas se logra la inhibición proteolítica de las mucinas [112].

6. ANTECEDENTES DIRECTOS

Naegleria fowleri tiene acceso al SNC migrando por el neuroepitelio olfatorio hasta alcanzar los bulbos olfatorios. En nuestro laboratorio se determinó la evolución de la MAP en el ratón. Cuando se instilaron los ratones de la cepa Balb/c con trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* se observó que en los tiempos tempranos que las amibas se encontraban en la luz de la cavidad nasal y que éstas eran embebidas en el moco; en tiempos más tardíos se observó una respuesta inflamatoria de tipo aguda, para posteriormente adherirse al neuroepitelio olfatorio y migrar hasta los bulbos olfatorios en el SNC y producir la muerte de los ratones. En los animales instilados con *N. gruberi* no se observó ningún tipo de daño y fueron eliminados en la cavidad nasal.

El moco representa un componente multifactorial de defensa de las respuestas innatas, los principales componentes de defensa innata presentes en el moco son las mucinas, lactoferrina, defensinas y lisozimas. En el 2008 Cervantes-Sandoval *et al*, demostraron que *N. fowleri* es capaz de degradar la mucina submaxilar bovina. Experimentalmente se ha demostrado que el moco es capaz de atrapar los trofozoítos de *N. fowleri*. Sin embargo, los trofozoítos son capaces de evadir esta respuesta del hospedero [58]. En otros parásitos como *T. vaginalis* se ha demostrado, la capacidad de degradación de mucinas, la cual se lleva a cabo por medio de cisteína proteasas de secreción, glicosidasas y sulfatasas con actividad de mucinasas y sialidasas [112, 113]. En nuestro laboratorio se caracterizaron las proteasas a partir de extractos totales y de los productos de secreción de *N. fowleri* y se determinó que estas proteasas son principalmente del tipo de las cisteína proteasas [71]. Cervantes Sandoval *et al* (2009), evaluaron la actividad mucinolítica de los trofozoítos de *N. fowleri*. Se demostró que tanto los extractos totales como los trofozoítos vivos fueron capaces de degradar a la mucina submaxilar bovina (BSM), la mucina estomacal porcina (PSM) y la mucina MUC5AC humana [59]. La

actividad mucinolítica observada en los extractos totales fue abolida en presencia del inhibidor de cisteína proteasas, pHMB. Estos resultados coinciden con reportes previos, en los cuales se muestra que las cisteína proteasas pueden actuar como mucinasas tal es el caso de *T. vaginalis* [112] y en *E. histolytica* [97, 114, 115]. Por otro lado, es importante mencionar que no se detectó ninguna actividad mucinolítica en el medio condicionado de *N. fowleri* a pesar de que se ha encontrado una fuerte actividad de cisteína proteasas en medio condicionado por estas amibas [71, 99]. Sin embargo, es posible que se induzca la secreción de este tipo de moléculas en presencia de los tejidos del hospedero u otras condiciones bioquímicas que sean necesarias para su detección [116, 117].

7. JUSTIFICACIÓN

Durante una infección por microorganismos se estimula la producción y secreción de mucinas. Esta respuesta inmune innata funciona como un mecanismo de protección y eliminación de algunos patógenos. Sin embargo, en el caso de *N. fowleri* se ha detectado una actividad mucinolítica que probablemente participe en la evasión de la respuesta inmune innata del hospedero.

A la fecha, la caracterización de una mucinasa de secreción no ha sido descrita. Por ello, la identificación y purificación parcial de este tipo de proteasas nos permitirá analizar y comprender su papel durante la evolución de la MAP.

8. HIPÓTESIS

Naegleria fowleri es capaz de degradar moco por medio de la producción y secreción de una mucinasa durante las etapas tempranas de la infección.

9. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar e identificar una proteasa de secreción con actividad mucinolítica presente en trofozoítos de *Naegleria fowleri*.

10. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar la actividad mucinolítica en los productos de secreción.
- ✓ Caracterización bioquímica parcial de la mucinasa.
- ✓ Purificación parcial e identificación de la mucinasa
- ✓ Localizar la mucinasa en los trofozoítos de *N. fowleri*
- ✓ Evaluar la participación de la mucinasa en la virulencia de *N. fowleri in vitro* e *in vivo*

11. MATERIAL Y MÉTODOS

11.1 Cultivo de amibas

En todos los ensayos se utilizaron trofozoítos de *N. fowleri* (ATCC 30808). Las amibas se cultivaron en condiciones axénicas en medio líquido de bactocasitona al 2% suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, a una temperatura de 37°C. Los trofozoítos se utilizaron en fase logarítmica de crecimiento.

11.2 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular NCI-H292 (ATCC CRL-1848) obtenida de un carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano la cual se cultivó en medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de SFB, a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Para la obtención de mucinas secretadas se sembraron 25x10⁴ células/pozo en cajas de 48 pozos donde se dejó alcanzar a un 95% de confluencia, posteriormente se dejó en ayuno de 24 h a las células con medio RPMI s/SFB. Terminado el tiempo de ayuno se adicionaron 20 nM de forbol 12-miristato 14-acetato en RPMI s/SFB y se cultivaron durante 12 h a 37°C en 5% de CO₂. Posteriormente, se recuperaron los sobrenadantes (500 µl por pozo) y se centrifugaron a 1500 rpm/10 min. El sobrenadante fue recuperado y filtrado en membranas de 0.22 µm. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso en los ensayos de degradación.

11.3 Preparación de los productos de secreción y extracto total amibiano

Los trofozoítos fueron cosechados en la fase logarítmica de crecimiento (5 x 10⁶); brevemente, los trofozoítos se despegaron en un baño de hielo durante 20 min. Los productos de secreción (PS) se obtuvieron a partir de la incubación de los trofozoítos en medio de

bactocasitona sin SFB durante 12 h. Concluido el tiempo, se recuperaron los PS y se realizó una centrifugación a 400 x g / 5 min, el sobrenadante se recuperó evitando tocar el paquete celular, nuevamente las muestras se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 min, finalmente los PS se filtraron en una membrana de con poros 0.22 μm de diámetro (Millipore). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Por otro lado, el extracto total amibiano (ETA) fue obtenido a partir de 5×10^6 trofozoítos. Brevemente, las amibas fueron despegadas de la caja de cultivo por medio de un baño de hielo durante 20 min, posteriormente las amibas fueron centrifugadas y re-suspendidas en 500 μl de PBS. Los trofozoítos fueron lisados por choques térmicos, realizando pases por nitrógeno líquido y agua hirviendo (5 veces).

11.4 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio y etanol

Los PS de *N. fowleri* fue precipitados con concentraciones crecientes de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 30, 50, 60 y 80%; Sigma Aldrich). La precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se realizó como sigue: se adicionó una saturación inicial de 30% de sulfato de amonio a los PS, posteriormente se centrifugó a 10,000 x g durante 1 h a 4°C ; posteriormente la fracción soluble se recuperó y se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta llegar a una concentración del 50%, la cual fue centrifugada y se continuó la precipitación de las fracciones solubles con un 60 y 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La pastilla de cada precipitación fue re-suspendida en 1 ml de amortiguador de Tris 20 mM a pH 8.5. Adicionalmente las muestras fueron centrifugadas en columnas amicon de 10 kDa de corte (Millipore) para dializar el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Por otro lado, muestras independientes de PS se precipitaron con etanol absoluto (J.T. Baker, USA) a una relación 3:1 (v/v) durante 1 h a -20°C , terminado el tiempo de precipitación, los PS fueron centrifugados a 6500 x g durante 45 minutos y las pastillas fueron re-suspendidas con 1 ml de amortiguador de Tris 20 mM a pH 8.5; las muestras se almacenaron a 4°C toda la noche en microtubos destapados para eliminar los restos de etanol (productos de secreción precipitados con etanol (PS-etanol). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

11.5 Determinación de actividades proteolíticas por zimografía

Para determinar la actividad proteolítica en los PS y ETA se realizaron zimogramas en geles de gelatina y de mucina submaxilar bovina (MSB; Worthington Biochemical Corporation, USA) a una concentración final de 0.1%. Para la determinación de los perfiles proteolíticos generales en gelatina y MSB se utilizaron 30 µl de PS y 30 µg de ETA. En los zimogramas de mucina con muestras no precipitadas con etanol se utilizaron 30 µl de muestras, mientras que los PS-etanol fueron empleados con 30 µg de las muestras, la concentración de proteína fue cuantificada con el método de Bradford. La electroforesis de los geles se desarrolló a 80 V durante 3 h, en un baño de hielo con la finalidad de evitar la degradación enzimática. Finalizada la electroforesis los geles fueron recuperados y sumergidos durante 30 minutos en Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 2.5% con dos cambios de 15 minutos cada uno. Terminado el tratamiento con Tritón, los geles se incubaron a 37°C toda la noche en amortiguadores de activación con diferentes valores de pH: pH 5 (CH₃COONa 100 mM, CaCl₂ 2 mM), pH 7 (Tris 100 mM, CaCl₂ 2 mM) y pH 9 (Glicina 100 mM, CaCl₂ 2 mM) cada uno en presencia de 2 mM de DTT adicionado en el momento de la incubación. Terminada la incubación los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Brillant blue R-250; J. T Baker, USA) y desteñidos hasta observar la aparición de bandas claras de actividad proteolítica.

11.6 Especificidad de degradación de sustrato

Para determinar la actividad específica de degradación de MSB, se realizaron geles copolimerizados con otros sustratos tales como son holo-lactoferrina humana y bovina (h-hLf, h-bLf), hemoglobina humana, holo-transferrina humana, ferritina equina (eqF) (todos los sustrato fueron obtenidos de SIGMA, USA), donde la concentración final de todos los sustratos fue de 1 mg/ml y se probaron tanto los PS-etanol como los ETA de *N. fowleri*. La electroforesis de estos zimogramas se desarrolló como fue descrito previamente.

11.7 Estimulación de la producción de mucinasas

Con el objetivo de determinar la estimulación de mucinasas por trofozoítos de *N. fowleri*, las amibas fueron co-incubados con MSB durante diferentes tiempos y posteriormente los PS fueron colectados y precipitados con etanol para posteriormente ser analizados en

zimogramas co-polimerizados con mucina. Seis millones de trofozoítos fueron incubados en medio de bactocasitona sin SFB conteniendo 0.1 mg/ml de MSB durante 1, 3, 6 y 12 h. Terminado cada uno de los tiempos de incubación se recuperaron los PS los cuales fueron precipitados con etanol (3:1), posteriormente se analizó la actividad mucinolítica en geles co-polimerizados con MSB. La actividad enzimática fue comparada con muestras de PS obtenidos de trofozoítos incubados con bactocasitona sin SFB de los mismos tiempos de co-incubación.

11.8 Determinación bioquímica parcial de la actividad mucinolítica

Con la finalidad de realizar una caracterización bioquímica parcial de las mucinasas presentes en PS-etanol, las muestras fueron tratadas con inhibidores de cisteína proteasas (10 mM p-hidroximercuribenzoato (pHMB), 10 μ M [1-[N-[(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutano] (E-64), 5 mM n-etilmaleimida (NEM) y 5 μ M idoacetamida (IAA), para serina proteasas: 5 mM fenil-metil sulfonil fluoruro (PMSF) y 1 mM de aprotinina y para metaloproteasas 10 mM de 1,10-fenantrolina. Las muestras se incubaron con los inhibidores de proteasas durante 1 h a 37°C y posteriormente se realizaron zimogramas para determinar la inhibición de la actividad proteolítica. El análisis densitométrico de la degradación se realizó utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>), los resultados se expresaron como densidad óptica relativa (DOR).

11.9 Cromatografía de intercambio iónico

Los PS-etanol fueron cargados en columnas de cromatografía de intercambio iónico Hi-Q (High-Q cartridge) (Bio-Rad, USA) previamente equilibradas con 20 mM de Tris-HCl buffer (pH 8.5). Para favorecer las interacciones iónicas de las proteínas, las columnas se dejaron a 4°C toda la noche. Posteriormente se obtuvieron los eluidos por medio de la adición de concentraciones crecientes de NaCl (100, 200, 300, 400 y 500 mM; Sigma Aldrich, USA) en Tris-HCl buffer (pH 8.5) a una velocidad de 0.5 ml/min. Los eluidos fueron pasados por columnas amicon (Millipore; 100 kDa) para eliminar el NaCl de las muestras y también para concentrar la proteína. La concentración de proteínas fue determinada por el método de

Bradford (1976) y para determinar la fracción con actividad mucinolítica se realizaron zimogramas de cada una de las fracciones. La fracción enriquecida de mucinasa (FEM) fue seleccionada y almacenada a -70°C hasta su uso.

11.10 Electroforesis bidimensionales

Se realizó electroforesis bidimensional de las fracciones con actividad mucinolítica para obtener el perfil de proteínas y el patrón de degradación (degradoma). Para la separación en base al punto isoeléctrico se utilizaron tiras para isoelectroenfoco de gradiente de pH 4-7 con un tamaño de 7 cm (Bio-Rad, USA). Las tiras fueron hidratadas con 80 μg de muestras de PS-etanol o FEM en amortiguador de hidratación (HEPES, anfolitos, UREA) hasta un volumen final de 125 μl . Las muestras se homogenizaron y colocaron en la placa de hidratación cuidando de no formar burbujas; posteriormente se adicionó aceite mineral (2 ml) para evitar la evaporación y se incubó en modo activo a 22°C durante 16 h. Terminado el tiempo de hidratación se eliminó el aceite mineral y se colocaron los papeles filtro (electroweeks; Bio-Rad, USA) para continuar con el isoelectro-enfoque de las proteínas en el equipo Protean IEF Cell (Bio-Rad, USA). Las condiciones de separación se realizaron en tres pasos 250 V durante 20 min, 4000 V por 3 h y 4000 V en incremento gradual hasta alcanzar los 10 000 V/h durante 3 h. Posteriormente las tiras fueron incubadas con el amortiguador de equilibrio con 2 mM de DTT disuelto en 5 ml de solución de equilibrio (Urea 6 M, Tris 75 mM pH 8.8, glicerol 29.3%, SDS 2%; Bio-Rad, USA) por 15 min. Las tiras se colocaron en amortiguador de corrida hasta ser colocadas en geles de poliacrilamida o en geles copolimerizados. Para sellar las tiras se utilizó agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% disuelta en amortiguador TSG al 1X (Trizma base 24.9 mM, glicina 191.8 mM y SDS 1.73 mM) junto con azul de bromofenol. Terminada la electroforesis, se analizó el perfil de proteínas y el patrón proteolítico tiñendo con plata o con azul de Coomassie respectivamente. Los puntos de actividad fueron enviados para su análisis por el método “MALDI-TOF-MS-peptide-mapping”.

11.11 Espectrometría de masas MALDI-TOF-MS

Para identificar a la actividad mucinolítica inducible en los PS-etanol y en los FEM se utilizó espectrometría de masas. Tanto la actividad de 94 kDa de geles co-polimerizados con MSB de 1D, como la banda del mismo peso molecular en geles de acrilamida 1D fueron analizadas. Así mismo, la única actividad mucínolítica de los geles 2D fue cortada y analizada. Las muestras se colocaron en un microtubos independientes y se le adicionaron 500 μ L de bicarbonato de amonio 50 mM y acetonitrilo al 50%. Se dejó reposar 5 min a 50°C para desteñir la muestra, este procedimiento se repitió 3 veces más cambiando la solución; una vez desteñidas las muestras se realizó una incubación durante 5 min con 100 μ L de acetonitrilo al 100 % a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó la solución y se dejó secar para proceder con la digestión con tripsina (15 μ l; 25 ng/ μ L) con bicarbonato de amonio (20 μ l; 50 mM) durante 15 h a 37°C. La extracción de proteínas se obtuvo con ácido trifluoroacético al 0.1% con acetonitrilo al 50% (30 μ l) durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se realizó una centrifugación y el procedimiento se repitió 2 veces más. Finalmente, las muestras se analizaron con MALDI-TOF/MS en el laboratorio de servicios experimentales (LaNSE-CINVESTAV, México); así como también el análisis de las muestras se realizó por espectrometría de masas de ionización por electrospray MALDI-MS en la unidad LANGEBIO (CINVESTAV-IPN, Irapuato). Los resultados fueron analizados por el programa MASCOT (<http://matrixscience.com>) utilizando como referencia el genoma de *N. gruberi* disponible en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los números de acceso de cada proteína identificada fueron rastreados en la base de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y se obtuvieron los pesos moleculares y las secuencias de aminoácidos.

11.12 Ensayo de glicosidasas en *N. fowleri*

Con la finalidad de determinar la presencia de glicosidasas en la fracción de 94 kDa y en el PS-etanol y la FEM, se utilizaron el β -galactopiranosido, α - acetil galactosamina, β -glucopiranosido, y el β -manopiranosido (Sigma, USA) todos ellos asociados al grupo *p*-nitrofenil, cuya hidrólisis liberará al grupo nitrofenilo dando un color amarillo, las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro a una longitud de 405 nm, los sustratos mencionados fueron utilizados a una concentración de 0.1 mM. Brevemente, 10 μ g de PS-

etanol o FEM fueron incubadas con cada uno de los sustratos durante 45 min a 37°C a un pH de 7 en placas de 96 pozos. Adicionalmente, las muestras fueron tratadas con el inhibidor pHMB previo a la incubación con cada uno de los carbohidratos. Terminado el tiempo de incubación la mezcla, la reacción fue detenida con 50 µl de NaOH e inmediatamente se obtuvo la absorbancia por medio de un espectrofotómetro a una longitud de 405 nm (Epoch, BioTek, USA). Como blanco experimental, se utilizaron los carbohidratos sin la adición de PS-etanol o FEM. El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) se realizó utilizando el software Systat Sigma Plot 12 (<http://www.sigmaplot.com>).

11.13 Diseño de péptidos e inmunización de conejos

A partir de las secuencias obtenidas por espectrometría de masas, se seleccionaron las secuencias (GH y DAP) con los valores más elevados de identidad obtenidos por espectrometría de masas. Las secuencias elegidas se sometieron a un riguroso análisis bioinformático:

(<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>; <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>; <http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>) para determinar las regiones altamente inmunogénicas, posteriormente se realizó el modelamiento tridimensional de las proteínas y se localizaron tanto el sitio activo como el sitio catalítico (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Se seleccionaron las secuencias inmunogénicas cercanas al sitio activo, con la finalidad de generar anticuerpos capaces de bloquear la función enzimática de las proteínas. Las secuencias seleccionadas fueron enviadas a sintetizar acopladas con el antígeno KLH (Keyhole limpet hemocyanin) para incrementar la respuesta inmune. Los péptidos fueron enviados a PepMic Co. Suzhou, China.

Los anticuerpos generados contra cada una de las proteínas fueron obtenidos de conejos Nueva Zelanda, a los cuales se les administró 1 mg de péptido homogeneizado en el adyuvante TiterMax classic (Sigma, USA) en una relación 1:1. El volumen total de la mezcla se inoculó vía subcutánea en la primera administración y vía intramuscular en las dos siguientes inmunizaciones. La segunda y tercer inmunización se realizó con un intervalo de 7 días entre cada reto, en ambos casos se utilizó la misma concentración de proteína, sin embargo, en el último reto no se adicionó el adyuvante TiterMax classic. Previo a la primera

inmunización se obtuvieron los sueros pre-inmunes (SPI) de cada conejo, el cual se utilizó como control negativo en las pruebas de inmunodetección. Los conejos se sacrificaron 7 días después del último reto por punción cardiaca, el suero fue recuperado y colocado a 4°C, posteriormente se centrifugó a 2,000 x g durante 30 min, el suero se almacenó a -20°C hasta su uso. Posteriormente se precipitó con sulfato de amonio saturado para la obtención de la fracción gamma globulina, posteriormente se utilizaron bolsas de diálisis (MW 12,000 a 14,000; Spectra/Por, Scientific Inc. USA) para la eliminación del sulfato de amonio con diálisis 2 veces al día durante 3 días con solución de boratos. El análisis de la especificidad y la titulación de los anticuerpos se realizaron mediante ensayos de ELISA utilizándose los PS-etanol como antígeno.

11.14 Detección y localización de la glicosidasa y aminopeptidasa en *N. fowleri*

Para la detección de la glicosil hidrolasa (GH) y la dipeptidil aminopeptidasa (DAP) en la FEM de *N. fowleri*, se realizaron ensayos de Western-blot (Wb) utilizando los anticuerpos obtenidos de la inmunización de los conejos. La FEM de *N. fowleri* fue tratada con inhibidores de proteasas EDTA 2; fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 5 mM; tosyl-L-lysil clorometilcetona (TLCK) 3 mM; tosyl-L-feniletíl-clorometilcetona (TPCK) 3 mM; N-etilmaleimida (NEM) al 5 mM; p-hidroximercuribenzoato (PHMB) 10 mM; L-trans-epoxysuccinyl-L-leucilamido [4-guanidino]-butano (E64) 3 mM y Iodoacetato (IAA) 5µM. Las muestras se homogenizaron durante 30 min en un cuarto frío a 4°C y se centrifugaron a 15,000 x g durante 10 min. Las proteínas solubles fueron recuperadas y se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, algunas muestras fueron procesadas en condiciones no reductoras con el amortiguador de corrida (Lamelli 2X SDS, azul bromofenol, glicerol) (NR), así como también en condiciones reductoras (R) con el amortiguador de corrida adicionando β-Mercaptoetanol al 5% (SIGMA, USA). La electroforesis se desarrolló en SDS-PAGE al 10% donde se colocaron 30 µg de proteína de cada muestra en las condiciones previamente descritas. Concluida la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para observar el patrón de proteínas. Mientras que otros geles con las mismas muestras se electrotransfirieron en membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) (MILLIPORE), la electrotransferencia se llevó a cabo a 400 mA de corriente durante 45 min a 4°C. Terminado el tiempo, las membranas fueron recuperadas y

bloqueadas con leche descremada al 5% y toda la noche a 4°C. Para la inmunodetección por Wb se utilizaron los anticuerpos anti-GH y anti-DAP generados. Como control de carga se empleó un anticuerpo contra la enzima GAPDH, todas las diluciones utilizadas para los anticuerpos fueron 1:1000. La dilución de los anticuerpos se realizó en PBS estéril a pH 7.2 con leche descremada al 5%. Los anticuerpos se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, después las membranas se lavaron dos veces con PBS-Tween al 0.05% (PBS-T); posteriormente las membranas de PVDF fueron incubadas con los anticuerpos secundarios peroxidados (HRP) chivo anti-conejo-HRP (1:2000) para cada una de las proteínas durante 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 5 lavados con PBS-T al 0.05%. Por último, se reveló la reacción empleando el kit de luminol (Santa Cruz, USA) con el uso de películas radiográficas (Kodak).

Para los estudios por inmunofluorescencia los trofozoítos de *N. fowleri* fueron adheridos a cubreobjetos silanizados (silane 3% en acetona, Sigma Aldrich, USA) las amibas se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 30 min; posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS estéril. El marcaje con anticuerpos se realizó con amibas no permeabilizadas y permeabilizadas con tritón al 0.2% en PBS durante 15 min. Los trofozoítos se bloquearon con albumina 1% en PBS durante 30 min, transcurrido el tiempo se eliminó el excedente de albúmina con PBS (2 lavados), posteriormente las células se incubaron con los anticuerpos utilizados para los ensayos de Wb previamente descritos, a una dilución 1:100. Concluidas 2 h de incubación a temperatura ambiente las amibas fueron lavadas 2 veces con PBS, para posteriormente adicionar el anticuerpo secundario acoplado a FITC (1:200), el cual se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS estéril. Para el marcaje de los núcleos se utilizó yoduro de propidio al 0.001% durante 7 min. Finalmente, las muestras se montaron en un portaobjetos con la resina Vecta Shield (Vector Labs, USA) y fueron selladas con barniz transparente. Las muestras se almacenaron en la oscuridad a 4°C hasta su análisis por microscopia confocal (Carl Zeiss LMS 700).

11.15 Inhibición del efecto citopático utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP

Previo a la determinación de la participación de la GH y de la DAP en el daño a las células NCI-H292, se determinó la concentración efectiva inhibitoria de cada uno de los anticuerpos,

para ello se analizó la capacidad para aglutinar a los trofozoítos de *N. fowleri*. Los trofozoítos (25×10^4) fueron incubados con 0.5, 1, 1.5, 3, 6 y 10 μg de cada anticuerpo generado (GH y DAP) durante 1 h. Una vez determinada la concentración, se evaluó la participación de la GH y de la DAP en el daño a las células NCI-H292. Para ello, los trofozoítos de *N. fowleri* fueron co-incubados con la línea celular NCI-H292 en RPMI sin SFB en presencia de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-GH o anti-DAP durante 1, 3 y 6 h. Concluido cada uno de los tiempos de interacción, las amibas fueron removidas por medio de un baño de hielo durante 20 min y el efecto citopático fue analizado por microscopia de campo claro. Para los ensayos de viabilidad de las células NCI-H292 después de cada tiempo de interacción con *N. fowleri*, se utilizó Sytox Green (5 μM) (Thermo Fisher, USA). Los trofozoítos fueron removidos y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 20 min, el Sytox Green fue adicionado e incubado durante 10 min, las células fluorescentes que corresponden a las muertas fueron observadas utilizando un microscopio invertido (Nikon, eclipse Ti-U). Como control positivo se utilizaron células permeabilizadas con Tritón X-100 al 2% y como control negativo un cultivo de células sin ningún tratamiento; así mismo se utilizó el SPI como control experimental. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>); donde el número total de pixeles fue expresado como intensidad media de fluorescencia (IMF). El análisis estadístico se realizó comparando los datos con las IMF de las células sin amibas utilizando ANOVA de dos vías con el software Systat Sigma Plot 12.

11.16 Inhibición de la degradación de MUC5AC utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP

Para demostrar que la GH y DAP participaban en la degradación de la mucina humana MUC5AC, las mucinas secretadas por las células NCI-H292 fueron recuperadas e incubadas con la FEM de *N. fowleri*. Brevemente, las mucinas secretadas (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) fueron incubadas con la FEM que contenía la actividad mucinolítica de 94 kDa (80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en amortiguador de pH 7 (Tris-HCl) a 37°C durante 6 h. Como control positivo de la degradación de MUC5AC, las mucinas secretadas fueron incubadas con proteinasa K (PK) (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 20 min. Adicionalmente el pHMB fue co-incubado con la FEM y las mucinas secretadas para

investigar la inhibición de la degradación de MUC5AC. Para analizar el papel específico de la GH y la DP, los anticuerpos específicos contra estas moléculas fueron incubados ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) con las mucinas secretadas y con la FEM por 1 h. Terminado el tiempo de co-incubación, las muestras fueron cargadas en una membrana de nitrocelulosa ($0.45 \mu\text{m}$). Así mismo, los PS-etanol fueron cargados como control negativo del anticuerpo anti-MUC5AC. La membrana con todas las muestras antes mencionadas fue teñida con rojo de Ponceau para observar la carga de la proteína. Por otro lado, los Dot-blots fueron realizados utilizando el anticuerpo monoclonal específico contra MUC5AC (Mucin 5AC 1-13M1, Abcam, USA) el cual se incubó por 1 h en una dilución 1:500 en PBS. Terminado el tiempo de incubación, la membrana fue lavada 4 veces con PBS-T durante 10 min cada lavado y se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón IgG acoplado a HRP (1: 10,000, Invitrogen, USA) durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 10 lavados con PBS-T y se reveló la reacción empleando el kit de luminol (Santa Cruz, USA) con uso del equipo Odyssey FC (LI-COR). El análisis densitométrico se realizó utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>), los resultados se expresaron como densidad óptica relativa (DOR).

11.17 Curvas de supervivencia en presencia de anticuerpos anti-GH y anti-DAP

Para determinar la participación de la GH y de la DAP de *N. fowleri* en la MAP experimental, 12×10^4 trofozoítos de *N. fowleri* fueron incubados con anticuerpos anti-GH y/o anti-DAP ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$), durante 20 min previo a la instilación de los ratones de la cepa BALB/c (machos de 4 semanas de edad). Adicionalmente, un grupo de ratones fue instilado solo con $20 \mu\text{l}$ de medio bacterias sin SFB, control negativo, mientras que otro grupo de ratones fue instilado con 12×10^4 trofozoítos de *N. fowleri* los cuales no fueron incubados con los anticuerpos a probar, este grupo de animales sirvió como control positivo de la infección. La mortalidad de los animales se determinó por medio de curvas de log-rank test, para obtener la significancia estadística de cada grupo de animales ($n=6$) [118].

12. RESULTADOS

12.1 Determinación de proteasas y mucinasas en PS y ETA de *N. fowleri*

La obtención de los PS y ETA nos permitió realizar una comparación de los perfiles proteicos y de proteasas de *N. fowleri*. Para ello, se realizaron ensayos de SDS-PAGE y de zimogramas co-polimerizados con gelatina o MSB. Los resultados de geles de poliacrilamida al 10% mostraron perfiles diferenciales de proteínas de PS y ETA (Fig 1, carriles 1 y 2) obtenidos a partir de trofozoítos de *N. fowleri* que presentaron una viabilidad del 98%. Así mismo, los ensayos de Wb de la proteína GAPDH no mostraron la detección de ninguna banda (Fig 1, carril 3), mientras que en los ETA se observó una banda de 37 kDa que corresponde al peso molecular esperado de la GAPDH (Fig 1, carril 4).

Después de corroborar que los PS y el ETA fueron obtenidos correctamente, se determinaron los perfiles proteolíticos en zimogramas de gelatina a diferentes pHs. Los PS mostraron actividades proteolíticas de 94, 75, 60, 53 y 40 kDa (Fig 2a, carril 1) a pH 5. Así mismo, se observaron actividades de 150, 94, 80 y 53 kDa a pH 7 (Fig 2a, 2), mientras que a pH 9 se detectaron actividades de 150, 110, 94 y 53 kDa (Fig 2a, 3). Mientras que el ETA presentó actividades de 240, 120, 100, 80, 75, 60 kDa a pH 5 (Fig 2b carril 1), mientras que actividades de 150, 120, 100 y 90 kDa fueron observadas a pH 7 (Fig 2b carril 2); finalmente, solo dos actividades de 100 y 90 kDa fueron observadas cuando la activación se realizó a pH 9 (Fig 2b carril 3).

Con la finalidad de determinar la actividad mucinolítica, las muestras de PS y ETA fueron cargadas en zimogramas co-polimerizados con MSB. Los resultados mostraron que en los PS no se presentó ninguna actividad mucinolítica a ningún pH analizado (Fig 3a), mientras que los zimogramas de ETA mostraron bandas de actividad mucinolíticas de 94, y 36.6 kDa a pH 5 (Fig 3a, carril 1), así mismo se observaron bandas de actividad de 150, 94, 75 y 36.6 kDa a pH 7 (Fig 3a, carril 2) y la presencia de una actividad de 94 kDa a pH 9 (Fig 3a, carril 3).

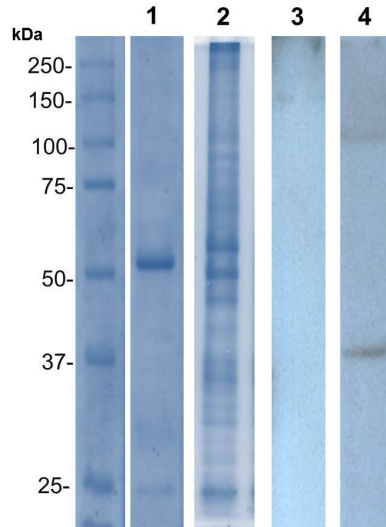


Figura 1.- Perfil de proteínas y Wb de los productos de secreción (PS) y extracto total amibiano (ETA) de *N. fowleri*. Los perfiles de proteínas de los PS (carril 1) y del ETA (carril 2) muestran un patrón proteico diferencial. Así mismo, el Wb para la detección de GAPDH no mostró reconocimiento en PS (carril 3), pero si se encontró reconocimiento de una banda de 37 kDa en el ETA que corresponde al peso molecular esperado para GAPDH (carril 4).

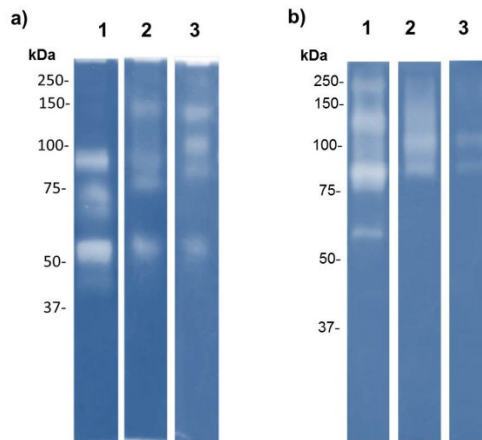


Figura 2. Perfil proteolítico de los PS y del ETA de *N. fowleri* a diferentes valores de pH utilizando gelatina como sustrato. (a) Actividades proteolíticas de los PS en geles co-polimerizados con gelatina activados a pH 5, 7 y 9; carril 1-3 respectivamente. (b) Actividades proteolíticas del ETA en geles co-polimerizados con gelatina activados a pH 5, 7 y 9; carril 1-3 respectivamente.

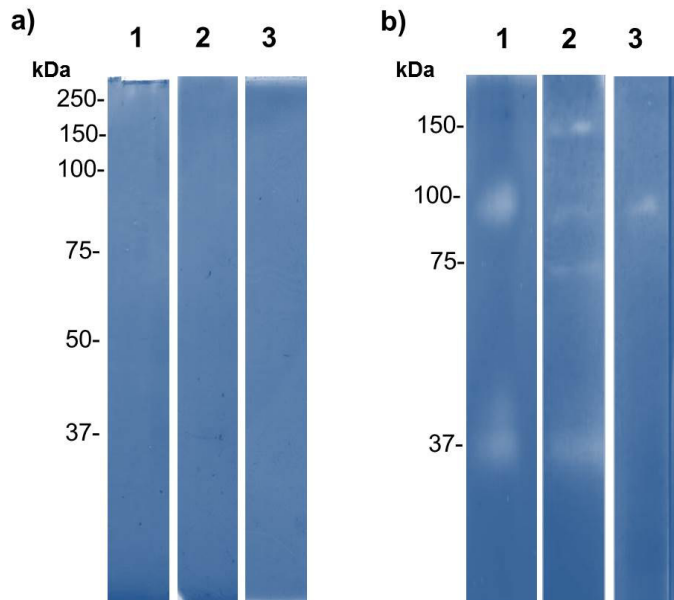


Figura 3. Perfil proteolítico de los PS y del ETA de *N. fowleri* a diferentes valores de pH utilizando mucina como sustrato. (a) Los PS de *N. fowleri* no mostró actividad mucinolítica en geles activados a pH 5, 7 y 9; carril 1-3 respectivamente. (b) Actividades mucinolíticas presentes en el ETA en geles activados a pH 5, 7 y 9; carril 1-3.

12.2 Detección de actividades mucinolíticas en los PS de *N. fowleri*

Una vez determinado que los PS de *N. fowleri* presentaban diferente patrón de proteínas y un perfil diferencial de actividades proteolíticas comparadas con el ETA en geles copolimerizados con gelatina y con el propósito de demostrar la presencia de actividad mucinolítica en los PS de *N. fowleri*, se procedió a concentrar las proteínas de los PS con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y también con etanol (3:1).

Los resultados de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ permitió la obtención de diferentes fracciones a partir de los PS en función del aumento gradual de la fuerza iónica. Los perfiles de proteasas en zimogramas de gelatina mostraron actividades de >250, 230, 100, 80, 60 y 53 kDa, según la fracción obtenida con las diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fig. 4a). En cuanto a la determinación de mucinasa se observó que los zimogramas de mucina mostraron una actividad >250 kDa en las fracciones de 60 y 80 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en todos los pH evaluados (Fig. 4b, c y d). Así mismo, se observó una banda de 94 kDa la cual fue encontrada en las fracciones de 30, 50 y 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

a pH 5 y 7 (Fig. 4b y c). Es importante mencionar que el tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ interfirió en la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Por otro lado, la precipitación con etanol, revelaron actividades proteolíticas de 250, 150, 110, 94, 75, 60, 53, 40, 37 y 20 kDa en zimogramas de gelatina (Fig. 5b). Además, la precipitación con etanol nos permitió cuantificar la concentración de proteínas y observar actividades mucinolíticas, a >250 , 94 kDa en geles activados a pH 5 (Fig. 5c, carril 1), mientras que actividades de >250 , 94 kDa y 53 kDa fueron observadas a pH 7 (Fig. 5c, carril 2), en los geles activados a pH 9 no se detectó actividad mucinolítica (Fig 3c, carril 3). Es importante mencionar que tanto con la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y con etanol se observó que las actividades mucinolíticas (94 kDa) se observaron más intensa cuando fueron activadas con pH 7.

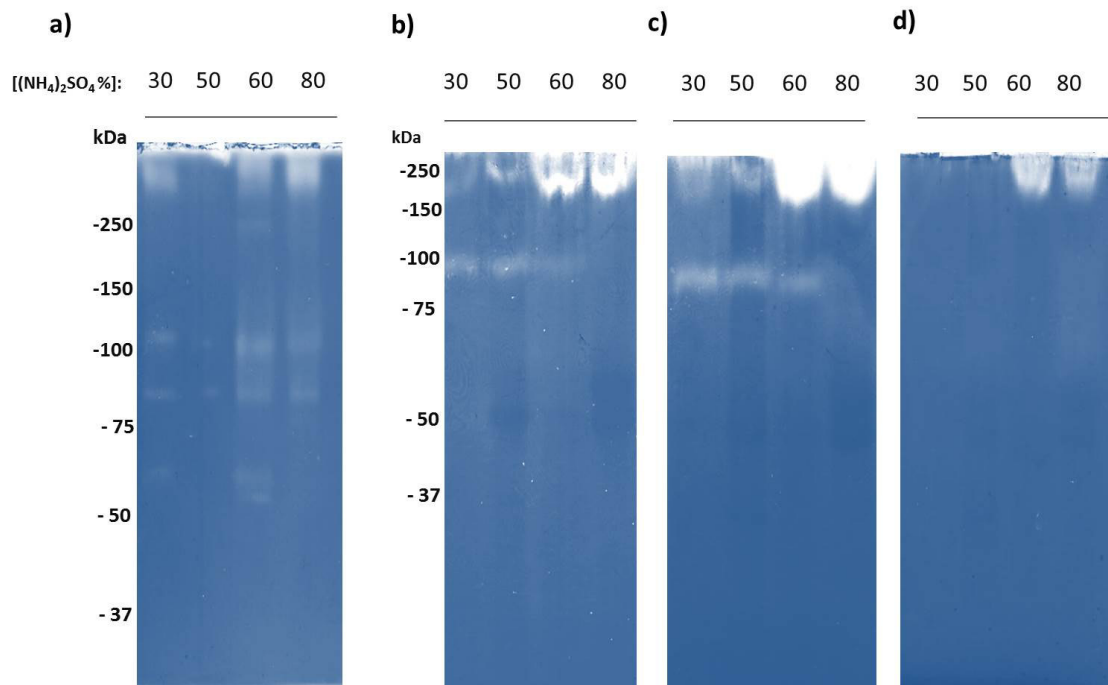


Figura 4. Detección de actividades mucinolíticas en los PS tratados con sulfato de amonio. a) Zimograma utilizando gelatina como sustrato donde se observan las bandas de actividades proteolíticas de los PS de *N. fowleri* fraccionado con diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-80%) a pH 7. Zimogramas co-polimerizados con MSB donde se observó una actividad de 94 kDa en las fracciones precipitadas con 30, 50 y 60 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ activadas a pH 5 (b) y pH 7 (c). Actividad mucinolítica de >250 en las fracciones de 60 y 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a pH 5, pH 7 y pH 9 (b-d).

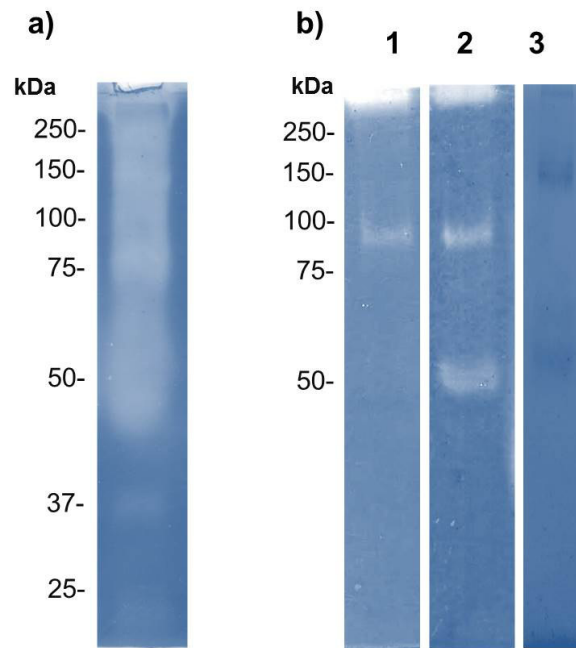


Figura 5. Detección de actividades mucinolíticas en los PS precipitados con etanol.

a) En los zimogramas de gelatina se observaron actividades proteolíticas desde los 37 kDa hasta los 250 kDa; los geles fueron activados a pH 7. b) Los zimogramas de mucina revelaron dos actividades mucinolíticas a >250 y 94 kDa a pH 5.0 (carril 1), mientras que la activación a pH 7 reveló la presencia de actividades de >250 kDa, 94 y 53 kDa (carril 2); la activación a pH 9 no reveló actividad mucinolítica (carril 3). Todas las actividades se analizaron a 37°C.

12.3 Degradación específica de la MSB por PS de *N. fowleri*

Después de determinar que la precipitación con etanol fue la mejor estrategia para estudiar la actividad mucinolítica de los PS de *N. fowleri*, se decidió explorar si las actividades proteolíticas tenían actividad específica sobre mucina (MSB). Para ello se realizaron zimogramas con otros sustratos con los cuales las amibas pudieran interactuar de manera fisiopatológica durante el proceso de invasión, tales como holo-lactoferrina, transferrina, ferritina y hemoglobina. Los resultados revelaron que los PS-etanol contenían actividades de 100 y 75 kDa capaces de degradar la holo-lactoferrina bovina; sin embargo, solo se observó una actividad proteolítica de 100 kDa en la holo-

lactoferrina humana (Fig. 6b, carriles 1 y 2). Los zimogramas de transferrina humana como sustrato revelaron la presencia de actividades de 180 y 100 kDa (Fig. 6c); sin embargo, ninguna banda de degradación fue observada en la ferritina equina (Fig. 6d). Para el caso de hemoglobina humana como sustrato una única actividad de 80 kDa fue detectada (Fig. 6e). Todas las bandas de actividad fueron activadas a 37°C a pH 7 y comparadas con el zimograma de mucina (Fig. 6a). Adicionalmente, otros valores diferentes de pH fueron analizados, así como también se utilizaron diferentes inhibidores de proteasas para realizar la caracterización bioquímica parcial de las proteasas presentes en los PS. Además, se realizaron el mismo tipo de análisis utilizando los ETA de *N. fowleri*. Con estos resultados se demostró que las actividades mucinolíticas son específicas sobre sustrato.

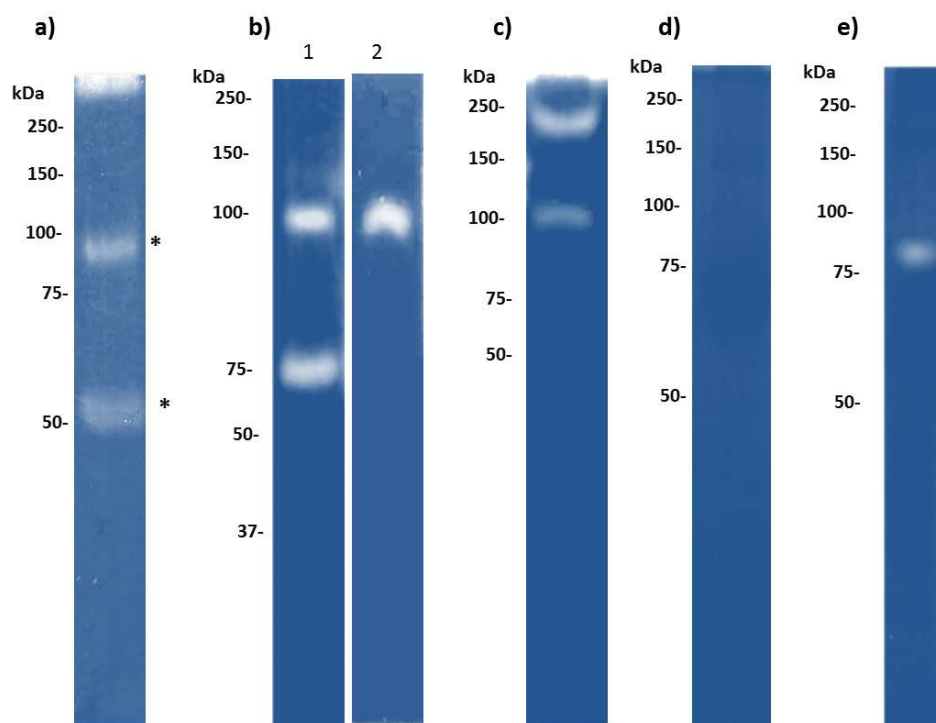


Figura 6. Degradación específica de la MSB. a) Zimograma de mucina donde se observan actividades de >250, 94 kDa y 53 kDa. b) Zimogramas de holo-lactoferrina bovina (carril 1) y humana (carril 2), donde se observan actividades de 100 y 75 kDa. c) Zimograma de transferrina humana con actividades de 180 y 100 kDa. d) Zimograma de ferritina equina que no mostró actividad proteolítica alguna. e) Zimograma de hemoglobina humana con una actividad de 80 kDa. Todos los zimogramas fueron realizados con 40 µg de PS-etanol 3:1 y activados a 37°C a pH 7.

12.4 Estimulación de la secreción de mucinasas en los trofozoítos de *N. fowleri*

Una vez que se demostró que las mucinasas secretadas tenían actividad específica sobre un sustrato específicas, se analizó la inducción de estas moléculas proteolíticas en *N. fowleri*. Para lo anterior, los trofozoítos fueron incubados con 0.1 mg de MSB durante diferentes tiempos (1, 3, 6 y 12 h), es importante mencionar que concentraciones mayores a 0.1 mg disminuía la viabilidad de los trofozoítos. Los resultados de los zimogramas en MSB a partir de los PS previamente estimulados con MSB y precipitados con etanol revelaron que la actividad de 94 kDa fue la única proteasa inducida y que esta producción aumentaba de manera tiempo dependiente (Fig. 7, carriles 1-4). En contraste, los PS no estimulados y precipitados con etanol mostraron a partir de las 6 h las actividades de >250, 94, y 53 kDa antes encontradas (Fig. 7, carriles 5-8). El análisis densitométrico de la banda de 94 kDa confirmó que la inducción de esta actividad fue estadísticamente significativa con respecto al tiempo y con la producción sin estímulo con MSB (* $p < 0.05$) (Fig. 6b).

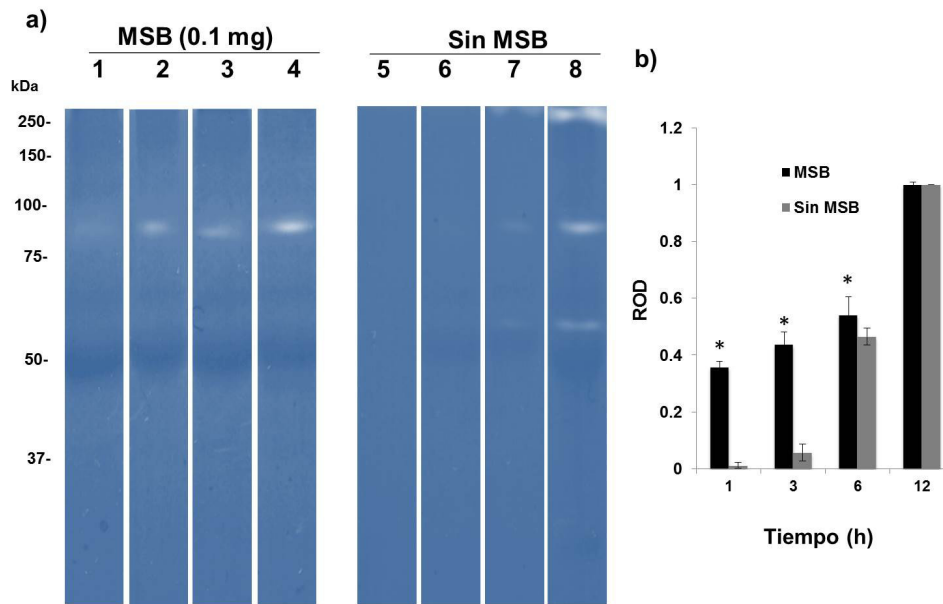


Figura 7. Inducción de la secreción de mucinasas. a) Comparación de la secreción de mucinasas de los trofozoítos de *N. fowleri* en presencia de 0.1 mg de MSB (carriles 1-4) o con medio bactocasitona s/SFB (carriles 5-8). b) Análisis densitométrico de la secreción de mucinasas utilizando el software ImageJ. Se realizaron tres ensayos independientes y las barras muestras la media de la \pm desviación estándar (* $p < 0.05$).

12.5 Inhibición de mucinas con inhibidores de cisteína y serina proteasas

Una vez determinado que las mucinas secretadas por *N. fowleri* son inducibles y sustrato específico, se realizó la caracterización bioquímica parcial de las proteasas secretadas utilizando diferentes tipos de inhibidores de proteasas. Los PS-etanol mostraron diferentes niveles de inhibición en presencia de pHMB, E-64, NEM, y IAA comparado con el control experimental sin inhibidores (Fig 8a, carril 1). La inhibición de las actividades de >250, 94 y 53 kDa fue casi total en presencia de pHMB (Fig 8a, carril 2), seguida de E-64 (Fig 8, carril 3) y en menor proporción por NEM e IAA (Fig 8a, carriles 4-5). En contraste la actividad > 250 KDa fue principalmente susceptible a los inhibidores PMSF y aprotinina (Fig 8a, carril 6-7). Adicionalmente, se observó que cuando los PS-etanol son incubados con aprotinina se pudo observar una actividad de 80 kDa (Fig 8a, carril 7). El inhibidor específico de metaloproteasas (1,10-fenantrolina) no mostró ningún efecto inhibitorio (Fig 8a, carril 8). Para visualizar el efecto de los inhibidores en las bandas de actividad de >250, 94 y 53 kDa se realizó un análisis densitométrico el cual confirmó lo previamente descrito en los zimogramas de MSB (*p<0.05) (Fig 8b).

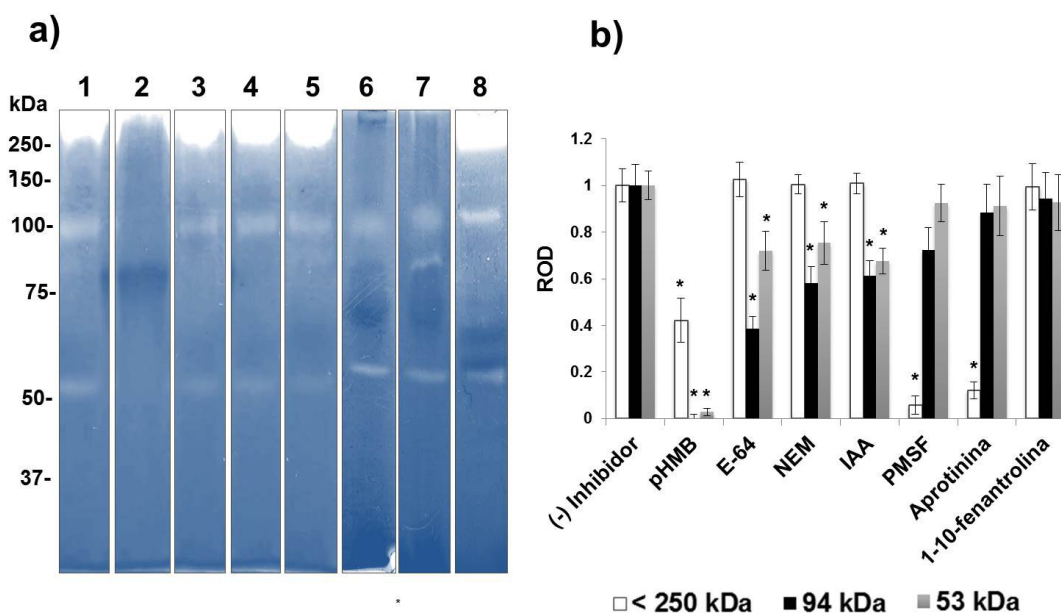


Figura 8. Inhibición de la actividad mucinolítica. a) Zimograma de mucina, PS-etanol se pre-incubaron con diferentes inhibidores de proteasas: control sin inhibidores (carril 1); con pHMB (10 mM; carril 2); E-64 (10 μ M; carril 3); NEM (5 mM; carril 4); IAA (5

μM ; carril 5); PMSF (5 mM; carril 6); aprotinina (5 mM; carril 7) y 1,10-fenantrolina (10mM; carril 8). b) El análisis densitométrico de la actividad mucinolítica en presencia de inhibidores fue realizado con el programa ImageJ y los datos fueron procesados utilizando el programa GraphPad Prism. Las barras en negro muestran la actividad de la banda de 94 kDa; en gris la actividad de 53 kDa y en blanco la actividad >250 kDa. Todas las barras muestran la media \pm desviación estándar (* $p < 0.05$).

12.6 Identificación de proteínas mucinolíticas por espectrometría de masas

Después de realizar una caracterización parcial de la actividad de 94 kDa y demostrar que fue inducible con mucina, se decidió realizar la identificación de esta actividad por espectrometría de masas. Para ello se realizó la electroforesis de los PS-etanol y la banda de 94 kDa de geles de acrilamida y la actividad del mismo peso de zimogramas de MSB fueron analizadas por espectrometría de masas. Los resultados obtenidos mostraron 28 huellas peptídicas diferentes identificadas a partir del genoma de *N. gruberi*, las cuales se clasificaron en 6 grupos diferentes de acuerdo a su función, tales como son proteínas metabólicas (41%), proteasas e hidrolasas (30%), no determinadas (11%), choque térmico (7%), señalización (7%) y síntesis (4%). Del grupo de proteasas e hidrolasas se seleccionaron 4 proteínas cercanas al peso de 94 kDa.

Tabla 1. Proteasas e hidrolasas identificadas por espectrometría de masas. Se muestra el número de acceso, así como los valores de score y cobertura obtenidos del análisis. Así mismo el peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) predicho de cada proteína.

# acceso	Descripción	Score	Cobertura	PM [kDa]	pI
284096877	Glicosil hidrolasa [<i>Naegleria gruberi</i>]	74.03	21.55	95.3	5.74
284082714	Dipeptidil aminopeptidasa [<i>Naegleria gruberi</i>]	33.65	14.48	81.6	6.62
284092264	Glucosil hidrolasa familia 31 [<i>Naegleria gruberi</i>]	11.85	5.81	95.1	6.01
284087586	Glicosil hidrolasa familia 31(GH31) Exo-alpha-1,4 glucosidasa [<i>Naegleria gruberi</i>]	8.07	3.98	89.9	5.47

12.7 Purificación parcial de mucinasas por medio de cromatografía de intercambio iónico

Con la finalidad de realizar una purificación de las actividades mucinolíticas de *N. fowleri*, los PS-etanol fueron cargados en columnas de intercambio iónico previamente equilibradas. Los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% mostraron los perfiles proteicos diferenciales de cada fracción eluida con 300, 400 y 500 mM de NaCl (Fig 9a, carril 1-3). Así mismo, los zimogramas de gelatina permitieron analizar en un contexto general las proteasas presentes en cada fracción (Fig 9b, carril 1-3). La actividad mucinolítica evaluada en zimogramas de MSB reveló que la actividad de 94 kDa estaba presente en la fracción eluida con 300 mM de NaCl (Fig 9c, carril 1), además los resultados mostraron que la actividad >250 kDa eluyó con 400 y 500 mM de NaCl (Fig 9c, carril 2 y 3).

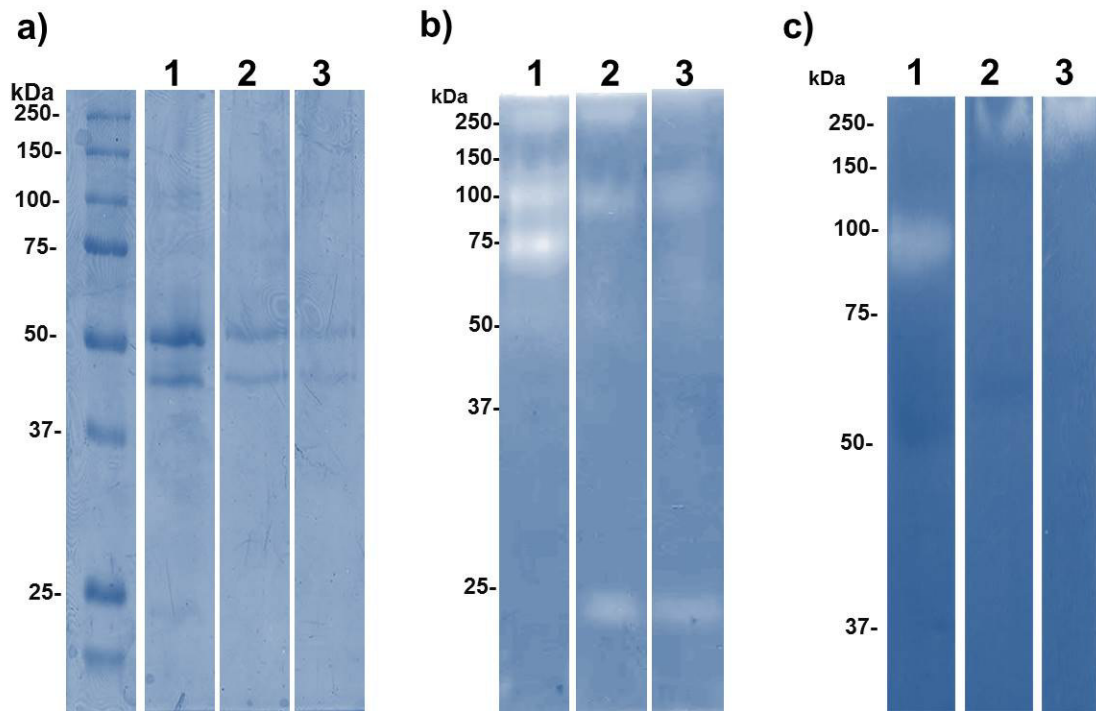


Figura 9. Purificación de la actividad mucinolítica utilizando cromatografía de intercambio iónico. Cada fracción eluida obtenidas por cromatografía de intercambio iónico fue analizada por (a) SDS-PAGE al 10%, (b) zimograma de gelatina. c) La actividad mucinolítica de 94 kDa se observó en el eluido con 300 mM de NaCl (carril 1),

mientras que en los eluidos de 400 y 500 mM se observó la actividad >250 kDa (carril 2 y 3).

12.8 Análisis bidimensional de las proteínas mucinolíticas en *N. fowleri*

La fracción de la columna de intercambio iónico eluida con 300 mM de NaCl (fracción enriquecida con mucinasa, FEM) fue separada por electroforesis bidimensional para analizar los perfiles proteicos y proteolíticos. Los resultados 2D SDS-PAGE mostraron proteínas en el rango de 100 a 30 kDa con puntos isoeléctricos (pI) entre 4-7 de pH (Fig 10a). Los zimogramas bidimensionales de gelatina mostraron la presencia de actividades de 90, 75 y 53 kDa con pI entre 4.6, 5.0 y 5.2 de pH respectivamente (Fig 10b). El análisis bidimensional de la degradación de mucina mostró una única actividad a 75 kDa con un pI de 4.5. La actividad mucinolítica fue enviada a espectrometría de masas, sin embargo, no fue posible identificar ninguna proteína.

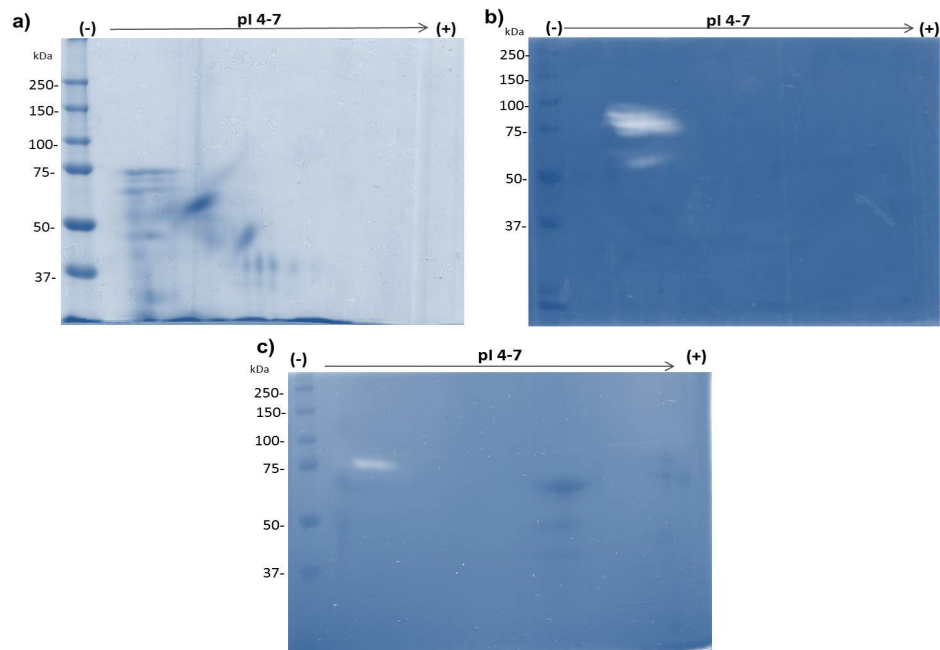


Figura 10. Análisis bidimensional de la fracción enriquecida con mucinasa. a) Gel bidimensional de acrilamida con la FEM. b) Zimograma bidimensional de gelatina de FEM. c) Zimograma bidimensional de MSB de la FEM. Los zimogramas fueron activados a pH 7 a 37°C.

12.9 Actividad de glicosidasas secretadas por *N. fowleri*

A partir de la identificación de glicosidasas por espectrometría de masas se procedió a evaluar la actividad de estas proteínas utilizando diferentes carbohidratos acoplados al grupo 4-nitrofenil como sustrato cromogénico. Los resultados revelaron que tanto el PS-etanol como la FEM fueron capaces de hidrolizar β -D-galactopiranosido a pH 5 y pH 7 (Fig 11a). Sin embargo, no se encontró hidrólisis del α -D-galactopiranosido en ninguna condición analizada (Fig 11b). De manera interesante, la mayor actividad hidrolítica tanto de PS-etanol como la FEM fue encontrada en β -D-glucopiranosido principalmente a pH 5 y pH 7 (Fig 11c). Mientras que se encontró una menor hidrólisis cuando se utilizó el β -D-mannopiranosido en todos los valores de pH evaluados (Fig 11d). Cuando se utilizó el inhibidor pHMB la hidrólisis de β -D-galactopiranosido y β -D-glucopiranosido fue totalmente inhibida (Fig 11a y c). Sin embargo, la hidrólisis de β -D-mannopiranosido fue inhibida parcialmente (Fig 11d). La prueba de ANOVA permitió realizar el análisis estadístico de cada condición con una $*p < 0.05$.

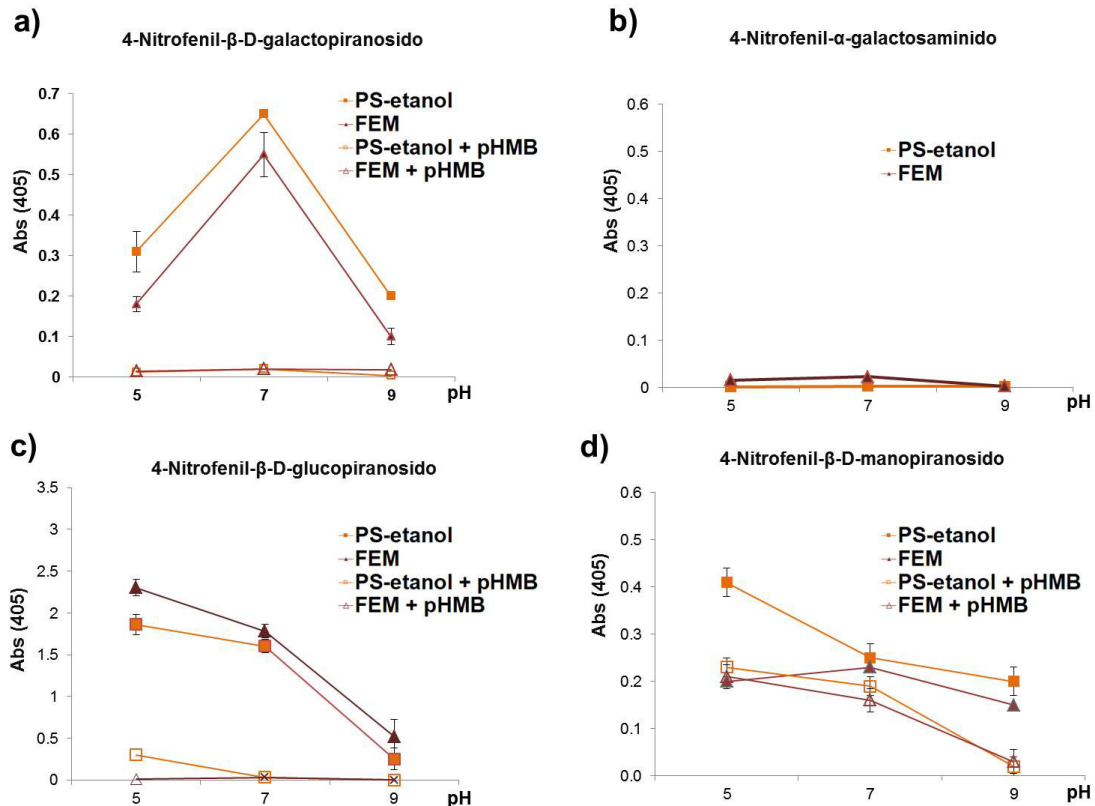


Figura 11. Degradación de sustratos glicosídicos por glicosidasas secretadas de *N. fowleri*. a) Hidrólisis de β -galactopiranosido por PS-etanol (cuadros rellenos) y FEM (triángulos rellenos). b) Hidrólisis de α -galactosaminido por PS-etanol (cuadros rellenos) y FEM (triángulos rellenos). c) Hidrólisis de β -glucopiranosido por PS-etanol (cuadros rellenos) y FEM (triángulos rellenos). Hidrólisis de β -manopiranosido por PS-etanol (cuadros rellenos) y FEM (triángulos rellenos). Todos los sustratos con actividad hidrolítica fueron analizados con muestras de PS-etanol y FEM pre-tratadas con pHMB (10 mM) (cuadros y triángulos vacíos, respectivamente). Todas las actividades fueron analizadas a pH 5, 7 y 9 a 37°C y las lecturas fueron determinadas espectrofotométricamente a 405 nm. El análisis estadístico de ANOVA de dos vías fue reportado como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$.

12.10 Diseño de péptidos de la glicosil hidrolasa y de la dipeptidil aminopeptidasa secretadas por *N. fowleri*

Después del análisis por espectrometría de masas y por ensayos de actividad con sustratos específicos y concluir que *N. fowleri* puede secretar una glicosil hidrolasa (GH); se procedió a diseñar péptidos sintéticos contra esta proteína a partir de la secuencia obtenida en la base de datos del NCIBI del genoma de *N. gruberi* con número de acceso 284096877 (apéndice). De igual manera se diseñaron péptidos contra la dipeptidil aminopeptidasa (DAP) (número de acceso 284082714) (apéndice) debido al alto puntaje encontrado por espectrometría de masas.

El análisis *in silico* de la GH, reveló que esta hidrolasa contiene el dominio conservado de GH31 el cual está asociado con el procesamiento de N-oligosacáridos. Estos hallazgos correlacionaron con la degradación de carbohidratos previamente descritos. Adicionalmente se realizó la predicción de la estructura tridimensional de cada proteína utilizando el software Phyre². El modelamiento 3D que se predijo de la GH fue obtenido a partir de la proteína cristalizada alfa/beta hidrolasa de *Leptospira interrogans* tuvo una cobertura del 32% (342 aminoácidos) con una confianza del 99.6%. Así mismo, permitió la identificación de los residuos catalíticos G (678), H (951) y D (922) (Fig 12a). Mientras que el análisis de la DAP se realizó a partir de la proteína dipeptidil

peptidasa 4 de *Homo sapiens sapiens* donde se encontró una cobertura del 87% (636 residuos) con una confianza de 100%, y los residuos catalíticos se encontraron en los residuos de S (593), D (675) y H (707) (Fig 12b).

Una vez determinado el sitio activo y los aminoácidos catalíticos de cada una de las proteínas, se realizó el diseño de péptidos para obtener anticuerpos específicos contra la GH y la DAP. Las secuencias fueron diseñadas cercanas al sitio activo, y se realizó la selección bajo los criterios de hidrofobicidad, flexibilidad, accesibilidad, giro, polaridad, superficie expuesta y tendencia antigénica (Tabla 2 y 3, apéndice). Las secuencias de 18 amino ácidos se encuentran en las posiciones 640-658 para la GH y 600-618 para la DAP (Fig 12c y d).

Los títulos de los anticuerpos cuantificados por el método de ELISA fueron encontrados en diluciones de 1: 64,000 y 1: 32,000 para la GH y la DAP, respectivamente (Fig 13 a y b).

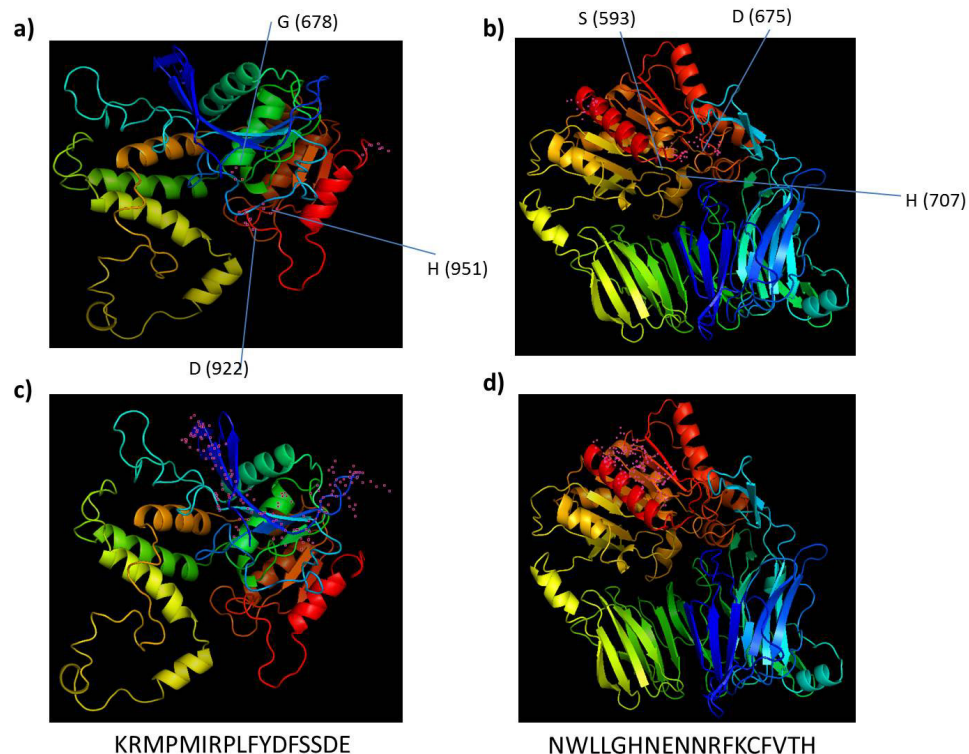


Figura 12. Predicción 3D de las proteínas mucinolíticas e identificación de las regiones inmunogénicas. a) Predicción 3D de la GH y b) de la DAP donde se observan los aminoácidos catalíticos de ambas proteínas. c y d) Estructura 3D donde se observa la

región de la secuencia peptídica seleccionada para la producción de péptidos sintéticos contra la GH y la DAP .

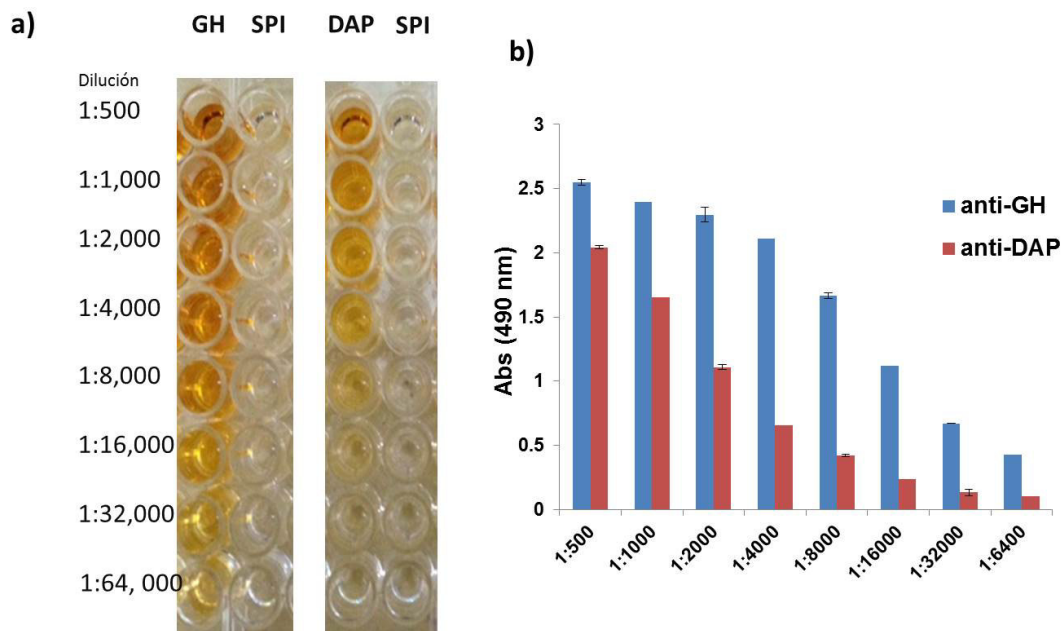


Figura 13. Titulación de anticuerpos generados contra la GH y la DAP. a) Método de ELISA utilizando los PS-etanol como antígenos para realizar la titulación de los anticuerpos contra la GH y la DAP generados en conejo. b) Los títulos fueron graficados en base a la dilución y la absorbancia obtenida a 490 nm por medio de un espectrofotómetro (Epoch, Take3).

12.11 Detección de la GH y de la DAP en *N. fowleri*

Para detectar la presencia y localización de la GH y la DAP en *N. fowleri*, se realizaron ensayos de Wb e inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos obtenidos de conejo. Los ensayos de Wb de la FEM permitieron la identificación de una proteína de 94 kDa en condiciones no reductoras tanto por los anticuerpos contra la GH como la DAP (Fig 14a y b). Mientras que cuando las muestras de la fracción purificada de 94 kDa fue tratada en condiciones reductoras se observó la detección de una proteína de aproximadamente 75 kDa cuando se utilizaron los anticuerpos contra la GH (Fig 14a). De manera similar cuando se utilizaron los anticuerpos anti-DAP en las muestras en condiciones reductoras se observó una banda de aproximadamente 50 kDa (Fig 14b).

Por otro lado, el uso de los sueros pre-inmunes (SPI) no reveló la presencia de alguna banda (Fig 14a y b).

La localización de la GH y la DAP en los trofozoítos de *N. fowleri* nos permitió observar que ambas proteínas se localizaron tanto a nivel de citoplasma como en la membrana plasmática. La localización a nivel de membrana fue observada cuando los anticuerpos anti-GH y DAP fueron utilizados en trofozoítos no permeabilizados con Triton X-100 (Fig 15a). La detección citoplasmática de la GH y la DAP en *N. fowleri* fue observada cuando la inmunolocalización se realizó en amibas permeabilizadas con Triton X-100 (Fig 15b). El SPI fue utilizado como control experimental el cual no mostró ninguna detección en los trofozoítos de *N. fowleri*.

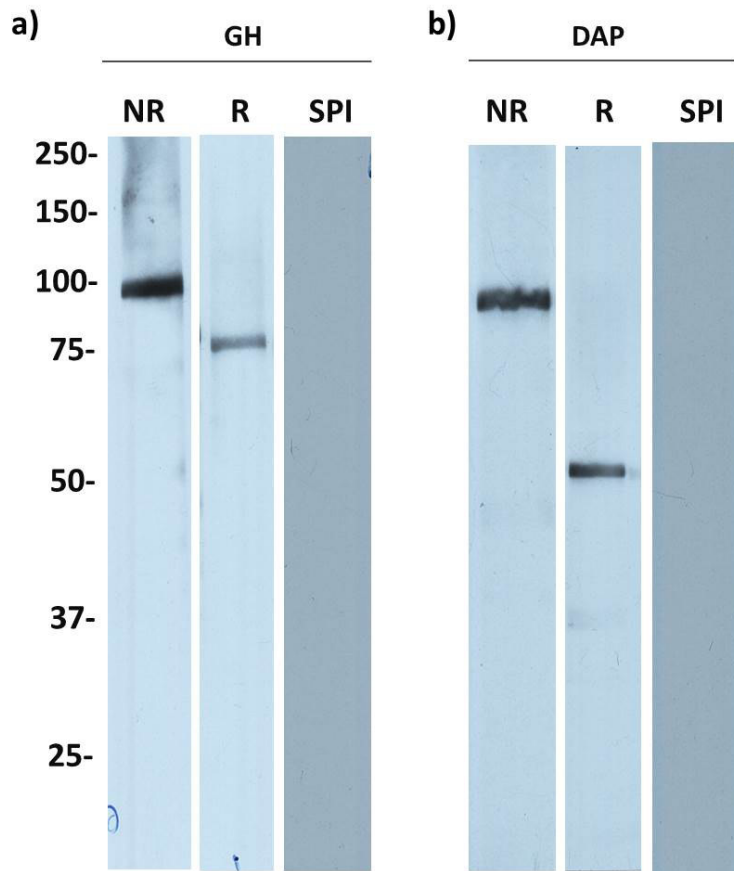


Figura 14. Detección de la GH y DAP en la FEM de *N. fowleri*. Ensayos de Wb utilizando la fracción purificada de 94 kDa. a) Los anticuerpos contra la GH detectaron una proteína de 94 kDa en condiciones no reductoras (NR) y una banda de 75 kDa cuando la fracción purificada de 94 kDa fue tratada en condiciones reductoras (R). b)

Los anticuerpos contra la DAP detectaron una proteína de 94 kDa en condiciones no reductoras (NR) y una banda de 50 kDa cuando la fracción purificada de 94 kDa fue tratada en condiciones reductoras (R). Los sueros pre-inmunes (SPI) de los conejos fueron utilizados como control. Los ensayos fueron revelados con un kit de luminol.

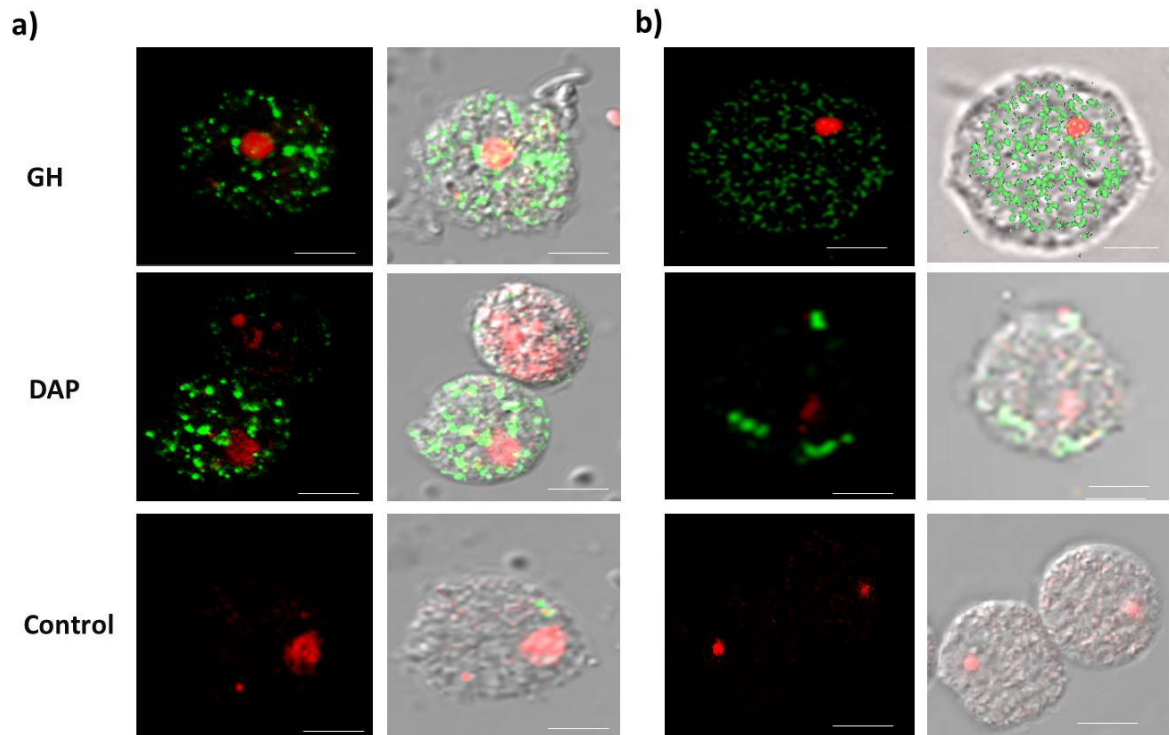


Figura 15. Inmunolocalización de la GH y DAP en los trofozoítos de *N. fowleri*. a). Localización de la GH y la DAP en trofozoítos no permeabilizados. b). Localización de la GH y la DAP en trofozoítos permeabilizados con Tritón X-100 (0.2%). Para observar la detección de la GH y de la DAP se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a FITC y los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (0.001%). El SPI fue utilizado como control. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal (Carl Zeiss, LMS 700). 60X.

12.12 Inhibición del efecto citopático inducido por trofozoítos de *N. fowleri* utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP

Para determinar si la GH y la DAP de *N. fowleri* tenían un papel importante en el efecto citopático sobre las células mucoepiteliales humanas, se utilizaron los anticuerpos específicos contra estas proteínas para bloquear su actividad. Los trofozoítos fueron co-incubados con las células NCI-H292 en presencia de los anticuerpos contra la GH o DAP y el efecto citopático fue analizado cuantificando la muerte celular por epifluorescencia. Los resultados revelaron que el daño celular disminuyó drásticamente en todos los tiempos evaluados en presencia de los anticuerpos contra la GH o la DAP, comparado con el daño de *N. fowleri* sin anticuerpos o en presencia del SPI (Fig 16a). Como control positivo se utilizaron las células NCI-H292 tratadas con Tritón-X100, mientras que como control negativo se observó la fluorescencia mínima de células sin trofozoítos. El efecto inhibitorio de los anticuerpos fue confirmado cuando se realizó el análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF). Para el análisis estadístico se utilizó la IMF de las células sin trofozoítos; el análisis estadístico reveló que tanto el anticuerpo contra la GH como contra la DAP fueron capaces de reducir el daño a las células expresado como una menor IMF; sin embargo, los resultados muestran que cuando la GH es bloqueada, el efecto de protección a las células es mayor comparado con lo observado para la DAP (* $p < 0.001$) (Fig 16b) y con el SPI utilizado como control de especificidad.

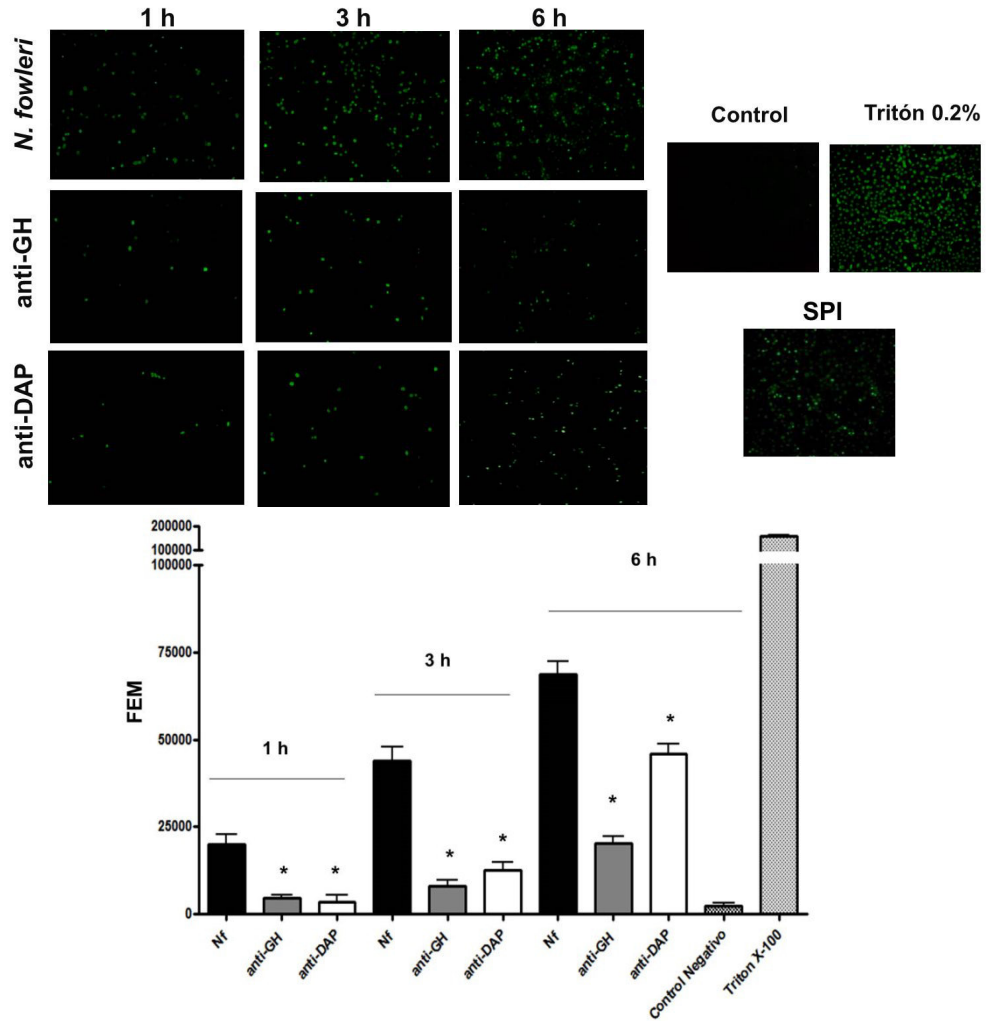


Figura 16. Protección del efecto citopático inducido por *N. fowleri* en presencia de anticuerpos contra la GH o contra la DAP. a) Los trofozoítos de *N. fowleri* fueron incubados con las células NCI-H292 durante 1, 3 y 6 h en presencia o ausencia de anticuerpos contra la GH o la DAP (1.5 $\mu\text{g/ml}$). Como control positivo de fluorescencia se utilizaron células NCI-H292 tratadas con Triton-X100; como control negativo se utilizaron células sin trofozoítos. Como control de anticuerpo se utilizó el SPI en presencia de *N. fowleri*. La viabilidad celular fue evaluada por SYTOX-green, el cual marca células muertas. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon (eclipse Ti-U). 20X. b. La cuantificación de la IMF de los núcleos fue realizada con el software ImageJ. El análisis estadístico se realizó en base a tres experimentos independientes; todas las barras muestran la desviación estándar y la significancia estadística de inhibición $*p < 0.001$.

12.13 Inhibición de la degradación de la mucina MUC5AC utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP

Para demostrar que la GH y la DAP tienen un efecto directo sobre la mucina MUC5AC, se realizaron ensayos de Dot blot de la interacción de la FEM con la mucina humana en presencia de los anticuerpos contra GH o DAP. Los resultados mostraron que los Dots revelados contra la MUC5AC sin anticuerpos, mantenía una detección uniforme de la mucina (Fig 17a, dot 1). Como control positivo se observó que la incubación de la mucina con PK causaba la degradación total de la mucina (Fig 17a, dot 2). También, la FEM de *N. fowleri* causó la degradación de MUC5AC (Fig 17a, dot 3); sin embargo, la degradación fue inhibida por el pHMB (Fig 17a, dot 4) y por los anticuerpos anti-GH (Fig 17a, dot 5) y anti-DAP (Fig 17a, dot 6). El control de anticuerpo contra MUC5AC reveló un ligero reconocimiento de las moléculas de *N. fowleri* (Fig 17a, dot 7). El análisis densitométrico demostró que la inhibición por los anticuerpos fue estadísticamente significativa $*p < 0.05$ (Fig 17b).

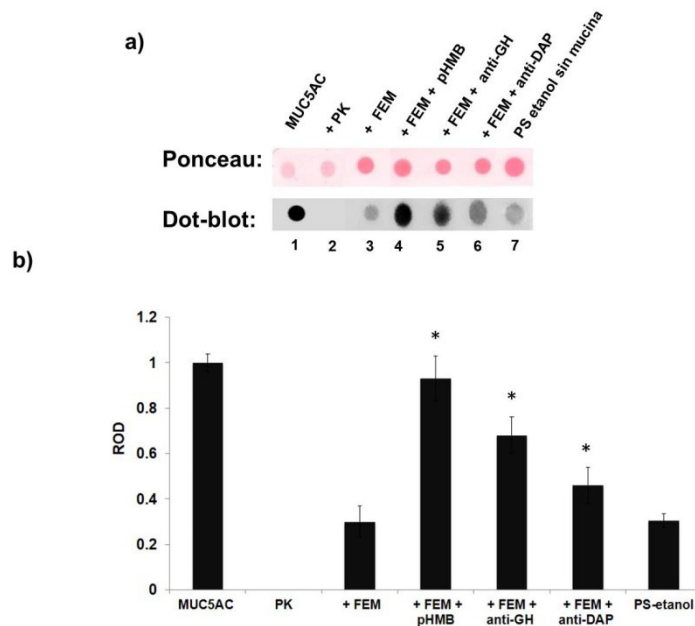


Figura 17. Inhibición de la degradación de MUC5AC utilizando anticuerpos contra la GH y la DAP. a) Detección de MUC5AC en sobrenadantes de células NCI-H292 (dot 1), MUC5AC incubado con PK (dot 2), MUC5AC incubado con la FEM (dot 3), MUC5AC incubado con la FEM y pHMB (dot 4), MUC5AC incubado con la FEM y

los anticuerpos anti-GH (dot 5), MUC5AC incubado con la FEM y anticuerpos anti-DAP (dot 6), control PS-etanol sin mucina (dot 7). Análisis densitométrico de la degradación de los ensayos de dot-blot del panel a, realizado con el software ImageJ. Todas las barras muestran la desviación estándar y la significancia estadística de inhibición * $p < 0.001$.

12.14 Anticuerpos anti-GH y/o DAP retrasan la mortalidad de la MAP experimental

Para analizar si la GH y la DAP tienen un papel importante en la MAP experimental por *N. fowleri*, se instilaron ratones de la cepa Balb/c con trofozoítos pre-incubados con anticuerpos anti-GH y/o DAP y se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de los roedores. Los resultados mostraron que todos los ratones instilados con *N. fowleri* murieron el día 7, mientras que el grupo no infectado mostró un 100% de sobrevivencia hasta finalizados los experimentos. Sin embargo, los ratones instilados con trofozoítos tratados con anticuerpos anti-GH mostraron una mortalidad del 50% en el día 7 y el 50 % restante murieron el día 17. Mientras que los animales instilados con trofozoítos tratados con anticuerpos anti-DAP mostraron una mortalidad del 50% en el día 7, el 40% restante murieron el día 8 y finalmente el 10% restante en el décimo día. El grupo de animales instilados con trofozoítos tratados con anticuerpos anti-GH y DAP se extendió la sobrevivencia del 50 % de los animales hasta el día 16 post-infección, * $p < 0.001$ (Fig 18).

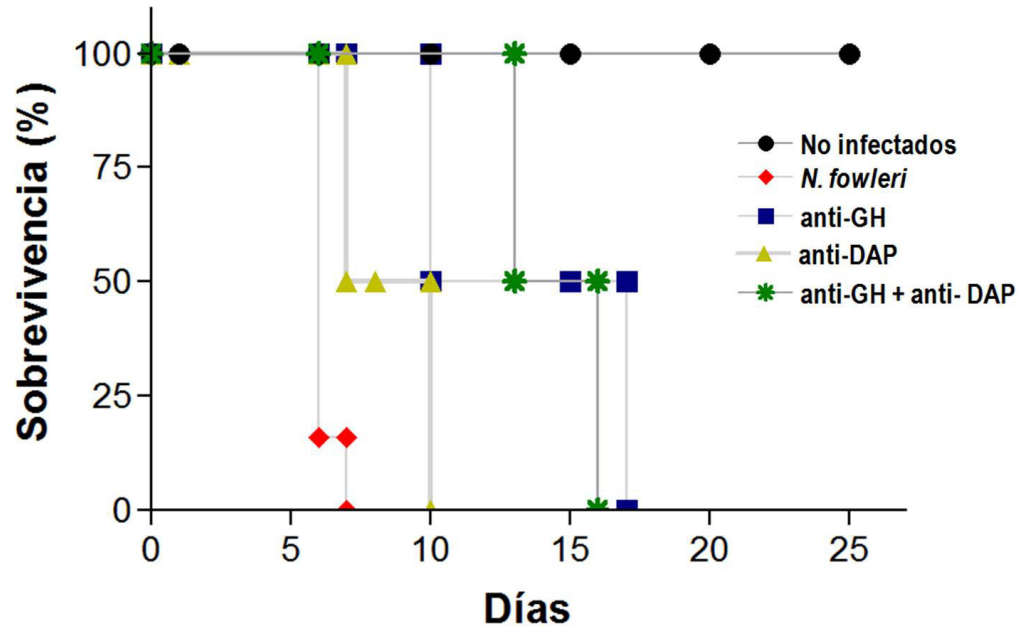


Figura 18. Anticuerpos anti-GH y/o anti-DAP retrasan la mortalidad de los ratones inducidos a MAP. Ratones instilados con 12×10^4 trofozoítos de *N. fowleri* muestran un 100% de mortalidad al séptimo día post-infección. Ratones no infectados mostraron una sobrevivencia del 100%. Los animales instilados con amibas pre-incubadas con anti-GH mostraron un retraso en la mortalidad de 10 días y los ratones instilados con amibas pre-incubadas con anti-DAP mostraron un retraso en la mortalidad de 3 días. Los roedores instilados con amibas pre-incubadas simultáneamente con anti-GH y anti-DAP mostraron un retraso de 9 días comparado con los ratones instilados con trofozoítos, pero sin anticuerpos. La curva de sobrevivencia fue realizada con la prueba de log-rank ($p < 0.001$), utilizando el software GraphPad Prism ($n=6$, por grupo).

13. DISCUSIÓN

El moco es secretado por las células caliciformes y las glándulas serosas y mucosas presentes en las diferentes capas de las mucosas; su función es la de proteger contra la entrada e invasión de agentes extraños que incluyen partículas del ambiente, toxinas y patógenos [119]. El moco nasal está constituido por agua, lisozima, lactoferrina, complemento, IgA e IgM de secreción y mucinas (glicoproteínas). Las glicoproteínas constituyen alrededor del 80 % del peso seco del moco. Las mucinas tienen un alto contenido de cadenas de carbohidratos anclados al núcleo de la proteína por medio de enlaces O-glicosídicos, mientras que las regiones NH₂ y COO⁻ están pobremente glicosiladas. [120]. Cuando las propiedades intrínsecas del moco son alteradas, la función de lubricación y protección contra las infecciones se vuelve ineficiente [121-123]. Tal es el caso de la alteración del moco vaginal, donde se ha observado que existe una correlación directa entre la disminución de la viscosidad del moco con las infecciones por bacterias, incrementando así el riesgo a infecciones por VIH y otras enfermedades [123, 124]. De igual manera, la correcta secreción del moco nasal se ve comprometida bajo diferentes condiciones como es la fibrosis quística, rinosinusitis crónica e infecciones por microorganismos patógenos [125, 126].

Es bien conocido que los microorganismos patógenos deben ser capaces de colonizar de manera exitosa los tejidos del hospedero para poder asegurar su sobrevivencia y multiplicación. Durante su invasión estos microorganismos utilizan diversas estrategias como la secreción de proteasas que les permite pasar a través de los tejidos, así como para degradar componentes de la respuesta inmune innata. Se ha reportado que tanto bacterias como virus contienen proteasas y otras enzimas hidrolíticas que han sido asociadas con la degradación de moco durante su proceso de invasión [126, 127]. Este tipo de moléculas capaces de degradar moco también han sido reportadas en el grupo de protozoarios que interaccionan directamente con el moco [111].

N. fowleri es un protozoario patógeno que entra por la cavidad nasal y se ha observado que es capaz de evadir las respuestas inmunes causando la MAP, la cual es una enfermedad aguda y fulminante [128]. Los estudios de la MAP experimental han permitido analizar que durante los eventos tempranos de la enfermedad, los trofozoítos de *N. fowleri* son rodeados por una gran cantidad de moco y una fuerte reacción inflamatoria conformada principalmente por neutrófilos [58]. Sin embargo, los trofozoítos son capaces de evadir esta respuesta inmune

innata ya que los eventos histopatológicos muestran que los trofozoítos son capaces de continuar la invasión hasta alcanzar los bulbos olfatorios y causar la muerte a los ratones el séptimo día post-infección [57]. Diversos mecanismos de patogenicidad han sido identificados in vitro que pudieran correlacionar con la habilidad de *N. fowleri* de evadir la respuesta inmune [67, 72, 99, 129].

En el 2008, nuestro grupo de investigación reportó una mucinasa de 37 kDa presente en los extractos totales amibianos de *N. fowleri*; sin embargo, no se identificó ni caracterizó esta actividad mucinolítica [59]. Por lo que en este trabajo analizamos si este patógeno es capaz de secretar mucinasas, así mismo identificar, caracterizar y determinar este tipo de proteínas mucinolíticas y evaluar su probable participación en los mecanismos de daño de *N. fowleri*.

Para la detección de la actividad mucinolítica en los PS de *N. fowleri*, las muestras fueron tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o etanol absoluto. Se realizaron zimogramas de gelatina y MSB con la finalidad de comparar los perfiles proteolíticos y demostrar la degradación específica del sustrato.

La precipitación con el gradiente discontinuo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nos permitió obtener las fracciones con actividad mucinolítica de los PS de *N. fowleri*. [59]. Es importante mencionar que por medio de esta estrategia experimental se pudo determinar la actividad mucinolítica. Sin embargo, el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ interfirió en la cuantificación de proteínas, incluso después de que se realizó la diálisis de la sal en las muestras; es posible que remanentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pudieron interferir en el estudio, ya que se ha reportado que la presencia de sales el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puede afectar la actividad de proteasas [130]. Por otro lado, la utilización de etanol nos permitió precipitar en un solo paso, todas las proteínas presentes en los PS incluidas aquellas con actividad mucinolítica. Este tipo de tratamiento ha sido previamente reportado tanto en bacterias como amibas de vida libre para el estudio de proteasas [116, 131, 132]. Los PS-etanol mostraron tres actividades mucinolíticas a >250, 94 y 53 kDa según el pH evaluado y activado a 37°C. Los valores de pH fueron seleccionados en función al pH reportado en las diferentes regiones de la cavidad nasal [133], además de que nos permitió realizar la caracterización bioquímica parcial de las proteasas en *N. fowleri*, ya que se sabe que el pH tiene un papel importante en la actividad de proteasas en las amibas y en otros microorganismos [71, 134]. Con todo lo anterior determinamos que la mejor estrategia para estudiar las mucinasas secretadas fue la precipitación con etanol. Por otra parte, las

actividades mucinolíticas también fueron analizadas en los ETA de *N. fowleri* demostrando así las diferencias en los perfiles de proteasas y mucinasas presentes en los PS y en los ETA. Además, se determinó que las actividades mucinolíticas actuaban de manera específica sobre la mucina (MSB), ya que al realizar geles co-polimerizados con otras proteínas con las que pudiera interactuar *N. fowleri* en el proceso de invasión se encontró que estas actividades de >250, 94 y 53 kDa presentes en mucina como sustrato no estaban participando en la degradación de las proteínas asociadas a hierro, tales como son holo-lactoferrina humana y bovina (h-hLf, h-bLf), hemoglobina humana, holo-transferrina humana y ferritina equina (eqF) [116]. Además, se pudo demostrar que al menos una de las mucinasas secretadas (94 kDa) era inducible con mucina. Un fenómeno similar ha sido reportado en *E. histolytica* donde la secreción de cisteína proteasas (CP1 y CP5) se estimuló y aumentó cuando los trofozoítos se interactuaron con la mucina porcina, sugiriendo que la composición de las mucinas es importante en la inducción de las proteasas [117]; es probable que la inducción de las mucinasas ocurra cuando *N. fowleri* entra por la vía nasal e interactúa con el moco. Por otro lado, es posible que las condiciones de estrés sin suero participen de manera importante en la producción de mucinasas de >250 y 53 kDa.

Al realizar la caracterización bioquímica parcial se observó que el principal tipo de proteasas de secreción presentes en *N. fowleri* son cisteína y en menor proporción serina y metaloproteasas [71, 80, 99, 135]. Estos datos correlacionaron con antecedentes reportados por nuestro grupo de trabajo en el que los inhibidores de cisteína y serina proteasa fueron capaces de inhibir de manera diferencial la actividad proteolítica [71]. En nuestros ensayos encontramos que los inhibidores de cisteína proteasas inhibieron principalmente a la actividad de 94 kDa en particular el pHMB; mientras que los inhibidores de serina proteasas actuaron sobre la actividad de >250 kDa. En cuanto al inhibidor pHMB se sabe que actúa de manera directa sobre los grupos tiol y los residuos catalíticos de las proteasas y de las glicosidasas [130, 136]. Con estos resultados se demostró importantemente que más de un tipo de enzimas mucinolíticas son secretadas por *N. fowleri*.

Después de realizar la caracterización bioquímica parcial, así como de demostrar la especificidad del sustrato y determinar que la secreción de la mucinasa de 94 kDa fue inducible, nuestros estudios se enfocaron en identificar y semi-purificar esta mucinasa. La identificación de esta proteasa de 94 kDa por espectrometría de masas arrojó al menos 28

huellas peptídicas diferentes a partir del genoma de *N. gruberi* [21]. Entre las proteínas identificadas se encontró la presencia de glicosidasas (GH) y de una DAP. Con la finalidad de realizar una purificación parcial de las moléculas con actividad mucinolítica, se utilizaron columnas de intercambio iónico. Esta estrategia experimental de purificación de proteasas por intercambio iónico fue previamente reportada en *N. fowleri*, los autores utilizaron los productos de secreción de la amiba los cuales fueron separados por estas columnas acopladas a un sistema de cromatografía líquida de proteínas (FPLC); de esta manera los autores lograron purificar proteasas de aproximadamente 60 y 30 kDa. Sin embargo, no se determinó la actividad sobre algún sustrato específico [99, 137]. Nuestros resultados mostraron que la actividad mucinolítica de 94 kDa de los PS-etanol tienen propiedades de fuerza iónica bajas pues eluyeron con una concentración de 300 mM de NaCl, esta fuerza iónica se correlaciona con lo encontrado en los resultados de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y con los zimogramas bidimensionales donde el pH de la única actividad mucinolítica se encontró a un pH ácido (4.5). La banda >250 kDa por su parte mostró una fuerza iónica elevada que de igual manera correlacionó con los ensayos de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sin embargo, las bandas de >250 y 53 kDa no se observaron en los geles bidimensionales, estos resultados pueden deberse al procesamiento de las muestras que se requiere para la electroforesis 2D [130].

Existen reportes que tanto las glicosidasas, como las cisteína proteasas son capaces de participar en la degradación de mucinas [138]. Por ejemplo en *E. histolytica* las cisteína proteasas, sialidasas, α -glucosidasa y β -N-acetilhexosaminasa han sido asociadas con las alteraciones de la red polimérica de la mucina 2 (MUC2) [97, 115, 139]. De igual manera, en los productos de secreción de *Fasciola hepatica* se encontró la presencia de glicosidasas que son capaces de degradar mucina ovina en un sistema in vitro [138]. Estudios de mediados de los 80's encontraron actividades de glicosidasas en ETA de *N. fowleri* tales como la β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, α -D-glucosidasa, β -fucosidasa, α -mannosidasa, y arilsulfatasa A [137, 140, 141]; sin embargo, la secreción y función de este tipo de moléculas no había sido demostrada. Dichas actividades fueron confirmadas cuando los SP-etanol y la FEM fueron probados con los diferentes sustratos asociados a diferentes carbohidratos utilizados en presencia y ausencia de pHMB [130, 136]. El uso de estos carbohidratos fue el adecuado pues se sabe que en las mucinas las glicosiltransferasas son las encargadas de transferir los N-acetilgalactosaminidos a los aminoácidos de Ser y Thr, los cuales continúan

alargándose por la adición de galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido N-acetil neuramínico [142]. De igual manera ha sido reportada la adición de carbohidratos tipo manosa en los residuos de triptófano en las mucinas MUC5AC y MUC5B [143]; es importante mencionar que todos los carbohidratos antes mencionados también están presente en la MSB [144-146]. Como ya se mencionó anteriormente, las mucinas tienen un alto contenido de carbohidratos que protegen a la proteína de la degradación; sin embargo, las regiones amino y carboxilo terminal no contienen esta protección por lo cual son sitios susceptibles a la actividad de proteasas, en particular aquellas que cortan en estas regiones como son las aminopeptidasas. Por esta razón nosotros no descartamos que esta proteína participe en la degradación del moco en el presente estudio. En estudios previos la DPA ya había sido reportada en los productos de secreción de *N. fowleri*, los autores demostraron la actividad por medio del sustrato leucil naftilamida y como inhibidor de la actividad el pHMB. Sin embargo, la función y caracterización molecular de esta proteasa no fue analizada [147]; cabe mencionar que existen escasos reportes de la actividad mucinolítica dadas por las DAP [148]. A pesar de que nosotros no utilizamos sustratos específicos para demostrar la actividad de la DAP, los resultados de espectrometría de masas y la inhibición con pHMB nos sugieren su participación en la degradación de mucina.

Para demostrar que la participación de las GH y la DAP secretadas por *N. fowleri* pueden causar alteraciones en la reología del moco, diseñamos los péptidos sintéticos para obtener anticuerpos policlonales mono-específicos contra la GH y la DAP. Antes de utilizar los anticuerpos para bloquear la actividad de la GH y la DAP, se realizó una detección de la GH y la DAP tanto en la FEM como en los trofozoítos completos. Los anticuerpos contra la GH y la DAP reconocieron una proteína de 94 kDa en la FEM que corresponde al peso encontrado en la actividad mucinolítica. Sin embargo, cuando las muestras fueron tratadas en condiciones reductoras y con calor, el reconocimiento de la GH por los anticuerpos se encontró en un peso de 75 kDa lo cual pudiera correlacionar con lo encontrado en la actividad mucinolítica de los geles 2D. Mientras que los anticuerpos anti-DAP reconocieron una proteína de 53 kDa en la FEM tratadas en condiciones reductoras y con calor. Por lo que es posible que durante los ensayos de zimogramas se formen complejos proteicos que no permitan la migración correcta de las proteínas [99]. La localización celular de ambas proteínas mostró una distribución citoplasmática y también a nivel de membrana celular,

aunque la vía de secreción y transporte de estas proteínas no fue abordado en el presente proyecto, sería muy importante estudiar el mecanismo de secreción de estas proteasas. Sin embargo, en el presente trabajo se realizó un análisis *in silico* utilizando el software SignalIP [149] y el software SecretomeP [150] para localizar si la GH y la DAP contenían un péptido señal que nos pudieran brindar información de cómo se secretan estas proteínas. Se determinó que la GH no contiene un péptido señal típico de eucariontes pero podría estar siendo secretada por un sistema no clásico similar a las proteínas en bacterias (Sec-score 0.59) [151]. Mientras que el análisis de la DAP mostró la presencia de un péptido señal (NN-score 0.723) típico de eucariontes por lo que de esta manera pudiera ser transportada a la membrana citoplásmica y en consecuencia ser secretada [149]. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de experimentos para determinar la vía de secreción de estas moléculas mucinolíticas.

Una vez obtenidos los anticuerpos producidos en conejo estos fueron utilizados para determinar la capacidad de bloquear la actividad de la GH y la DAP debido a que se diseñaron contra una secuencia cercana al sitio activo. Así mismo, las concentraciones inhibitorias de los anticuerpos anti-GH y anti-DAP fueron obtenidas a partir del análisis de la capacidad de aglutinar trofozoítos de *N. fowleri*, la concentración mínima inhibitoria para ambos anticuerpos fue de 1.5 µg/ml. La concentración determinada está dentro de los valores basales de las inmunoglobulinas humanas IgG (1.75 mg/ml) e IgM (30.22 mg/ml) en el suero [152, 153]. El uso de anticuerpos con la finalidad de bloquear la actividad proteolítica y glicolíticas ha sido reportado en otros sistemas biológicos como en las bacterias [154-156]. El uso de los anticuerpos como herramienta para ser utilizados en los ensayos de inhibición, nos permitió demostrar que la GH y la DAP pueden participar como un mecanismo de evasión o daño, lo cual se valoró por la disminución en la viabilidad de las células mucocelulares, como en la degradación de la mucina MUC5AC; sin embargo, no se observó una inhibición total de la degradación de MUC5AC, por lo que es posible que otras proteasas o glicosidasas participen en la degradación de MUC5AC [99, 116, 135].

Otro de los aspectos relevantes analizados en este estudio, fue el de determinar la participación de la GH y la DAP en la MAP experimental. Los resultados mostraron que principalmente la GH tiene un papel importante en la sobrevivencia de los animales, ya que los ratones instilados con trofozoítos de *N. fowleri* pre-incubados con los anticuerpos anti-GH mostraron un retraso de 10 días en la mortalidad del 50% de los roedores estudiados. El

bloqueo de la GH y la DAP simultáneamente demostró que solo 50 % de los animales sobrepasaron los 11 días en la mortalidad de los ratones, comparado con los animales instilados con trofozoítos no tratados por lo que el fenómeno de protección está más directamente asociado con el efecto de la GH. La muerte subsecuente de los animales probablemente se deba a la capacidad de *N. fowleri* de internalizar y degradar a los anticuerpos [157]. Finalmente, con todos los resultados obtenidos en el presente proyecto podemos concluir que *N. fowleri* presenta proteasas de secreción de tipo mucinolítico, que fueron enriquecidas y caracterizadas bioquímicamente. La actividad de GH y DAP mostraron tener participación en la virulencia de *N. fowleri* tanto in vitro e in vivo; por lo que es muy probable que estas actividades puedan tener un papel importante en fenómenos de daño en las etapas tempranas de la MAP. Con todos estos datos podemos además se pudiera considerar a las proteasas y glicosidasas secretadas como posibles candidatos para pruebas diagnósticas o bien para ser utilizados como blancos más específicos para el tratamiento de la MAP.

14. CONCLUSIÓN

Las glicosidasas y proteasas secretadas por *N. fowleri* inducen la degradación de la mucina MUC5AC, lo que en consecuencia podría causar alteraciones en la reología del moco que permiten a los trofozoítos evadir la respuesta inmune innata durante las etapas tempranas de la infección.

15. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar explantes de narinas de ratón para valorar la participación de la GH y la DAP en la degradación de MUC5AC in situ
- ✓ Analizar la vía de secreción de la GH y la DAP
- ✓ Obtener la secuencia de los genes para la GH y la DAP para obtener la proteína recombinante para silenciar la expresión de proteínas en *N. fowleri*
- ✓ Purificar la GH y la DAP con columnas de afinidad para procesar las muestras hasta obtener los cristales de las proteínas
- ✓ Realizar ensayos tipo ELISA a partir de suero y/o líquido cefalorraquídeo para determinar si la GH y la DAP pueden servir como biomarcadores para diagnóstico durante una infección por *N. fowleri*.
- ✓ Determinar y localizar a GH y la DAP en trofozoítos de *N. gruberi*

16. BIBLIOGRAFÍA

17. 1. Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* 271(1545), 1251-1262 (2004).
18. 2. De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 11(7), 1520-1528 (2011).
19. 3. Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML *et al*. The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* 140(5), 631-642 (2010).
20. 4. Sanchez-Flores A. A new piece of the eukaryotic puzzle. *Nat Rev Microbiol* 9(11), 769 (2011).
21. 5. Kyle DE, Noblet GP. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J Protozool* 32(1), 99-105 (1985).
22. 6. Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 20(3), 225-241 (1994).
23. 7. Pantchev N, Tappe D. Pentastomiasis and other parasitic zoonoses from reptiles and amphibians. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124(11-12), 528-535 (2011).
24. 8. Duma RJ. Non-*Naegleria* amebic meningoencephalitis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 91 65-72 (1980).
25. 9. Lares-Villa F, Hernández-Peña C. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). *Exp Parasitol* 126(1), 33-36 (2010).
26. 10. Preston TM, Cooper LG, King CA. Amoeboid locomotion of *Naegleria gruberi*: the effects of cytochalasin B on cell-substratum interactions and motile behavior. *J Protozool* 37(4), 6S-11S (1990).
27. 11. Oh YH, Jeong SR, Kim JH *et al*. Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nfa1 antibody. *Parasite Immunol* 27(12), 453-459 (2005).
28. 12. Preston TM, King CA. An experimental study of the interaction between the soil amoeba *Naegleria gruberi* and a glass substrate during amoeboid locomotion. *J Cell Sci* 34 145-158 (1978).
29. 13. Scaglia M, Gatti S, Brustia R, Chichino G, Rondanelli EG. Phagocytosis of human erythrocytes by *Naegleria* is not related to species pathogenicity. A phase-contrast cinemicrographic study. *Microbiologica* 14(1), 45-53 (1991).
30. 14. Xinyao L, Miao S, Yonghong L *et al*. Feeding characteristics of an amoeba (Lobosea: *Naegleria*) grazing upon cyanobacteria: food selection, ingestion and digestion progress. *Microb Ecol* 51(3), 315-325 (2006).
31. 15. Schuster F. An Electron Microscope Study of the Amoeboid-Flagellate, *Naegleria gruberi* (Schardinger). II. The Cyst Stage. *J Protozool* 10 313-320 (1963).

32. 16. Schuster F. An Electron Microscope Study of the Amoeboid-Flagellate, *Naegleria gruberi* (Schardinger). I. The Amoeboid and Flagellate Stages. *J Protozool* 10 297-313 (1963).
33. 17. Fritz-Laylin LK, Cande WZ. Ancestral centriole and flagella proteins identified by analysis of *Naegleria* differentiation. *J Cell Sci* 123(Pt 23), 4024-4031 (2010).
34. 18. Feldman MR. *Naegleria fowleri*: fine structural localization of acid phosphatase and heme proteins. *Exp Parasitol* 41(2), 283-289 (1977).
35. 19. Fulton C, Dingle AD. Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*. *J Cell Biol* 51(3), 826-836 (1971).
36. 20. Mar J, Walsh CJ. Temperature-shock induction of multiple flagella induces additional synthesis of flagellum specific mRNAs and tubulin. *Exp Cell Res* 314(4), 896-902 (2008).
37. 21. 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. *Res Microbiol* 162(6), 607-618 (2011).
38. 22. Willmer EN. Factors influencing the form of *Naegleria gruberi*. *J Gen Microbiol* 50(3), Suppl:xi-xii (1968).
39. 23. Patterson M, Woodworth TW, Marciano-Cabral F, Bradley SG. Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. *J Bacteriol* 147(1), 217-226 (1981).
40. 24. Chang SL. Cytological and ecological observations on the flagellate transformation of *Naegleria gruberi*. *J Gen Microbiol* 18(3), 579-585 (1958).
41. 25. Chávez-Munguía B, Omaña-Molina M, Castanon G *et al*. Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *J Eukaryot Microbiol* 56(1), 66-72 (2009).
42. 26. Werth JM, Kahn AJ. Isolation and preliminary chemical analysis of the cyst wall of the amoeba-flagellate *Naegleria gruberi*. *J Bacteriol* 94(4), 1272-1274 (1967).
43. 27. 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. *J Clin Microbiol* 31(10), 2758-2763 (1993).
44. 28. Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 52(1), 114-133 (1988).
45. 29. Das SR. Isolation of *Naegleria* and *Hartmannella* amoebae from Beckenham (London) soils and their pathogenicity in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66(4), 663-664 (1972).
46. 30. Martínez AJ, Nelson EC, Duma RJ. Animal model of human disease. Primary amebic meningoencephalitis, *Naegleria* meningoencephalitis, CNS protozoal infection. *Am J Pathol* 73(2), 545-548 (1973).
47. 31. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. Toll-like receptors in CNS parasitic infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 336 83-104 (2009).
48. 32. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A *et al*. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)* (2012).

49. 33. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34(9), 1001-1027 (2004).
50. 34. Carter RF. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol* 100(4), 217-244 (1970).
51. 35. Martínez AJ, Nelson EC, Jones MM, Duma RJ, Rosenblum WI. Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study. *Lab Invest* 25(5), 465-475 (1971).
52. 36. Cabanes PA, Wallet F, Pringuez E, Pernin P. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 67(7), 2927-2931 (2001).
53. 37. Valenzuela G, Lopez-Corella E, De Jonckheere JF. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78(4), 558-559 (1984).
54. 38. Cervantes-Sandoval I, De Serrano-Luna JJ, Tapia-Malagon JL *et al.* Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico. *Rev Invest Clin* 59(5), 342-347 (2007).
55. 39. Lares-Villa F. Free-living amoebae infections in Mexico. *IXth International meeting on the biology and pathogenicity of free-living amoebae proceedings* 13-18 (2001).
56. 40. Vargas-Zepeda J, Gómez-Alcala AV, Vasquez-Morales JA, Licea-Amaya L, De Jonckheere JF, Lares-Villa F. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch Med Res* 36(1), 83-86 (2005).
57. 41. Lares-Villa F, De Jonckheere JF, De Moura H *et al.* Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *J Clin Microbiol* 31(3), 685-688 (1993).
58. 42. Lares-Villa F. A quantitative study of thermophilic *Naegleria* during summer season, in natural waters used for recreational purposes in Sonora, México. *XIth international meeting on the biology and pathogenicity of free-living amoebae proceedings* (2005).
59. 43. Marciano-Cabral FC, G. A. The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(2), 243-259 (2007).
60. 44. Oddo BD, Ciani AS, Vial CP. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. First case diagnosed in Chile. *Rev Chilena Infectol* 23(3), 232-236 (2006).
61. 45. Sugita Y, Fujii T, Hayashi I *et al.* Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Pathol Int* 49(5), 468-470 (1999).
62. 46. 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? *J Med Microbiol* (2016).

63. 47. Schuster FL, Rechthand E. *In vitro* effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* 8(5), 591-605 (1975).
64. 48. Goswick SM, Brenner GM. Activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 47(2), 524-528 (2003).
65. 49. Kim JH, Jung SY, Lee YJ *et al.* Effect of therapeutic chemical agents *in vitro* and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(11), 4010-4016 (2008).
66. 50. Debnath A, Tunac JB, Galindo-Gomez S, Silva-Olivares A, Shibayama M, Mckerrow JH. Corifungin: a new drug lead for *Naegleria*, identified from a high throughput screen. *Antimicrob Agents Chemother* (2012).
67. 51. Rojas-Hernández S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 72(8), 4368-4375 (2004).
68. 52. Lallinger GJ, Reiner SL, Cooke DW *et al.* Efficacy of immune therapy in early experimental *Naegleria fowleri* meningitis. *Infect Immun* 55(5), 1289-1293 (1987).
69. 53. Shibayama M, Serrano-Luna J, Rojas-Hernández S, Campos-Rodriguez R, Tsutsumi V. Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Can J Microbiol* 49(3), 164-170 (2003).
70. 54. Reilly MF, White KL, Jr., Bradley SG. Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect Immun* 42(2), 645-652 (1983).
71. 55. Newsome AL, Arnold RR. Equivalent mortality in normal and athymic mice infected with *Naegleria fowleri*. *J Parasitol* 71(5), 678-679 (1985).
72. 56. Shibayama M, Martinez-Castillo M, Silva-Olivares A *et al.* Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology* 159(Pt 2), 392-401 (2013).
73. 57. Rojas-Hernández S, Jarillo-Luna A, Rodriguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res* 94(1), 31-36 (2004).
74. 58. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, Garcia-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol Int* 57(3), 307-313 (2008).
75. 59. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, Garcia-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology* 154(Pt 12), 3895-3904 (2008).
76. 60. Martinez-Castillo M. (Tesis) Activación de TLR2 y TLR4 por trofozoítos de *Naegleria fowleri* y *Naegleria gruberi* en células

- mucoepiteliales humanas. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. CINVESTAV-IPN* 108 (2012).
77. 61. Holbrook TW, Boackle RJ, Parker BW, Vesely J. Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect Immun* 30(1), 58-61 (1980).
 78. 62. Whiteman LY, Marciano-Cabral F. Resistance of highly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae to complement-mediated lysis. *Infect Immun* 57(12), 3869-3875 (1989).
 79. 63. Chu DM, Woodward J, Fritzing A, Marciano-Cabral F. Calcium-dependent protection from complement lysis in *Naegleria fowleri* amoebae. *Cell Calcium* 31(3), 105-114 (2002).
 80. 64. Fritzing AE, Toney DM, Maclean RC, Marciano-Cabral F. Identification of a *Naegleria fowleri* membrane protein reactive with anti-human CD59 antibody. *Infect Immun* 74(2), 1189-1195 (2006).
 81. 65. Marciano-Cabral FM, Fulford DE. Cytopathology of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. *Appl Environ Microbiol* 51(5), 1133-1137 (1986).
 82. 66. Han KL, Lee HJ, Shin MH, Shin HJ, Im KI, Park SJ. The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol Res* 94(1), 53-60 (2004).
 83. 67. Jamerson M, Da Rocha-Azevedo B, Cabral GA, Marciano-Cabral F. Pathogenic *Naegleria fowleri* and nonpathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins. *Microbiology* (2012).
 84. 68. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, Pacheco-Yeppez J, Silva-Olivares A, Tsutsumi V, Shibayama M. Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitol Res* 106(3), 695-701 (2010).
 85. 69. Fulton C. Intracellular regulation of cell shape and motility in *Naegleria*. First insights and a working hypothesis. *J Supramol Struct* 6(1), 13-43 (1977).
 86. 70. Thong YH, Ferrante A. Migration patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. *Infect Immun* 51(1), 177-180 (1986).
 87. 71. Serrano-Luna J, Cervantes-Sandoval I, Tsutsumi V, Shibayama M. A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. *J Eukaryot Microbiol* 54(5), 411-417 (2007).
 88. 72. Herbst R, Ott C, Jacobs T, Marti T, Marciano-Cabral F, Leippe M. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 277(25), 22353-22360 (2002).
 89. 73. Hysmith RM, Franson RC. Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim Biophys Acta* 712(3), 698-701 (1982).
 90. 74. Hysmith RM, Franson RC. Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim Biophys Acta* 711(1), 26-32 (1982).

91. 75. Cho MS, Jung SY, Park S *et al.* Immunological characterizations of a cloned 13.1-kilodalton protein from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(5), 954-959 (2003).
92. 76. Kang SY, Song KJ, Jeong SR *et al.* Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(7), 873-876 (2005).
93. 77. Song KJ, Song KH, Kim JH *et al.* Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and *in vitro* cytotoxicity. *Parasitol Res* 103(2), 313-317 (2008).
94. 78. Song KJ, Song KH, Na BK *et al.* Molecular cloning and characterization of a cytosolic heat shock protein 70 from *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* 100(5), 1083-1089 (2007).
95. 79. Rojas-Hernández S, Rodriguez-Monroy MA, Moreno-Fierros L *et al.* Nitric oxide production and nitric oxide synthase immunoreactivity in *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* 101(2), 269-274 (2007).
96. 80. Sajid M, Mckerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 120(1), 1-21 (2002).
97. 81. Barrett AJ. Classification of peptidases. *Methods Enzymol* 244 1-15 (1994).
98. 82. Atkinson HJ, Babbitt PC, Sajid M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends Parasitol* 25(12), 573-581 (2009).
99. 83. Bond JS, Butler PE. Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem* 56 333-364 (1987).
100. 84. Bond JS, Butler PE, Macadam G, Beynon RJ. Regulation of a membrane-bound proteinase in mammalian cells. *Revis Biol Celular* 20 125-137 (1989).
101. 85. Mckerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 47 821-853 (1993).
102. 86. Rippon JW, Varadi DP. The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes. *J Invest Dermatol* 50(1), 54-58 (1968).
103. 87. Inoue H, Nakagawa T, Morihara K. Pseudomonas aeruginosa proteinase. II. Molecular weight and molecular dimension. *Biochim Biophys Acta* 73 125-131 (1963).
104. 88. Montes LF, Constantine VS. Cytochemical demonstration of aminopeptidase in *Candida albicans*. *J Invest Dermatol* 51(1), 1-3 (1968).
105. 89. Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 71 275-305 (2002).
106. 90. Barale JC, Blisnick T, Fujioka H *et al.* Plasmodium falciparum subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11), 6445-6450 (1999).
107. 91. Breton CB, Blisnick T, Jouin H *et al.* Plasmodium chabaudi p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20), 9647-9651 (1992).
108. 92. Rodriguez A, Rioult MG, Ora A, Andrews NW. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* 129(5), 1263-1273 (1995).

109. 93. Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, Mckerrow JH. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* 89(3), 437-444 (1997).
110. 94. Williams AG, Coombs GH. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Int J Parasitol* 25(7), 771-778 (1995).
111. 95. Koh W, Geurden T, Paget T *et al.* *Giardia duodenalis* assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: Effects of mixed infections. *J Parasitol* (2012).
112. 96. Piña-Vazquez C, Reyes-Lopez M, Ortiz-Estrada G, De La Garza M, Serrano-Luna J. Host-parasite interaction: parasite-derived and -induced proteases that degrade human extracellular matrix. *J Parasitol Res* 2012 748206 (2012).
113. 97. Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24), 9298-9303 (2006).
114. 98. Betanzos A, Javier-Reyna R, Garcia-Rivera G *et al.* The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS One* 8(6), e65100 (2013).
115. 99. Aldape K, Huizinga H, Bouvier J, Mckerrow J. *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp Parasitol* 78(2), 230-241 (1994).
116. 100. Kim JH, Yang AH, Sohn HJ, Kim D, Song KJ, Shin HJ. Immunodominant antigens in *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins were potential pathogenic factors. *Parasitol Res* 105(6), 1675-1681 (2009).
117. 101. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* 70 459-486 (2008).
118. 102. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 86(1), 245-278 (2006).
119. 103. Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 76(898), 473-478 (2000).
120. 104. Thornton DJ, Sheehan JK. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc* 1(1), 54-61 (2004).
121. 105. Smirnova MG, Guo L, Birchall JP, Pearson JP. LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol* 221(1), 42-49 (2003).
122. 106. Richter A, O'donnell RA, Powell RM *et al.* Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27(1), 85-90 (2002).
123. 107. Borchers MT, Carty MP, Leikauf GD. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1), L549-555 (1999).

124. 108. Herrmann A, Davies JR, Lindell G *et al.* Studies on the "insoluble" glycoprotein complex from human colon. Identification of reduction-insensitive MUC2 oligomers and C-terminal cleavage. *J Biol Chem* 274(22), 15828-15836 (1999).
125. 109. Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immun* 60(10), 3971-3978 (1992).
126. 110. Bell SL, Xu G, Forstner JF. Role of the cystine-knot motif at the C-terminus of rat mucin protein Muc2 in dimer formation and secretion. *Biochem J* 357(Pt 1), 203-209 (2001).
127. 111. Connaris S, Greenwell P. Glycosidases in mucin-dwelling protozoans. *Glycoconj J* 14(7), 879-882 (1997).
128. 112. Lehker MW, Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect* 75(4), 231-238 (1999).
129. 113. Wiggins R, Hicks SJ, Soothill PW, Millar MR, Corfield AP. Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sex Transm Infect* 77(6), 402-408 (2001).
130. 114. Moncada D, Keller K, Ankri S, Mirelman D, Chadee K. Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology* 130(3), 721-730 (2006).
131. 115. Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol* 19(7), 305-311 (2003).
132. 116. Martínez-Castillo M, Ramirez-Rico G, Serrano-Luna J, Shibayama M. Iron-Binding Protein Degradation by Cysteine Proteases of *Naegleria fowleri*. *Biomed Res Int* 2015 416712 (2015).
133. 117. Chadee K, Keller K, Forstner J, Innes DJ, Ravdin JI. Mucin and nonmucin secretagogue activity of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin in rat colon. *Gastroenterology* 100(4), 986-997 (1991).
134. 118. Bland JM, Altman DG. The logrank test. *BMJ* 328(7447), 1073 (2004).
135. 119. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 57 607-634 (1995).
136. 120. Bansil R, Stanley E, Lamont JT. Mucin biophysics. *Annu Rev Physiol* 57 635-657 (1995).
137. 121. Tiewcharoen S, Phurttikul W, Rabablert J *et al.* Effect of synthetic antimicrobial peptides on *Naegleria fowleri* trophozoites. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 45(3), 537-546 (2014).
138. 122. Hicks SJ, Theodoropoulos G, Carrington SD, Corfield AP. The role of mucins in host-parasite interactions. Part I-protozoan parasites. *Parasitol Today* 16(11), 476-481 (2000).
139. 123. Quraishi MS, Jones NS, Mason J. The rheology of nasal mucus: a review. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 23(5), 403-413 (1998).

140. 124. Lai SK, Wang YY, Wirtz D, Hanes J. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61(2), 86-100 (2009).
141. 125. Jeong JH, Hwang PH, Cho DY, Joo NS, Wine JJ. Secretion rates of human nasal submucosal glands from patients with chronic rhinosinusitis or cystic fibrosis. *Am J Rhinol Allergy* 29(5), 334-338 (2015).
142. 126. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* 1(3), 183-197 (2008).
143. 127. Robertson AM, Wiggins R, Horner PJ *et al.* A novel bacterial mucinase, glycosulfatase, is associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 43(11), 5504-5508 (2005).
144. 128. Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. *Handb Clin Neurol* 114 153-168 (2013).
145. 129. Young JD, Lowrey DM. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 264(2), 1077-1083 (1989).
146. 130. Cotta MA, Hespell RB. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol* 52(1), 51-58 (1986).
147. 131. Ramírez-Rico G, Martínez-Castillo M, De La Garza M, Shibayama M, Serrano-Luna J. *Acanthamoeba castellanii* Proteases are Capable of Degrading Iron-Binding Proteins as a Possible Mechanism of Pathogenicity. *J Eukaryot Microbiol* 62(5), 614-622 (2015).
148. 132. Luna-Castro S, Aguilar-Romero F, Samaniego-Barron L, Godinez-Vargas D, De La Garza M. Effect of bovine apo-lactoferrin on the growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biometals* 27(5), 891-903 (2014).
149. 133. Hehar SS, Mason JD, Stephen AB *et al.* Twenty-four hour ambulatory nasal pH monitoring. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 24(1), 24-25 (1999).
150. 134. Verma S, Dixit R, Pandey KC. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front Pharmacol* 7 107 (2016).
151. 135. Lee J, Kim JH, Sohn HJ *et al.* Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitol Res* 113(8), 2765-2776 (2014).
152. 136. Avila M, Jaquet M, Moine D *et al.* Physiological and biochemical characterization of the two alpha-L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245. *Microbiology* 155(Pt 8), 2739-2749 (2009).
153. 137. Olomu N, Martinez AJ, Lamarco KL *et al.* Demonstration of various acid hydrolases and preliminary characterization of acid phosphatase in *Naegleria fowleri*. *J Protozool* 33(3), 317-321 (1986).
154. 138. Irwin JA, Morrissey PE, Ryan JP *et al.* Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 129(Pt 4), 465-472 (2004).
155. 139. Moncada D, Keller K, Chadee K. *Entamoeba histolytica*-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infect Immun* 73(6), 3790-3793 (2005).

156. 140. Das S, Saha AK, Nerad TA *et al.* Partial purification and characterization of *Naegleria fowleri* beta-glucosidase. *J Protozool* 34(1), 68-74 (1987).
157. 141. Eisen D, Franson RC. Acid-active neuraminidases in the growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and in sonicates of rabbit alveolar macrophages. *Biochim Biophys Acta* 924(2), 369-372 (1987).
158. 142. Hounsell EF. Physicochemical analyses of oligosaccharide determinants of glycoproteins. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 50 311-350 (1994).
159. 143. Perez-Vilar J, Randell SH, Boucher RC. C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology* 14(4), 325-337 (2004).
160. 144. Ozeki T, Yosizawa Z. Glycopeptides isolated from bovine submaxillary mucin. *Arch Biochem Biophys* 142(1), 177-183 (1971).
161. 145. Tsuji T, Osawa T. Carbohydrate structures of bovine submaxillary mucin. *Carbohydr Res* 151 391-402 (1986).
162. 146. Hashimoto Y, Pigman W. Comparison of Composition of Mucins and Blood-Group Substances. *Ann Ny Acad Sci* 93(12), 541-& (1962).
163. 147. Marciano-Cabral F, Stanitski S, Radhakrishna V, Bradley SG. Characterization of a neutral aminoacyl-peptide hydrolase from *Naegleria fowleri*. *J Protozool* 34(2), 146-149 (1987).
164. 148. Peduzzi P, Herndl GJ. Mucus Trails in the Rocky Intertidal - a Highly-Active Microenvironment. *Mar Ecol Prog Ser* 75(2-3), 267-274 (1991).
165. 149. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8(10), 785-786 (2011).
166. 150. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17(4), 349-356 (2004).
167. 151. Bendtsen JD, Kiemer L, Fausboll A, Brunak S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol* 5 58 (2005).
168. 152. Kratz A, Lewandrowski KB. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Normal reference laboratory values. *N Engl J Med* 339(15), 1063-1072 (1998).
169. 153. Kardar G, Oraei M, Shahsavani M *et al.* Reference Intervals for Serum Immunoglobulins IgG, IgA, IgM and Complements C3 and C4 in Iranian Healthy Children. *Iran J Public Health* 41(7), 59-63 (2012).
170. 154. Ganesan R, Eigenbrot C, Wu Y *et al.* Unraveling the allosteric mechanism of serine protease inhibition by an antibody. *Structure* 17(12), 1614-1624 (2009).
171. 155. Wu Y, Eigenbrot C, Liang WC *et al.* Structural insight into distinct mechanisms of protease inhibition by antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(50), 19784-19789 (2007).
172. 156. Yu J, Choi SY, Moon KD *et al.* A glycosidase antibody elicited against a chair-like transition state analog by in vitro immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6), 2880-2884 (1998).

173. 157. Ferrante A, Thong YH. Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* 9(6), 599-601 (1979).

174.

175. ANEXOS

Secuencia de la GH

>gi|284096877|gb|EFC50504.1| glycoside hydrolase [*Naegleria gruberi*]

MPAGAWIMNKLYTLGNGFYDMTMTKQSDRVKYKYEKKMKQVEKFVSEDGAIKSHSIDQKKVII
TFDNSRLTLRCIDNIVWKVSFMPKESVEYPSLVVSDDALNFVNIIVDEENEDFITFKPADSALTKLK
LNKKNLISIDILTQFTNDQYTTAFSNIKVATRPKDEQATNISFGYNVSTVKSVSNDWFGLGEKSNSV
KKNKKYLFWNWDSFAYQSETDPLYQSIPIFGIVSSKFEIDQGKTERRFNGIFIDNYGMOQWDLTS
EEHFSANLESFPCNVYFMANNAKTPFNISKTYEQLTGANPMVPLWVLGYHQCRWSYYPDTQVK
EIAQEFLDRDIPCDVIYLDIDYMDGYRDFTWKTDFPNPRELLKWLHERKFKVVTILDPGVKVDS
NYDVYKTGVEGNHFCAYPNGKLYEGVVWPGATHMPSYTSEPVRKWWADWYKGLIEDGVDGF
WNDMNCPSVKVNPVIEAGTMDDNVLQVMDAPYPSQMFKDIHNFYGSMAIASREGIEKFQRPLN
RRSFLFARACFAGIQKHAGSWSGDNMSTFEHLAISLRLMGQSIGQLMVGADIGGFRWNCFPPEL
YARWIAFGSIFYPYCRSHTDKFTIQEPWSFGEQVEAISKKFIKRLRYQLMPYLYTASVLHSKRSM
MIRPLFYDFSSDEECYNQEWLDTQGMIGNALMVAPILHEKQTSRKVYLPKLEEEKWYDFFNPNAN
SYEGGQVITVEAPLDHLPVVFVKGGSVIPMRQTHAQSVYDLHLVDLTFKSFSGSIVTSQQNYLYLDD
GISLDYENGLYGFYQIEDANGTLKLLGNGFPTRLEIGKDFENLEQFTAKFY

Secuencia de la DP

>gi|284082714|gb|EFC36427.1| predicted protein [*Naegleria gruberi*]

MKVLFALLVLLSAVLVLGGNIPVNSTKYSASSTDAPVLTIRDVQELQKVS GASVSVDGRYAVY
SVKQWSSKTGKSTSVLELLEIQSGKIIRFKEGSNDFSPKFTPDGQFILFLSTSRGSANSPQLYSVPVN
GDESQIARLTDYDVPIESYKISKSVNNGVFYIAFSAKVYTSCKNRNELLSCSKQLNDEWENKGSN
TGYVYTKLFVRHWDYITEGKVSHVLLQKVKVGSLSLIDQPWDTMFGMDSDSPIPFGGEEQY
DISKTGRYVAINLEINSHRVAWTTGWKIYVADVGYNTQSGPISTSELKKITGFTEARTQNPTFSP
FQDEVLAYLAMTKPGHESDNLHVNMYNILTDRTNQSIQSLSLDRSIGDIVWFDASHLIIGYSNDG
ANVLSLLDISTGFNGTVPITNEGHSGSVVVVSPGVSAIFSFDYIKPSELCLLKRSNGSNHFGMAYL
TDHNPHLAVFNLAKEPKQYFIGALGERVQAWVFKPTNFNSGKKYKVANLIHGGPESSFTDSWSY
RWNPQLFASQGYAVIMINFHGSDGFGLKFKESILGNWGSYPYEDITKGTDFLISTNSFMDGNSMC
ALGASFGGFSVNWLLGHNENNRFKCFVTHDGLSELVSSYSTDELWFPEAEYQGTPTNSEHYQ
KFNPNHVTKWKTPTLVIHGGKDFRLPIAQLTVFTALQRQGVPSKMIVFPEENHWVLKPNQNSML
WYDVTLDWLATWLGQ

Tabla 2.- Secuencias antigénicas predichas para la GH y sus criterios de selección

Rank	Sequence	Start position	Score
1	GFPTREIGKDFENLEQF	804 (A, P)	0.90
1	KRSMPIRPLFYDFSSDE	641 (SC)(H, F, A, P)*	0.90
2	LTSEEHFSANLESFPCNV	259	0.89
3	TFDNSRLTLRCIDNIVWK	64	0.87
3	QLMVGADIGGFRWNCFPE	561 (SA) (NI)	0.87
3	GIQKHAGSWSGDNMSTFE	527 (SA) (H, F)*	0.87

3	PGATHMPSTSEPVVRKWW	418	0.87
4	TQGMIGNALMVAPILHEK	668 (G: SC) (H, F, A, ES, P, TA)*	0.86
4	ANPMVPLWVLGYHQCRWS	299	0.86
5	LAISLRLLMGQSICGQLM	546 (SA) (TA)	0.85
5	RPLNRRSFLFARACFAGI	511 (SA) (A)	0.85
5	WYKGLIEDGVDFWVNDMN	438 (SA) (NI)	0.85

Tabla 3.- Secuencias antigénicas predichas para la DAP y sus criterios de selección

Rank	Sequence	Start position	Score
1	NWLLGHNENNRFKCFVTH	600 (H,F,A)*	0.87
1	WENKGSNTGYVYTKLFVR	191 (H,F,A,P,ES,TA)	0.87
2	GKSTSVLELLEIQSGKII	74	0.86
2	FQDEVLAYLAMTKPGHES	328 (H,F,A,T,P)	0.86
2	FTEARTQNPTFSPFQDEV	315	0.86
2	SCKNRNELLSCSKQLNDE	173	0.86
3	TDSWSYRWNPQLFASQGY	518 (H,F,A)	0.85
3	ANLIHGGPESSFTDSWSY	506	0.85

SC, sitio catalítico; SA, sitio activo; I, inmunogénico; NI, no inmunogénico; H, hidrofobicidad; F, flexibilidad; A, accesibilidad; T, giro; P, polaridad; ES, exposición superficial; TA, tendencia antigénica.

Research Article

Iron-Binding Protein Degradation by Cysteine Proteases of *Naegleria fowleri*

Moisés Martínez-Castillo,¹ Gerardo Ramírez-Rico,^{2,3}
Jesús Serrano-Luna,² and Mineko Shibayama¹

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

²Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Avenida IPN 2508, 07360 Mexico City, Mexico

³Faculty of Professional Studies, Autonomous University of Mexico, Campus Cuautitlán, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico

Correspondence should be addressed to Mineko Shibayama; mineko@cinvestav.mx

Received 22 September 2014; Revised 17 December 2014; Accepted 19 December 2014

Academic Editor: Mehdi Chenik

Copyright © 2015 Moisés Martínez-Castillo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Naegleria fowleri causes acute and fulminant primary amoebic meningoencephalitis. This microorganism invades its host by penetrating the olfactory mucosa and then traveling up the mesaxonal spaces and crossing the cribriform plate; finally, the trophozoites invade the olfactory bulbs. During its invasion, the protozoan obtains nutrients such as proteins, lipids, carbohydrates, and cationic ions (e.g., iron, calcium, and sodium) from the host. However, the mechanism by which these ions are obtained, particularly iron, is poorly understood. In the present study, we evaluated the ability of *N. fowleri* to degrade iron-binding proteins, including hololactoferrin, transferrin, ferritin, and hemoglobin. Zymography assays were performed for each substrate under physiological conditions (pH 7 at 37°C) employing conditioned medium (CM) and total crude extracts (TCEs) of *N. fowleri*. Different degradation patterns with CM were observed for hololactoferrin, transferrin, and hemoglobin; however, CM did not cause ferritin degradation. In contrast, the TCEs degraded only hololactoferrin and transferrin. Inhibition assays revealed that cysteine proteases were involved in this process. Based on these results, we suggest that CM and TCEs of *N. fowleri* degrade iron-binding proteins by employing cysteine proteases, which enables the parasite to obtain iron to survive while invading the central nervous system.

1. Introduction

Naegleria fowleri is a free-living amoeba that causes primary amoebic meningoencephalitis (PAM) in humans. This protozoan gains access to the central nervous system (CNS) by penetrating the olfactory neuroepithelium and migrating through olfactory nerves and reaching the olfactory bulbs [1–5]. Immunohistochemical studies of the early events of infection in a murine model have shown that the amoebae induce intense mucus secretion and an inflammatory reaction in the nasal cavity [6]. At later stages of infection, tissue damage characterized by extensive lytic and necrotic areas, hemorrhage, and cellular debris has been reported.

In hemorrhagic areas, the amoebae have been observed to carry several ingested erythrocytes [7]. The molecular mechanisms employed by *N. fowleri* to process and degrade cells or molecules are poorly studied. However, it is known that, during invasion, *N. fowleri* is able to release proteolytic proteins including naegleriapores A and B, phospholipases, glycosidases, neuraminidase, elastase, and other proteases, such as cathepsin B and mucinases [8–14]. Some of these proteases have been evaluated using *in vitro* systems. These studies evaluated specific human substrates such as IgA, IgG, IgM, collagen, fibronectin, hemoglobin, albumin, mucus, and elastin [2, 12, 13]. Other investigations have analyzed proteins associated with iron. In invasive pathogens such as bacteria,

the acquisition of iron is crucial to division and survival; additionally, previous studies have shown that bacteria can acquire iron from a substantial number of iron-binding proteins, including transferrin, lactoferrin, hemopexin, ferritin, hemoglobin, the hemoglobin/haptoglobin complex, and human serum albumin [15–17]. In some protozoans, such as *Tritrichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, and *Entamoeba histolytica*, the expression of lactoferrin-binding proteins has been described, and these parasites use hololactoferrin as an iron source for *in vitro* growth [18]. Another mechanism involved in the acquisition of iron from lactoferrin has been reported in promastigotes of *Leishmania chagasi*, which use a surface reductase that recognizes and reduces ferric iron to the accessible ferrous form (Fe^{2+}) [19]. Cysteine proteases that cleave lactoferrin have also been reported in *E. histolytica* [20]. In contrast, there is less information regarding iron acquisition in the *Naegleria* genus; consequently, we analyzed the ability of *N. fowleri* to degrade molecules associated with iron. We determined that the proteases released from free-living amoebae were able to degrade iron-binding human proteins, including hololactoferrin, hemoglobin, and holotransferrin, but not ferritin. It is possible that the degradation of iron-binding proteins could play a role in PAM progression in both human and animal models of the disease.

2. Materials and Methods

2.1. Amoebic Cultures. The pathogenic strain *N. fowleri* (ATCC 30808) was used in all experiments. However, to maintain the amoebic virulence, trophozoites were instilled in mice; seven days later, the brains were recovered in Bacto Casitone medium with antibiotics. Finally, the culture was maintained in axenic conditions in 2% (w/v) Bacto Casitone medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Equitech-Bio, USA) at 37°C. The trophozoites were harvested during the exponential growth phase (48 h).

2.2. Sample Preparation. Total crude extracts (TCEs) were obtained as previously described with some modifications [21]. Briefly, *N. fowleri* trophozoites were removed from the culture flask surface by chilling in an ice bath for 20 min, centrifuged at 800 \times g for 10 min, and washed with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2). Subsequently, the trophozoite pellets were incubated at 37°C for 30 min and then disrupted by five freeze-thaw cycles in PBS. The conditioned medium (CM) was prepared according to the following protocol. Six million trophozoites were placed in culture flasks containing 3 mL of fresh Bacto Casitone medium without FBS and incubated at 37°C for 24 h. The supernatant or CM was removed and centrifuged again at 1,500 \times g for 10 min and finally passed through a 0.22 μ m Durapore membrane (Millipore, Bedford, MA). Next, the samples were precipitated with absolute ethanol (J.T. Baker, USA) at a 3 : 1 ratio and stored at –20°C for 2 h, and the CM was centrifuged at 6,000 \times g for 30 min. The protein concentrations of the TCEs and CM were quantified according to the Bradford method [22]; the TCEs and CM were stored at –80°C until use.

2.3. Protease Inhibitors. For the inhibition assays, TCE or CM was preincubated for 1 h at 37°C with protease inhibitors with constant agitation. The inhibitor concentrations were as follows: for cysteine proteases, 10 mM *p*-hydroxymercuribenzoate (pHMB); for serine and cysteine proteases, 5 mM phenyl-methyl sulfonyl fluoride (PMSF); and as a specific serine protease inhibitor, 1 mM aprotinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

2.4. Substrate Gel Electrophoresis. Protease activities were determined by performing electrophoresis of the TCEs and CM in 10% SDS-PAGE copolymerized with bovine hololactoferrin (h-bLf), human hololactoferrin (h-hLf), human hemoglobin (hHb), human holotransferrin (h-hTf), equine ferritin (eqF), and porcine skin gelatin (Pg) as a protease substrate. All of the substrates had a final concentration of 1 mg/mL (Sigma-Aldrich).

To determine the protein patterns of the TCEs and CM, 40 μ g of total protein was loaded per well. For the zymography assay, only 20 μ g of protein was loaded per well. As an experimental control, Bacto Casitone medium was loaded in all assays (25 μ L).

Electrophoresis was performed at 4°C in an ice bath and at a constant voltage (80 V) for 1 h; the gels were washed twice for 30 min with agitation in 2.5% (v/v) Triton X-100 solution (Sigma-Aldrich). The gels were then incubated overnight with 100 mM sodium acetate (pH 5.0), 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), or 100 mM glycine (pH 9.0). All buffers contained 2 mM CaCl_2 with or without 2 mM DTT. Finally, the gels were stained with 0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 for 30 min. Protease activities were identified as clear bands on a blue background. All the assays were performed in triplicate. Inhibition analyses were performed using the ImageJ program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

3. Results

3.1. Proteases Present in Conditioned Medium and Total Crude Extracts in *N. fowleri*. CM (Figure 1) and TCEs (see Supplementary Figure S1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2015/416712>) were separated by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. The CM protein pattern exhibited proteins between 100 and 30 kDa (Figure 1, second lane). We also evaluated the proteolytic activity of CM in 10% PAGE copolymerized with 0.1% porcine gelatin at pH 7 and 37°C. We observed four degradation bands, with calculated MWs of 172, 135, 80, and 60 kDa (Figure 1, lane 3). The Bacto Casitone medium was also analyzed as a control by 10% PAGE copolymerized with 0.1% gelatin; the medium did not produce any degradation bands (Figure 1, lane 4).

3.2. *N. fowleri* Proteases Can Degrade Hololactoferrin. To analyze the ability of *N. fowleri* to degrade iron-binding proteins, we performed zymography assays employing different substrates. We found that both CM and TCE (Supplementary Figures S1 and S2) were able to degrade bovine hololactoferrin (h-bLf) and human hololactoferrin (h-hLf).

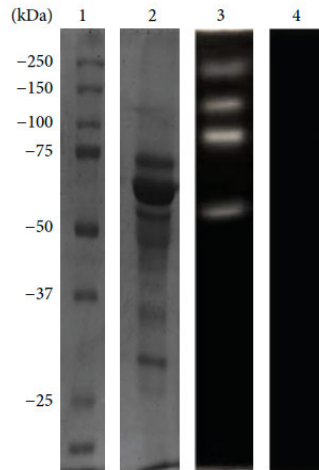


FIGURE 1: Conditioned medium proteins by SDS-PAGE and gelatin-PAGE 10%. Molecular weights (lane 1). Conditioned medium in the SDS-PAGE pattern protein (lane 2), zymogram in 0.1% porcine gelatin (lane 3). Bacto Casitone medium was loaded as a control (lane 4).

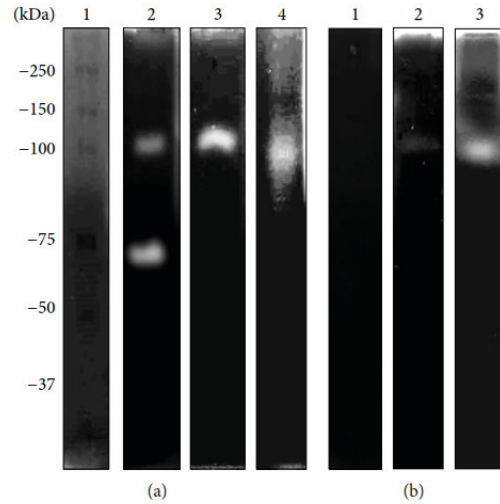


FIGURE 3: Zymography assay in 10% PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) holo-hLf. (a) CM was evaluated at different pHs at 37°C: molecular weight marker (lane 1), pH 5 (lane 2), pH 7 (lane 3), and pH 9 (lane 4). (b) Effects of protease inhibitors evaluated at pH 7 and 37°C: pHMB (lane 1), PMSF (lane 2), and aprotinin (lane 3).

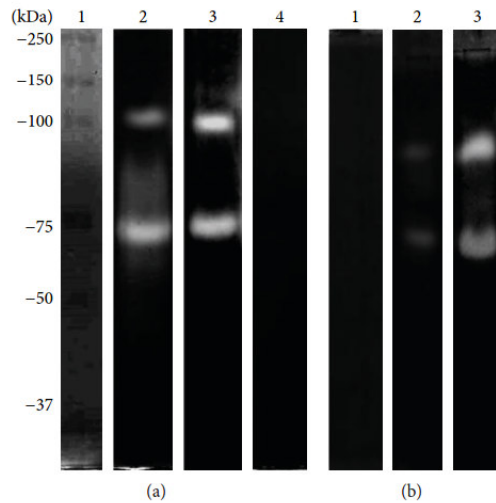


FIGURE 2: Zymography assay in 10% PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) holo-bLf. (a) CM was evaluated at different pHs at 37°C: molecular weight marker (lane 1), pH 5 (lane 2), pH 7 (lane 3), and pH 9 (lane 4). (b) Effects of protease inhibitors evaluated at pH 7 37°C: pHMB (lane 1), PMSF (lane 2), and aprotinin (lane 3).

When CM was analyzed by h-bLf-PAGE at pH 5, two bands, with MWs of 100 and 75 kDa, were observed (Figure 2(a), lane 2); at pH 7, the same proteolytic pattern was found (Figure 2(a), lane 3). At pH 9, no degradation activity was detected (Figure 2(a), lane 4). In the case of h-hLf-PAGE, only two proteolytic bands (MW: 100 and 75 kDa) were found

at pH 5 (Figure 3(a), lane 2) and only one band (100 kDa) was found at pH 7 (Figure 3(a), lane 3). In contrast with h-bLf-PAGE, we observed proteolytic activity at pH 9 and an MW of 100 kDa (Figure 3(a), lane 4). The activity bands of CM with all substrates are summarized in Table 1; those of TCE are given in Table 2.

Additionally, we evaluated whether the proteolytic pattern was produced by cysteine proteases. To elucidate this activity, we performed assays using specific (pHMB), partial (PMSF), and nonspecific (aprotinin) inhibitors of cysteine proteases. As anticipated, in both h-bLf and h-hLf, the degradative activity of CM at pH 7 and 37°C was abrogated only by the specific inhibitor of cysteine proteases, pHMB (Figures 2(b) and 3(b), lane 1). Moreover, we observed partial inhibition with PMSF (Figures 2(b) and 3(b), lane 2), and no effect was found with high concentrations of aprotinin (Figures 2(b) and 3(b), lane 3). Similar assays were performed for TCE, and similar results were obtained with pHMB, which inhibited all protease activities (Supplementary Figures S1 and S2).

3.3. Proteases Present in *N. fowleri* Degrade Human Holotransferrin (*h-hTf*). The results of the h-hTf zymography revealed activities at all the pH levels evaluated. At pH 5, we found one intense band of degradation with an MW of 100 kDa (Figure 4(a), lane 2); activation at pHs 7 and 9 revealed two activities at 180 and 100 kDa, respectively (Figure 4(a), lanes 3 and 4). In this case, we also evaluated the effect of inhibitors in CM and found a result similar to that described for hololactoferrin. Specific inhibition was achieved with cysteine protease inhibitor (pHMB) (Figure 4(b), lane 1).

TABLE 1: Conditioned medium (CM). Locations of bands present in the zymography assays using different substrates: (X) proteases at pH 7; (*) proteases that appear at pH 5 and 9.

MW	Substrate																
	pH	Pg		h-bLf		h-hLf			h-hTf			eqF		hHb			
		7	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9
180										X	*						
172		X															
135		X															
100			*	X		*	X	*	*	X	*						
80		X													*	X	
75			*	X		*											
65															*		
60		X															

TABLE 2: Total crude extract (TCE). Locations of bands present in the zymography assays using different substrates: (X) proteases at pH 7; (*) proteases that appear at pH 5 and 9.

MW	Substrate																
	pH	Pg		h-bLf		h-hLf			h-hTf			eqF		hHb			
		7	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9
150		X	*	X					*								
130		X			*												
100		X	*	X	*	*	X			X							
70		X	*	X													
75									*								
60		X							*	X							
50					*												

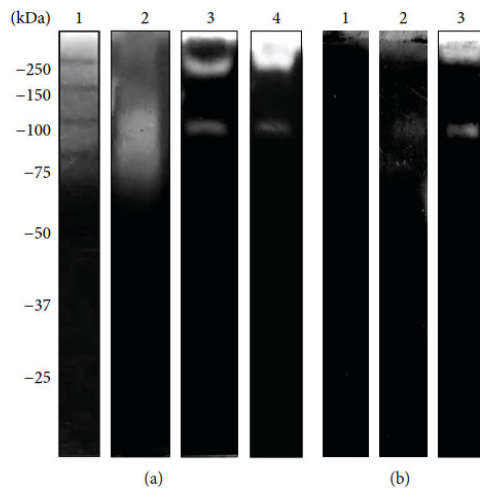


FIGURE 4: Zymography assay in 10% PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) holo-hTf. (a) CM was evaluated at different pHs at 37°C: molecular weight marker (lane 1), pH 5 (lane 2), pH 7 (lane 3), and pH 9 (lane 4). (b) Effects of protease inhibitors evaluated at pH 7 and 37°C: pHMB (lane 1), PMSF (lane 2), and aprotinin (lane 3).

Similarly, we only evaluated the inhibition at a physiological pH and temperature (pH 7; 37°C). In the case of TCE activity, we detected degradation at pHs 5 and 7, and the inhibition was correlated with the results described for CM (Supplementary Figure S3).

3.4. *N. fowleri* Proteases Have No Effect on Ferritin. Ferritin, another iron-storing molecule, was also analyzed. This protein has been used as an indicator of iron availability in humans (liver and serum). To analyze the effect of *Naegleria* proteases on ferritin, we used equine ferritin as a substrate because this protein presents high homology with human ferritin. Interestingly, in the zymograms with ferritin as the substrate, we did not observe any degradation in CM (Figure 5) or TCE (Supplementary Figure S4).

3.5. *N. fowleri* Proteases Can Degrade Hemoglobin. Hemoglobin, a well-known iron-carrier protein that is present in erythrocytes, is another substrate possibly encountered by *N. fowleri* during its invasion process. Consequently, we also copolymerized hemoglobin with acrylamide (hHb-PAGE). The results revealed degradation activity in CM (Figure 6(a)) but not in TCE (Supplementary Figure S5). The degradation bands identified had MWs of 80 and 65 kDa at pH 5 and only one band of 80 kDa at pH 7; no activity was found at pH 9

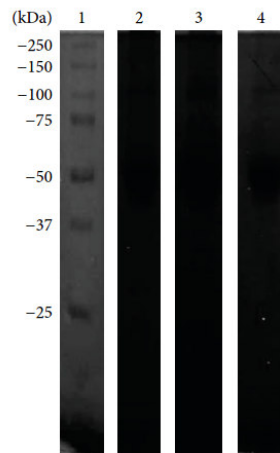


FIGURE 5: Zymography assay in 10% PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) eqF. CM was evaluated at different pHs at 37°C: molecular weight marker (lane 1), pH 5 (lane 2), pH 7 (lane 3), and pH 9 (lane 4).

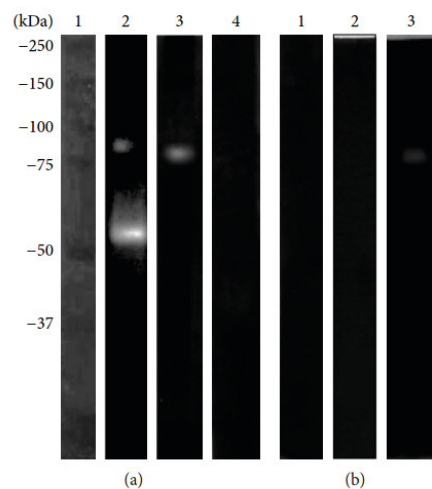


FIGURE 6: Zymography assay in 10% PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) hHb. (a) CM was evaluated at different pHs at 37°C. Molecular weight marker (lane 1), pH 5 (lane 2), pH 7 (lane 3), and pH 9 (lane 4). (b) Effects of protease inhibitors: pHMB (lane 1), PMSF (lane 2), and aprotinin (lane 3).

(Figure 6(a), lanes 2–4). The main inhibition was observed with both pHMB and PMSF (Figure 6(b), lanes 1, 2) but not with aprotinin (Figure 6(b), lane 3).

4. Discussion

In nature, the distribution and proliferation of *N. fowleri* have been associated with the proportion of Fe^{2+} in the vertical

distribution of the water column [23]. However, during the process of invading the nasal cavity, *N. fowleri* encounters an iron-deficient environment and an extracellular glycoprotein of the innate immune response (where the ferric iron is chelated by apolactoferrin) [24, 25]. Additionally, the deficiency of iron in *N. fowleri* cultures has been shown to be responsible for reduced proliferation of the parasite [26]. Furthermore, the addition of molecules that contain iron (e.g., Hb, hemin, and protoporphyrin IX) provides resistance to lysis by complement, increases motility, and induces proliferation in culture [27–29]. However, the mechanism by which *N. fowleri* obtains iron during PAM has not been described.

In the case of the parasitic protozoan *E. histolytica*, several mechanisms (such as receptors and proteases) are used to obtain iron [30]. In this context, we evaluated the ability of *N. fowleri* to degrade iron-binding proteins including hololactoferrin, hemoglobin, holotransferrin, and ferritin. The zymography assays revealed a degradation of the specific substrates; moreover, this strategy allowed us to estimate the molecular weight of the proteases involved in this process.

We observed proteolytic activity in gels copolymerized with both holo-hLf and holo-bLf; this is the first report of *N. fowleri* to demonstrate that this free-living amoeba degrades these proteins. Interestingly, we observed one activity band of 100 kDa conserved in human and bovine holo-Lf. In contrast, the presence of a 75 kDa activity band was predominant in bovine holo-Lf. This slight difference might be due to the homology of human and bovine Lf (69%) [31, 32]. In basal conditions, apolactoferrin is produced by serous cells in the nasal cavity (ratio 200–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [33]; many reports confirm that the apo-Lf concentration increases during microbial infection or tissue damage [34, 35]. The main role of apo-Lf is its iron-chelating activity, and when this occurs, both globular domains of apo-Lf are occupied by iron ions (holo-Lf or h-Lf) [35]. It has recently been reported that *E. histolytica* can ingest human h-Lf; moreover, this protein is transported in acid vesicles. Additionally, the researchers performed PAGE copolymerized with h-hLf to elucidate the type of proteases present in these vesicles and found that total crude extracts of *E. histolytica* contained cysteine proteases; in contrast with our results, they did not observe activity in supernatants [20]. In the case of *N. fowleri*, we identified activity in both CM and TCEs; additionally, when we used ethanol to precipitate CM of *E. histolytica*, we observed bands of degradation (data not shown). These results support the hypothesis that *N. fowleri* can obtain iron by degrading h-hLf. The different patterns of CM degradation of h-hLf and h-bLf may be supported by the difference of homology in the sequence of amino acids in these proteins. The differential degradation by nonsecreted proteases suggests internalization and processing of hLf; unfortunately, little is known about endocytosis and vesicular trafficking in *N. fowleri*. Therefore, it is important to study the effect of h-hLf in *N. fowleri* and also to elucidate the mechanisms of uptake of hHb, h-Tf, and ferritin, which are other important sources of iron in the human body. Human transferrin is mainly synthesized by the liver, although other tissues and organs, such as the brain, are also able to produce transferrin [36, 37]. Both ferritin and transferrin are found

in oligodendrocytes; these cells are present in the optic nerve and in both the gray and white matter of the cerebral cortex, cerebellum, and olfactory bulbs. Astrocytes and glia cells are also positive for ferritin, transferrin, and iron [36, 38, 39]. These brain cells have been described to interact with *N. fowleri* during the later stages of PAM [7, 40]. Therefore, we evaluated whether *N. fowleri* could also degrade these iron-binding proteins, and we observed degradation of holo-hTf by CM and TCE, but these extracts had no effect on ferritin.

The effect of cysteine proteases in ferritin has been demonstrated in bacteria [41], fungi [42], and some protozoa [30, 43]. The differences between CM and TCE may depend on a specific process (endocytosis) or on degradation caused by a wide range of proteases [44]. In the present work, the nondegradation of ferritin was surprising because it is the main iron storage protein in the human body; furthermore, we expected that *N. fowleri* proteases would degrade this protein because *N. gruberi* has been reported to bind ferritin on the cell surface [45]. However, it is possible that coupling ferritin in *N. fowleri* only occurs in a transitory event that culminates in capping formation [2, 46]. Another possible mechanism involved in nondegradation is the high molecular weight of the protein [47].

The hemorrhagic and lytic zones in the brain during PAM progression include the presence of erythrocytes. The phagocytosis of red blood cells has been reported in *N. fowleri* [48, 49]. In erythrocytes, the iron is stored in a ferrous oxide form in the hemoglobin. Certain bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, and *Staphylococcus aureus*, have proteases that degrade Hb [15, 50, 51]. In *S. aureus*, it was reported that, during nasal colonization, invasion depends on the Hb concentration [50]. However, in *E. histolytica*, many studies have investigated erythrophagocytosis and the vesicular process involved in erythrocyte degradation. The proteolysis of red blood cells also includes the participation of cysteine proteases [18, 30, 52, 53]. Recently, in *N. fowleri*, the activity of secretion/excretion proteases against Hb was determined [12]. However, in our study, we evaluated the activity of CM and TCEs under physiological conditions (pH 7 at 37°C) and determined the MW of these hemoglobin proteases.

It is important to mention that in the zymography assays we evaluated the type of proteases involved in the degradation of each substrate evaluated. For this, we employed a cysteine proteases inhibitor, pHMB, serine and partially cysteine protease inhibitor, PMSE, and serine inhibitor, aprotinin [54, 55]. The results showed in all the substrates that the inhibition of proteases activities was mainly with pHMB; these data suggest that *N. fowleri* cysteine proteases are involved in the degradation of iron-binding proteins. Additionally, we evaluated the effect of the conventional E-64 over *N. fowleri* cysteine proteases to discriminate the possible family or clan of proteases [55, 56]. The results with E-64 inhibitor in CM revealed a partial inhibition in the case of holo-bLf and holo-hTf but total inhibition of h-hLf and hHb. In TCE only partial inhibition was observed in holo-bLf and total inhibition for holo-hLf and holo-hTf (data not shown). The results of inhibition suggest that family C1 (cathepsin-like) or clan CA and clan CD could be involved in the iron-binding proteins

degradation [56]. However, it is important to mention that this hypothesis needs to be elucidated and it is subject of another study. Finally, it is important to mention that our research was focused mainly on secretion proteases involved in the invasive process. Thus, it will be important to perform new experiments using TCEs to evaluate the intracellular pathways involved in the degradation process of iron-binding proteins. This could be correlated with the different patterns observed in the CM and TCEs.

5. Conclusion

The present results support the hypothesis that *N. fowleri* can obtain iron during the initial and final stages of PAM. Our findings indicate that the proteases involved in this process vary over a wide range of MWs, from 50 to 150 kDa. Additionally, we hypothesize that *N. fowleri* depends on iron to survive and proliferate during PAM.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to Silvia Galindo-Gómez for her technical assistance in culturing the amoebae. This work was supported by CONACyT Grant no. 128317.

References

- [1] S. Rojas-Hernández, M. A. Rodríguez-Monroy, R. López-Revilla, A. A. Reséndiz-Albor, and L. Moreno-Fierros, "Intranasal coadministration of the CryIAc protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 8, pp. 4368–4375, 2004.
- [2] M. Shibayama, J. D. J. Serrano-Luna, S. Rojas-Hernández, R. Campos-Rodríguez, and V. Tsutsumi, "Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 49, no. 3, pp. 164–170, 2003.
- [3] R. F. Carter, "Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it," *Journal of Pathology*, vol. 100, no. 4, pp. 217–244, 1970.
- [4] K. L. Jarolim, J. K. McCosh, and M. J. Howard, "The role of blood vessels and lungs in the dissemination of *Naegleria fowleri* following intranasal inoculation in mice," *Folia Parasitologica*, vol. 49, no. 3, pp. 183–188, 2002.
- [5] K. L. Jarolim, J. K. McCosh, M. J. Howard, and D. T. John, "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," *Journal of Parasitology*, vol. 86, no. 1, pp. 50–55, 2000.
- [6] S. Rojas-Hernández, A. Jarillo-Luna, M. Rodríguez-Monroy, L. Moreno-Fierros, and R. Campos-Rodríguez, "Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria*

- fowleri* meningoencephalitis in mice," *Parasitology Research*, vol. 94, no. 1, pp. 31–36, 2004.
- [7] I. Cervantes-Sandoval, J. D. J. Serrano-Luna, E. García-Latorre, V. Tsutsumi, and M. Shibayama, "Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis," *Parasitology International*, vol. 57, no. 3, pp. 307–313, 2008.
- [8] R. M. Hysmith and R. C. Franson, "Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 711, no. 1, pp. 26–32, 1982.
- [9] S. Das, A. K. Saha, T. A. Nerad et al., "Partial purification and characterization of *Naegleria fowleri* β -glucosidase," *The Journal of Protozoology*, vol. 34, no. 1, pp. 68–74, 1987.
- [10] A. Ferrante and E. J. Bates, "Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp.," *Infection and Immunity*, vol. 56, no. 12, pp. 3320–3321, 1988.
- [11] R. Herbst, C. Ott, T. Jacobs, T. Marti, F. Marciano-Cabral, and M. Leippe, "Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 25, pp. 22353–22360, 2002.
- [12] J. Lee, J.-H. Kim, H.-J. Sohn et al., "Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties," *Parasitology Research*, vol. 113, no. 8, pp. 2765–2776, 2014.
- [13] I. Cervantes-Sandoval, J. D. J. Serrano-Luna, E. García-Latorre, V. Tsutsumi, and M. Shibayama, "Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion," *Microbiology*, vol. 154, no. 12, pp. 3895–3904, 2008.
- [14] D. Eisen and R. C. Franson, "Acid-active neuraminidases in the growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and in sonicates of rabbit alveolar macrophages," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 924, no. 2, pp. 369–372, 1987.
- [15] E. P. Skaar, "The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 8, Article ID e1000949, 2010.
- [16] A. Morgenthau, A. Pogoutse, P. Adamiak, T. F. Moraes, and A. B. Schryvers, "Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: molecular mechanisms and role in host-microbe interactions," *Future Microbiology*, vol. 8, no. 12, pp. 1575–1585, 2013.
- [17] P. W. Whitby, T. M. VanWagoner, J. M. Springer, D. J. Morton, T. W. Seale, and T. L. Stull, "*Burkholderia cenocepacia* utilizes ferritin as an iron source," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 55, no. 6, pp. 661–668, 2006.
- [18] G. Ortiz-Estrada, S. Luna-Castro, C. Piña-Vázquez et al., "Iron-saturated lactoferrin and pathogenic protozoa: could this protein be an iron source for their parasitic style of life?" *Future Microbiology*, vol. 7, no. 1, pp. 149–164, 2012.
- [19] M. E. Wilson, R. W. Vorhies, K. A. Andersen, and B. E. Britigan, "Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*," *Infection and Immunity*, vol. 62, no. 8, pp. 3262–3269, 1994.
- [20] N. León-Sicaïros, M. Reyes-López, A. Canizalez-Román et al., "Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*," *Microbiology*, vol. 151, no. 12, pp. 3859–3871, 2005.
- [21] J. Serrano-Luna, I. Cervantes-Sandoval, V. Tsutsumi, and M. Shibayama, "A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*," *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 54, no. 5, pp. 411–417, 2007.
- [22] M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 248–254, 1976.
- [23] D. E. Kyle and G. P. Noblet, "Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes," *Journal of Protozoology*, vol. 32, no. 1, pp. 99–105, 1985.
- [24] J. K. Actor, S.-A. Hwang, and M. L. Kruzel, "Lactoferrin as a natural immune modulator," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, no. 17, pp. 1956–1973, 2009.
- [25] A. J. Psaltis, M. A. Bruhn, E. H. Ooi, L. W. Tan, and P.-J. Wormald, "Nasal mucosa expression of lactoferrin in patients with chronic rhinosinusitis," *The Laryngoscope*, vol. 117, no. 11, pp. 2030–2035, 2007.
- [26] A. L. Newsome and W. E. Wilhelm, "Inhibition of *Naegleria fowleri* by microbial iron-chelating agents: ecological implications," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 45, no. 2, pp. 665–668, 1983.
- [27] S. G. Bradley, D. M. Toney, Y. Zhang, and F. Marciano-Cabral, "Dependence of growth, metabolic expression, and pathogenicity of *Naegleria fowleri* on exogenous porphyrins," *The Journal of Parasitology*, vol. 82, no. 5, pp. 763–768, 1996.
- [28] R. N. Band and W. Balamuth, "Hemin replaces serum as a growth requirement for *Naegleria*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 28, no. 1, pp. 64–65, 1974.
- [29] A. L. Newsome and W. E. Wilhelm, "Effect of exogenous iron on the viability of pathogenic *Naegleria fowleri* in serum," *Experientia*, vol. 37, no. 11, pp. 1160–1162, 1981.
- [30] F. López-Soto, N. León-Sicaïros, M. Reyes-López et al., "Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 9, no. 6, pp. 1038–1050, 2009.
- [31] M. W. Rey, S. L. Woloshuk, H. A. De Boer, and F. R. Pieper, "Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin," *Nucleic Acids Research*, vol. 18, no. 17, p. 5288, 1990.
- [32] A. Pierce, D. Colavizza, M. Benaïssa et al., "Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin," *European Journal of Biochemistry*, vol. 196, no. 1, pp. 177–184, 1991.
- [33] H. Riechelmann, T. Deutsche, E. Friemel, H. J. Gross, and M. Bachem, "Biological markers in nasal secretions," *European Respiratory Journal*, vol. 21, no. 4, pp. 600–605, 2003.
- [34] C. Fillebeen, L. Descamps, M.-P. Dehouck et al., "Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 11, pp. 7011–7017, 1999.
- [35] P. P. Ward, E. Paz, and O. M. Conneely, "Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 22, pp. 2540–2548, 2005.
- [36] J. R. Connor, S. L. Menzies, S. M. St. Martin, and E. J. Mufson, "Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 27, no. 4, pp. 595–611, 1990.
- [37] J. Fleming and J. G. Joshi, "Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 22, pp. 7866–7870, 1987.
- [38] S. A. Benkovic and J. R. Connor, "Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 338, no. 1, pp. 97–113, 1993.
- [39] A. Jane, I. Roskams, and J. R. Connor, "Iron, transferrin, and ferritin in the rat brain during development and aging," *Journal of Neurochemistry*, vol. 63, no. 2, pp. 709–716, 1994.

- [40] A. J. Martinez, E. C. Nelson, and R. J. Duma, "Animal model of human disease. Primary amebic meningoencephalitis, *Naegleria meningoencephalitis*, CNS protozoal infection," *The American Journal of Pathology*, vol. 73, no. 2, pp. 545–548, 1973.
- [41] A. Sroka, M. Sztukowska, J. Potempa, J. Travis, and C. A. Genco, "Degradation of host heme proteins by lysine- and arginine-specific cysteine proteinases (gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*," *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 19, pp. 5609–5616, 2001.
- [42] A. H. T. Hissen, J. M. T. Chow, L. J. Pinto, and M. M. Moore, "Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 3, pp. 1402–1408, 2004.
- [43] J. F. Alderete, K. M. Peterson, and J. B. Baseman, "Affinities of *Treponema pallidum* for human lactoferrin and transferrin," *Genitourinary Medicine*, vol. 64, no. 6, pp. 359–363, 1988.
- [44] M. Sajid and J. H. McKerrow, "Cysteine proteases of parasitic organisms," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 120, no. 1, pp. 1–21, 2002.
- [45] C. A. King and T. M. Preston, "Studies of anionic sites on the cell surface of the amoeba *Naegleria gruberi* using cationized ferritin," *Journal of Cell Science*, vol. 28, pp. 133–149, 1977.
- [46] A. Ferrante and Y. H. Thong, "Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*," *International Journal for Parasitology*, vol. 9, no. 6, pp. 599–601, 1979.
- [47] E. C. Theil, "Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 56, pp. 289–315, 1987.
- [48] M. Scaglia, S. Gatti, R. Brustia, G. Chichino, and E. G. Rondanelli, "Phagocytosis of human erythrocytes by *Naegleria* is not related to species pathogenicity. A phase-contrast cinematographic study," *Microbiologica*, vol. 14, no. 1, pp. 45–53, 1991.
- [49] P. Alonso and E. Zubiaur, "Phagocytic activity of three *Naegleria* strains in the presence of erythrocytes of various types," *Journal of Protozoology*, vol. 32, no. 4, pp. 661–664, 1985.
- [50] M. Pynnonen, R. E. Stephenson, K. Schwartz, M. Hernandez, and B. R. Boles, "Hemoglobin promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization," *PLoS Pathogens*, vol. 7, no. 7, Article ID e1002104, 2011.
- [51] A. B. Vermelho, M. N. L. Meirelles, A. Lopes, S. D. G. Petinate, A. A. Chaia, and M. H. Branquinha, "Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 91, no. 6, pp. 755–760, 1996.
- [52] D. Talamás-Lara, B. Chávez-Munguía, A. González-Robles et al., "Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: a comparative study," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 626259, 10 pages, 2014.
- [53] V. Tsutsumi, A. Ramírez-Rosales, H. Lanz-Mendoza et al., "*Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 86, no. 2, pp. 170–172, 1992.
- [54] A. J. Barrett, "Classification of peptidases," *Methods in Enzymology*, vol. 244, pp. 1–15, 1994.
- [55] H. J. Atkinson, P. C. Babbitt, and M. Sajid, "The global cysteine peptidase landscape in parasites," *Trends in Parasitology*, vol. 25, no. 12, pp. 573–581, 2009.
- [56] J. C. Mottram, M. J. Helms, G. H. Coombs, and M. Sajid, "Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa," *Trends in Parasitology*, vol. 19, no. 4, pp. 182–187, 2003.

ORIGINAL ARTICLE

***Acanthamoeba castellanii* Proteases are Capable of Degrading Iron-Binding Proteins as a Possible Mechanism of Pathogenicity**

Gerardo Ramírez-Rico^{a,1}, Moisés Martínez-Castillo^b, Mireya de la Garza^a, Mineko Shibayama^b & Jesús Serrano-Luna^a

a Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07360 México, Distrito Federal, México

b Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07360, México, Distrito Federal, México

Keywords

Cysteine proteases; ferritin; free-living amoebae; hemoglobin; holo-lactoferrin; transferrin; virulence.

Correspondence

J. Serrano-Luna, Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07360 México, DF, México
Telephone number: +52 55 57-47-38-00;
FAX number: +52 55 57-47-33-93;
e-mail: jjserrano07@yahoo.com.mx

Received: 14 August 2014; revised 9 December 2014; accepted January 19, 2015.

doi:10.1111/jeu.12215

ABSTRACT

Acanthamoeba castellanii, a free-living amoeba, is an amphizoic organism that can behave as an opportunistic pathogen, causing granulomatous amoebic encephalitis in immunocompromised patients or infecting immunocompetent individuals via cutaneous lesions, sinusoidal infections, or amoebic keratitis. Therefore, this amoeba could be in contact with different iron-binding proteins, such as lactoferrin in tears and mucosa and transferrin and hemoglobin in blood. Iron is a vital and necessary element for host metabolism but also for parasite survival. Accordingly, parasites have developed iron uptake mechanisms, one of which is the utilization of proteases to degrade host iron-binding proteins. In this work, we performed a partial biochemical characterization of *A. castellanii* proteases at different pHs and utilizing protease inhibitors with 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and copolymerized with different iron-binding proteins. We describe for the first time the presence of several cysteine proteases in a total *A. castellanii* crude extract and in conditioned culture medium precipitated with ethanol. These amoebic peptidases degraded human holo-lactoferrin, holo-transferrin, hemoglobin, and horse spleen ferritin; some of these proteases were substrate specific, and others degraded multiple substrates. These proteases could be considered virulence factors that promote iron acquisition from the host.

AMOEBA is a general term that is used for protists of a large and diverse assemblage of eukaryotes that are characterized by various types of pseudopodia. Some amoebae are pathogenic and even parasitic to humans and other vertebrate hosts (Pawłowski and Burki 2009; Roger and Hug 2006). *Acanthamoeba* spp. are responsible for opportunistic and nonopportunistic infections in humans and in other animals. *Acanthamoeba castellanii*, which belongs to the supergroup Amoebozoa, is a free-living amoeba (i.e., mitochondrion-bearing aerobic organisms that can complete their respective life cycles in the environment without a host); therefore, these organisms have been termed amphizoic amoebae in recognition of their ability to live endozoaically (Visvesvara et al. 2007).

Acanthamoeba spp. are protists that are ubiquitously distributed throughout the environment. These organisms have two stages in their life cycle: an active trophozoite stage that exhibits vegetative growth and a dormant cyst stage that has minimal metabolic activity. *Acanthamoeba* can behave as opportunistic pathogens: they cause granulomatous amoebic encephalitis in immunocompromised patients or can infect immunocompetent individuals via cutaneous lesions, sinusoidal infections, or amoebic keratitis (Khan 2006; Marciano-Cabral and Cabral 2003).

One of the main virulence factors described for *A. castellanii* is protease activity, which may play a significant role in cytolytic mechanisms. Amoebae produce a variety of proteases, including serine proteases (Hadas and Mazur

1993; Mitra et al. 1995; Serrano-Luna et al. 2006), contact-dependent metalloproteases (Khan et al. 2000), elastases (Ferrante and Bates 1988), cysteine and serine proteases (Hadas and Mazur 1993), and cytotoxic proteases induced by mannose-mediated adhesion that can contribute to the damage of corneal tissue (Leher et al. 1998).

Iron is the fourth most abundant metal in the Earth's crust, representing nearly 5% of all metals in the crust. Although iron is a vital element for nearly all living organisms, it can form oxygen-free radicals; therefore, it is bound to proteins to prevent tissue damage. In mammals, iron is an enzyme cofactor and is a component of hemo-proteins. For example, most iron ions are stored intracellularly in ferritin or as part of hemoglobin (Hb), the most abundant iron-binding protein in nature due to iron's role as an oxygen carrier. In addition, iron is sequestered by proteins such as the iron-transporter transferrin (Tf) in serum and the iron-withholding defense protein lactoferrin (Lf) in mucosae. Thus, the free ionic iron concentration ($\sim 10^{-18}$ M) is far too low to sustain the growth of pathogens (Bullen et al. 1978).

One of the main mechanisms for obtaining iron from a host is the protease degradation of iron-binding proteins such as Tf (Reyes-López et al. 2011), holo-Lf (León-Sicairos et al. 2005), ferritin (López-Soto et al. 2009), and Hb (Serrano-Luna et al. 1998). However, only a few reports have described the protozoan proteases that degrade iron-binding proteins. Thus, the aim of this study was to identify and biochemically characterize the *A. castellanii* proteases that degrade iron-binding proteins to uncover their possible mechanisms in pathogenicity.

MATERIALS AND METHODS

Amoebae and culture condition

Acanthamoeba castellanii trophozoites isolated from human cases of amoebic keratitis were kindly provided by Dr. Simon Kilvington (Public Health Laboratory, Bath, UK). The trophozoites were cultured at 37 °C in Chang's liquid medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Equitech-Bio, Kerrville, TX) according to a modified technique (Rivera et al. 1984) and were harvested during the logarithmic growth phase, usually 48 h after subculture.

Preparation of cell lysates and conditioned medium

Trophozoites were detached from the surface of culture tubes by chilling the tubes in an ice bath, centrifuging at 500 g for 10 min, and washing twice with phosphate-buffered saline (pH 7.2). Crude extracts were prepared by lysing the trophozoites with 10 freeze-thaw cycles, and the protein contents were quantified using Bradford's method (Bradford 1976). Six million trophozoites were transferred to culture flasks containing 5 ml of fresh Chang's medium without FBS and incubated at 30 °C for 24 h. The trophozoites were chilled on ice for 15 min and centrifuged for

10 min at 500 g. The conditioned medium (CM) from this *A. castellanii* culture was collected, centrifuged at 1,500 g for 10 min, and filtered through a 0.22 µm Durapore (Millipore, Bedford, MA) membrane. The supernatant was then precipitated with absolute ethanol (3:1, v/v), as described (Luna-Castro et al. 2014), and the CM was collected only after determining the trophozoite viability, which was determined to be 99% of the original 6×10^6 trophozoites, using the trypan blue exclusion technique. The protein content of the CM was quantified using Bradford's method (Bradford 1976), and the CM was stored at -70 °C until use.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

To determine differences between the proteolytic patterns, the total crude extract, and CM were incubated with protease inhibitors (complete; Roche, Rotkreuz, Switzerland) and separated by molecular weight (MW) using 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the Laemmli method (Laemmli 1970). A 30 µg sample of amoebic total crude protein extract and 30 µg of CM were loaded, both of which had been dissolved in 10 µl of sample buffer and boiled (95 °C) for 10 min. Electrophoresis was performed at a constant voltage (80 V) for 2 h. Afterward, the gels were stained with 0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 for 30 min and then destained with 45% methanol, 10% acetic acid, and 45% deionized water solution until the protein patterns were clearly visualized; the gels were stored in 10% acetic acid.

Detection of protease activities in SDS gels copolymerized with iron-containing proteins as substrates

The protease activities from the amoebic crude extract and culture medium were analyzed using 10% SDS-PAGE gels copolymerized with 0.1% of the following substrates: human holo-lactoferrin (Hholo-Lf), hemoglobin (HHb), holo-transferrin (Hholo-Tf), or horse spleen ferritin (HsF). The gels were loaded with 15 µg of total crude extract protein or with 10 µg of *A. castellanii* CM and then electrophoresed at 4 °C in an ice bath and at a constant voltage (80 V) for 3 h. Subsequently, the gels were washed twice for 30 min with agitation in 2.5% (v/v) Triton X-100 solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and then incubated overnight with one of the following buffer solutions (activation buffers): 100 mM sodium acetate (pH 5.0), 100 mM Tris-OH (pH 7.0), or 100 mM glycine (pH 9.0); all buffers contained 2 mM CaCl_2 . The gels were incubated at 37 °C and stained with 0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 for 30 min.

Effect of inhibitors on proteolytic activity

Prior to the addition of sample buffer, inhibitors (i.e., 10 mmol/L *p*-hydroxymercuribenzoic acid [PHMB] or

10 $\mu\text{mol/L}$ *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido [4-guanidino] butane [E-64] for cysteine proteases and 10 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] or 10 $\mu\text{mol/L}$ aprotinin for serine proteases) were added to the samples, and the mixtures were incubated for 1 h at room temperature. The use of these inhibitors for these types of proteases has been characterized in this protozoan. Electrophoresis was performed at pH 7.0 as described above.

RESULTS

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Acanthamoeba castellanii total crude extract and CM proteins were separated by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue, which showed that the crude extract and CM exhibited different protein patterns, as shown in Fig. 1.

Effect of pH on *A. castellanii* protease patterns in 10% SDS-PAGE substrate gels

To determine whether *A. castellanii* crude extract and CM degraded different iron-binding proteins, such as Hholo-Lf, Hholo-Tf, HHb, and HsF, 10% SDS-PAGE using gels copolymerized with each of the substrates and at different pHs (5.0, 7.0, and 9.0) was performed at 37 °C. Different proteolytic patterns between the total crude extract and CM in the presence of each substrate at different pHs were observed (Table 1).

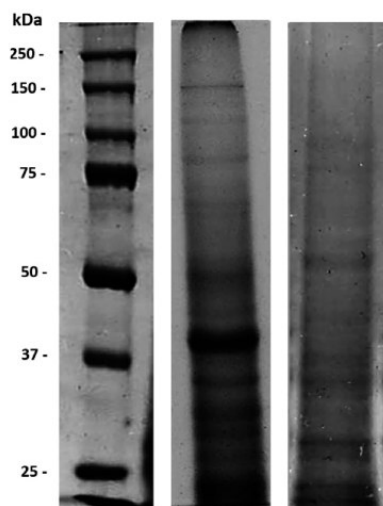


Figure 1 10% SDS-PAGE of *Acanthamoeba castellanii* crude extract (1) and CM (2).

When we assayed the substrate Hholo-Lf, we found similar proteolytic activities at MWs of 56.6, 100, and 120 kDa in the crude extract at pH 5.0, 7.0, and 9.0 (Fig. 2A, lanes 1, 2, and 3, respectively). For the CM, we observed only two proteolytic bands at 60.2 and 100 kDa for all assayed pHs (Fig. 2A, lanes 3, 4 and 5, respectively). One proteolytic band at 100 kDa was shared between the crude extract and CM at all pHs.

When Hholo-Tf was used as the copolymerized substrate, four proteolytic bands at 50, 56, 100, and 120 kDa were observed at different pHs (5.0, 7.0, and 9.0) at 37 °C in the total crude extract (Fig. 2B, lanes 1, 2, and 3, respectively). For amoebic CM at pH 5.0, 7.0, and 9.0, four proteolytic bands at 50, 56, 73.2 and 100 kDa were observed (Fig. 2B, lanes 4, 5 and 6, respectively). The proteases at 50, 56, and 100 kDa were found in both the total crude extract and CM, but the 56 and 100 kDa proteases showed stronger activity than those corresponding to the total crude extract.

Human Hb was also assayed as a possible substrate for *A. castellanii* proteases. The MWs of the proteases in the total crude extract at pH 5.0, 7.0, and 9.0 were 50, 56.5, and 100 kDa (Fig. 2C, lanes 1, 2, and 3, respectively), and an additional protease at 150 kDa was observed at pH 9.0 (Fig. 2C, lane 3). In contrast, in the CM, four proteases at 64.5, 72.8, 120.5, and 250 kDa were observed at pH 5.0, 7.0, and 9.0; an additional proteolytic band at 56.5 kDa appeared at pH 7.0. It is noteworthy that the proteolytic pattern of the total crude extract was completely different from that of the CM.

The possible degradation of HsF, the main storage iron protein in mammals, by *A. castellanii* was also investigated. We found three bands of 44.2, 50, and 100 kDa in the total crude extract at pH 5.0 and 7.0, and these bands were less intense at pH 9.0 (Fig. 2D, lanes 1, 2, and 3, respectively). The proteolytic pattern of the CM was very similar to that of the amoebic total crude extract for all tested pHs (Fig. 2D, lanes 4, 5, and 6).

Effect of protease inhibitors on *A. castellanii* proteolytic activity in SDS-PAGE substrate gels

We then used cysteine and serine protease inhibitors to determine the nature of the various proteases that act on iron-binding proteins. Interestingly, all *A. castellanii* proteolytic activities that were observed in the total crude extract and CM for all substrates were inhibited by PHMB (Tables 2, 3).

When we analyzed proteolytic inhibition using Hholo-Lf as the substrate, we found that PHMB completely inhibited the amoebic proteases in both the total crude extract and CM (Fig. 3A, lanes 4 and 8; Tables 2, 3). We also found partial protease inhibition by PMSF, aprotinin, and E-64 (Fig. 3A, lanes 1–3, 5–7; Tables 2, 3) for both the total crude extract and CM.

When Hholo-Tf was used as the substrate, we found that PHMB was able to completely inhibit all proteolytic bands in both the total crude extract and CM (Fig. 3B, lanes 4 and 8; Tables 2, 3), and we found partial inhibition

Table 1. Molecular weights of *Acanthamoeba castellanii* proteases in the presence of different substrates and at different pHs

	Crude extracts (kDa)			Conditioned medium (kDa)		
	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
Human holo-lactoferrin	56.6, 100, 120	56.6, 100, 120	56.6, 100, 120	60.2, 100	60.2, 100	60.2, 100
Human holo-transferrin	50, 56, 100, 120	50, 56, 100, 120	50, 56, 100, 120	50, 56, 73.2, 100	50, 56, 73.2, 100	50, 56, 73.2, 100
Human hemoglobin	50, 56.5, 100	50, 56.5, 100	50, 56.5, 100, 150	64.5, 73, 120.5, 250	64.5, 73, 120.5, 250	64.5, 73, 120.5, 250
Horse spleen ferritin	44.2, 50, 100	44.2, 50, 100	44.2, 50, 100	38, 50, 100	38, 50, 100	38, 50, 100

of the proteolytic bands in the total crude extract by PMSF, aprotinin, and E-64 (Fig. 3B, lanes 1–3; Table 2). We observed also that PMSF, E-64, and aprotinin had a partial inhibition of the protease pattern in the CM (Fig. 3B, lanes 5 and 7; Table 3).

For HHb, we observed the same inhibition of the proteolytic pattern by PHMB as found for Hholo-Lf and Hholo-Tf for both the total crude extract and CM, although the patterns were somewhat different from those on the above-mentioned substrates (Fig. 3C, lanes 4 and 8; Tables 2, 3). On HHb, the proteolytic bands at 50 and 56.5 kDa in the total crude extract were partially inhibited by PMSF, aprotinin, and E-64 (Fig. 3C, lanes 1–3; Table 2), but the band at 100 kDa was not inhibited by any of these protease inhibitors (Fig. 3C, lanes 1–3; Table 2). In contrast, we observed total inhibition of the CM proteases by PMSF (Fig. 3C, lane 5; Table 3), but we observed no inhibition by aprotinin or E-64 (Fig. 3C, lanes 6 and 7; Table 3).

Finally, we evaluated the ability of protease inhibitors to inhibit *A. castellanii* proteases using HsF as a substrate. Again, we found that PHMB inhibited all proteolytic activities in the total crude extract and CM (Fig. 3D, lanes 4 and 8; Tables 2, 3). When E-64 was used, we observed an almost complete inhibition of the proteolytic patterns in both the total crude extract and CM (Fig. 3D, lanes 3 and 7; Tables 2, 3). However, we found scarce inhibition of the proteases by PMSF and aprotinin in the total crude extract and CM (Fig. 3D, lanes 1, 2, 5, and 6; Tables 2, 3).

DISCUSSION

The ability of *Acanthamoeba* to produce serious human infections, as these organisms are associated with an increased number of immunocompromised patients and contact lens wearers, as well as their potential role in ecosystems, and their ability to act as hosts/reservoirs for microbial pathogens has generated great interest in their study from a clinical perspective (Kinde et al. 2007; Taylor 1977).

Amoebic keratitis is a chronic progressive infection that remains unresolved without effective chemotherapy. Moreover, failure to control this infection can lead to per-

manent vision loss (Ledee et al. 1996). Parasite adhesion to the host cell is a primary step that is mediated by different adhesion molecules, one of these molecules 130 kDa mannose-binding protein (Garate et al. 2004), and the initial binding of the parasite leads to secondary events, such as phagocytosis (Omaña-Molina et al. 2010) and toxin production (Sissons et al. 2005). The neuraminidase activities of *Acanthamoeba* could be relevant to the colonization of the parasite in both amoebic keratitis and meningoencephalitis (Pellegrin et al. 1992). Another virulence factor is the presence of amoebic hydrolytic enzymes, such as elastases (Ferrante and Bates 1988), phospholipases (Mortazavi et al. 2011), serine and cysteine proteases (Hadas and Mazur 1993; Mitra et al. 1995; Serrano-Luna et al. 2006) and contact metalloproteases (Khan et al. 2000).

Iron is an important cofactor for metabolism in all living organisms. Due to the low concentration of free iron in body fluids, pathogenic microorganisms have developed the ability to obtain iron from the iron-containing proteins, such as holo-Lf, holo-Tf, Hb, and ferritin, of their hosts. This ability has been described as a virulence factor because it permits pathogen multiplication inside the host (Otto et al. 1992; Wooldridge and Williams 1993). Indeed, pathogens have developed several mechanisms for survival and host colonization, including siderophores, hemophores, membrane receptors to iron-containing proteins, and proteases (Weinberg 2003).

In this study, we demonstrated the presence of different *A. castellanii* proteolytic enzymes that are able to degrade iron-binding proteins and are relevant to the host, e.g., Hholo-Lf, Hholo-Tf, HHb, and HsF. The proteases found in both the total crude extract and CM showed high activity toward all of the tested substrates within a wide range of pHs (5.0–9.0) at 37 °C. Some of the proteases were specific for a substrate, such as a 60.2 kDa protein that degraded only Hholo-Lf and the proteolytic bands at 64.5, 150, and 250 kDa that only degraded HHb. Finally, proteases with MWs of 38 and 44.2 kDa appeared to be specific for HsF. However, some amoebic proteolytic enzymes, such as that at 100 kDa, were active toward all assayed substrates.

On the basis of our results using protease inhibitors with the above-mentioned substrates, we suggest that

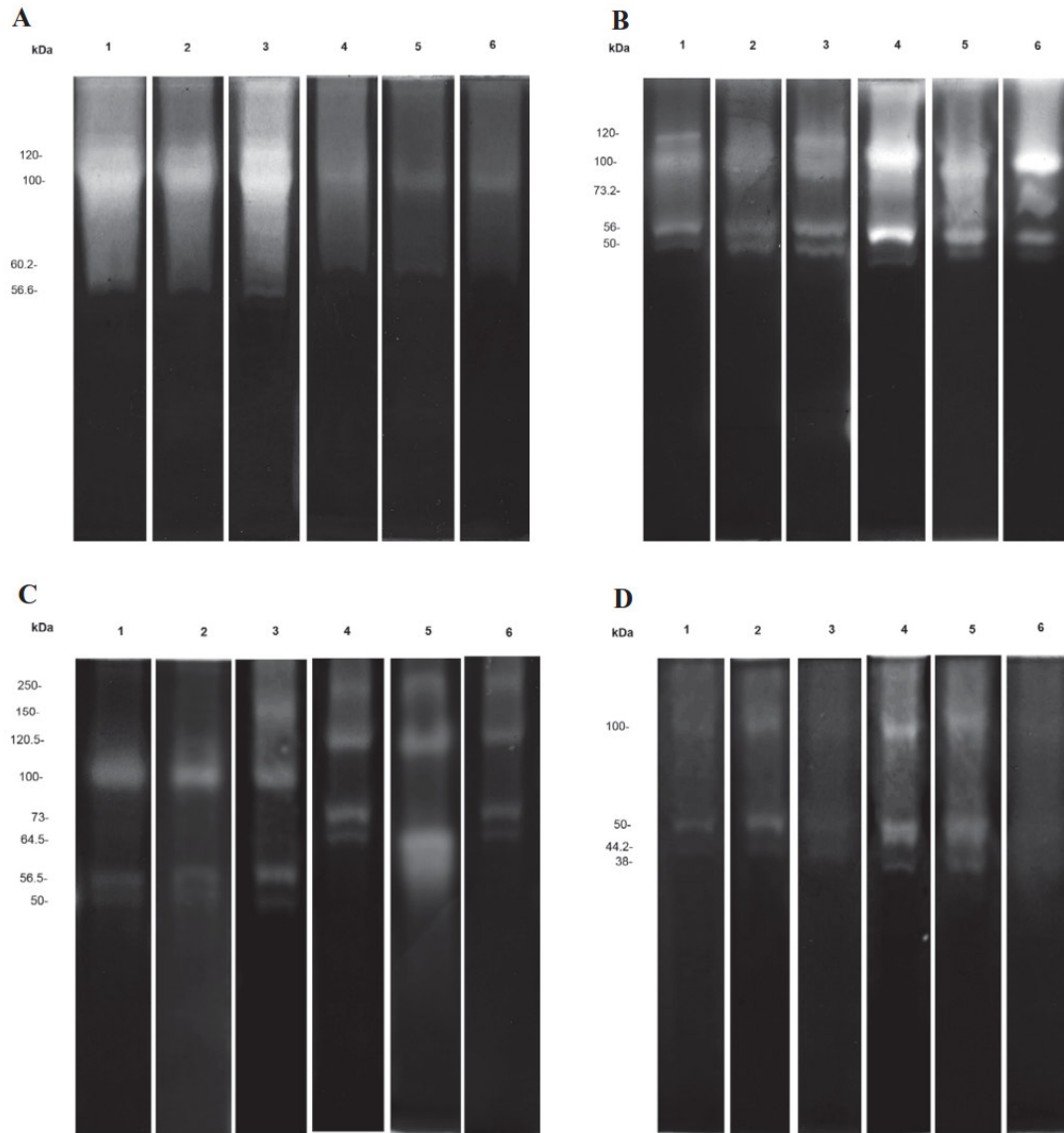


Figure 2 Effect of pH on *Acanthamoeba castellanii* zymograms in 10% SDS-PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) different iron-binding proteins. Crude extracts (lane 1–3) and CM (lane 4–6) at pH 5 (lane 1 and 4), pH 7 (lane 2 and 5), pH 9 (lane 3 and 6). **A.** SDS-PAGE copolymerized with Hholo-Lf. **B.** SDS-PAGE copolymerized with Hholo-Tf. **C.** SDS-PAGE copolymerized with HHb. **D.** SDS-PAGE copolymerized with HsF.

cysteine proteases represent the main proteolytic activities in *A. castellanii* under these conditions because all of the proteolytic patterns of the total crude extract and CM were completely inhibited by PHMB and partly inhibited by E-64, both of which are cysteine protease inhibitors.

Interestingly, the amoebic proteases were also partially inhibited by PMSF, which is a serine protease inhibitor. In our experiments, we used another serine protease inhibitor, aprotinin, but this inhibitor had no effect on the proteolytic pattern, even at a high concentration (10 μ M). It is

Table 2. Effect of inhibitors in proteolytic bands of total crude extracts

Substrate Inhibitor	Bands of <i>Acanthamoeba castellanii</i> total crude extracts (kDa)												
	Hholo-Lf			Hholo-Tf				HHb			HsF		
	56.5	100	120	50	56	100	120	50	56.5	100	44.2	50	100
PMSF	+	++	++	++	++	++	++	++	++	-	+	-	-
Aprotinin	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
E-64	+	+	+	+	+	+	+	++	-	-	+	+	+
PHMB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Crude extracts: serine proteases inhibitors: PMSF and aprotinin; cysteine proteases inhibitor, E-64 and PHMB. Symbols means: +++ (100% to 75% of inhibition); ++ (75% to 50% of inhibition); + (50% to 25% of inhibition); - (25% to 0% of inhibition).

Table 3. Effect of inhibitors in proteolytic bands of conditioned medium

Substrate Inhibitor	Bands of <i>Acanthamoeba castellanii</i> CM (kDa)												
	Hholo-Lf			Hholo-Tf				HHb			HsF		
	60.2	100	50	56	73.2	100	64.5	72.8	120.5	250	38	50	100
PMSF	++	++	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Aprotinin	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-64	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	+	+	+
PHMB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Serine protease inhibitors, PMSF and aprotinin, and cysteine protease inhibitors, E-64 and PHMB. Symbols: +++ (100% to 75% inhibition); ++ (75% to 50% inhibition); + (50% to 25% inhibition); - (25% to 0% inhibition).

known that PMSF besides inhibit serine proteases it also inhibits cysteine peptidase as opposed to aprotinin, which is a competitive serine protease inhibitor which forms stable complexes with the active site of the enzymes and also blocks them. Aprotinin cannot be regarded as general reagent for the serine peptidases, because it is more selective for endopeptidases of the chymotrypsin family (Barrett 1994; García-Carreño 1992).

It is reported in the literature that serine proteases are the main proteases present in gelatin gels and are inhibited by PMSF and aprotinin (Serrano-Luna et al. 2006), and it has been described that cysteine proteases and metalloproteases are present in reduced proportions in gelatin gels (Hadas and Mazur 1993). However, cysteine protease activities related to *A. castellanii* encystment have recently been found (Lee et al. 2013; Leitsch et al. 2010; Moon et al. 2012). We searched the peptidase database MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) and found the following several *A. castellanii* cysteine proteases, which had similar MWs as those found in our study (Table 1): 38.570 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8H5N3>), 38.520 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8GXX7>), 44.822 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8H3R5>), 50.249 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8T6A6>), 50.320 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8HAS3>), 56.984 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8HA64>), 61.820 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8H8J9>), 102.942 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8H1Q6>), 129.525 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/L8H2X5>).

We suggest that the proteases that degrade iron-binding proteins belong to the cysteine protease family and that they belong to the clan CD because clan CD peptidases are unaffected by the 'classical' cysteine peptidase inhibitor E-64. The reason for this insensitivity is the strict substrate specificity of clan CD enzymes (Mottram et al. 2003), which supports our findings. However, it is necessary to perform more experiments to elucidate the exact group of peptidases involved in this process.

Some reports in the literature have identified protozoa cysteine proteases that degrade iron-binding proteins. Our group has identified some proteases in *Entamoeba histolytica* that degrade different iron-binding proteins. In the case of HHb, three proteases at 21, 82, and 116 kDa were found only in the amoebic total crude extract, but not in the CM, and were able to degrade human, porcine, and bovine Hb, mainly at pH 7.0 (Serrano-Luna et al. 1998). Four *E. histolytica* bands in the total crude extract corresponding to 6, 20, 43, and 130 kDa degraded Hholo-Tf, and five bands at 30, 35, 50, 70, and 130 kDa were observed in the CM; all of the proteolytic activities were of the cysteine type (Reyes-López 2011). Cysteine proteases at 22, 40, 100, and 250 kDa in the amoebic total crude extract also cleaved Hholo-Lf at pH 7.0 (León-Sicairos et al. 2005), and three neutral cysteine proteases at 50, 75, and 100 kDa were observed to degrade HsF in the total crude extract (López-Soto et al. 2009). *Plasmodium falciparum* is a human parasite that causes malaria and possesses proteases capable of degrading HHb,

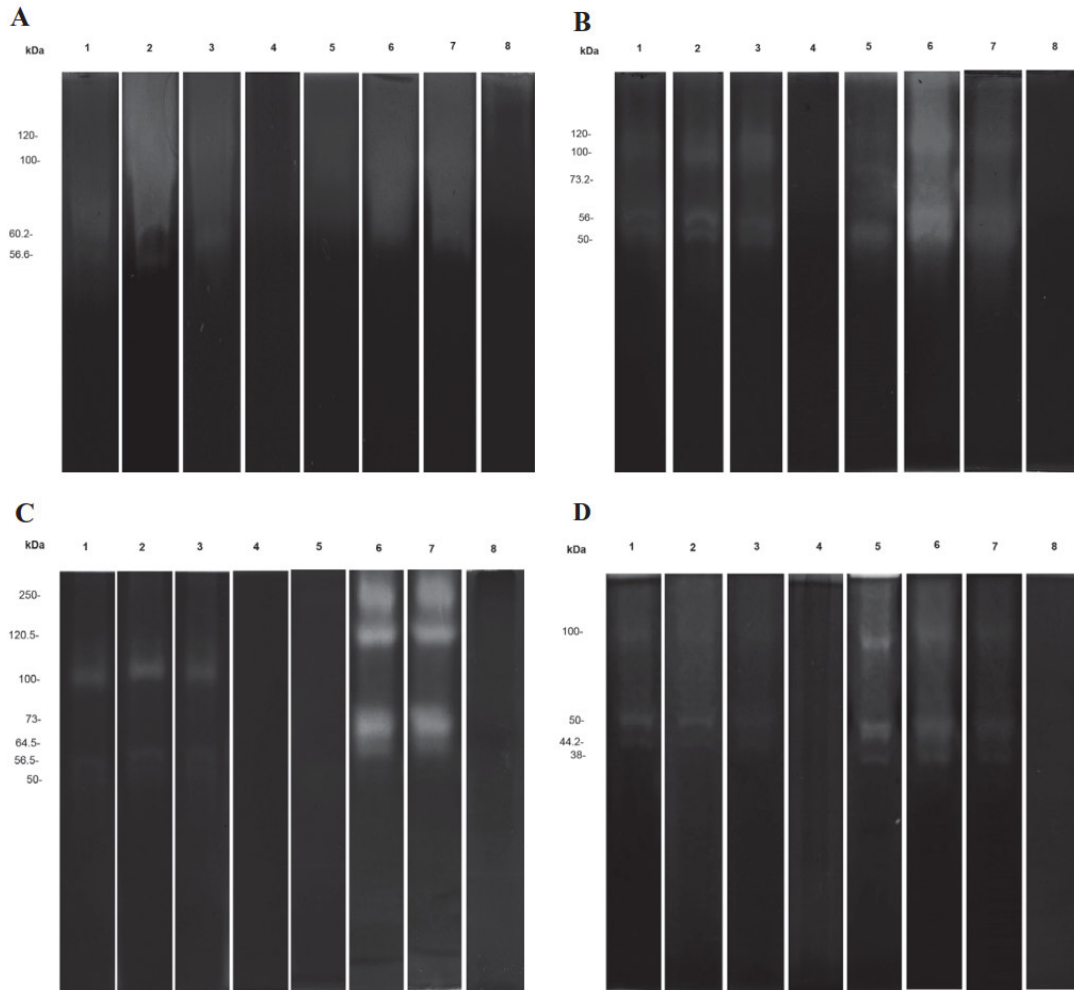


Figure 3 Effect of protease inhibitors on proteolytic profile of gels of crude extracts (lane 1–4) and CM (lane 5–8) incubated with PMSF (lane 1 and 5), aprotinin (lane 2 and 6), E-64 (lane 3 and 7) and PHMB (lane 4 and 8). **A.** Zymogram in 10% SDS-PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) Hholo-Lf. **B.** Zymogram in 10% SDS-PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) Hholo-Tf. **C.** Zymogram in 10% SDS-PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) HHb. **D.** Zymogram in 10% SDS-PAGE copolymerized with 0.1% (w/v) HsF.

which is apparently used only as a source of amino acids (Salas et al. 1995). *Giardia duodenalis*, another protozoan, also contains and secretes cysteine proteases that degrade HHb (De Carvalho et al. 2008), and *Trichomonas vaginalis* possesses a total crude extract protease of 60 kDa that degrades HHb (Min et al. 1998).

Here, we describe for the first time several cysteine proteases that are present in a total crude extract as well as secreted proteases that degrade iron-binding proteins in *A. castellanii*. These proteases could be involved in iron

uptake and may represent a virulence factor for the different diseases caused by this free-living amoeba.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to QFB Silvia Galindo Gómez and MSc José Daniel Coronado Velázquez for their technical assistance. This study was supported by CONACyT grants, numbers 128317 and 179251 and by SNI grant Exp. Inv. 1508, Exp. Ayte. 9049.

LITERATURE CITED

- Barrett, A. J. 1994. Classification of peptidases. *Methods Enzymol.*, 244:1–15.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J. & Griffiths, E. 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 80:1–35.
- De Carvalho, T. B., David, É. B., Coradi, S. T. & Guimaraes, S. 2008. Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. *Parasitol. Res.*, 104:185–190.
- Ferrante, A. & Bates, E. J. 1988. Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infect. Immun.*, 56:3320–3321.
- Garate, M., Cao, Z., Bateman, E. & Panjwani, N. 2004. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J. Biol. Chem.*, 279:29849–29856.
- García-Carreño, F. L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotech. Educ.*, 3:145–150.
- Hadas, E. & Mazur, T. 1993. Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba*. *Trop. Med. Parasitol.*, 44:197–200.
- Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30:564–595.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., Panjwani, N., Cao, Z. & Paget, T. A. 2000. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.*, 38:2858–2861.
- Kinde, H., Read, D. H., Daft, B. M., Manzer, M., Nordhausen, R. W., Kelly, D. J., Fuerst, P. A., Booton, G. & Visvesvara, G. S. 2007. Infections caused by pathogenic free-living amoebae (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba*) in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19:317–322.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Ledee, D. R., Hay, J., Byers, T. H., Seal, D. V. & Kirkness, C. M. 1996. *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of a new corneal pathogen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37:544–550.
- Lee, J. Y., Song, S. M., Moon, E. K., Lee, Y. R., Jha, B. K., Sylvatire-Danne, D. B., Cha, H. J., Yu, H. S., Kong, H. H., Chung, D. L. & Hong Y. 2013. Cysteine protease inhibitor (AcStefin) is required for complete cyst formation of *Acanthamoeba*. *Trends Parasitol.*, 12:611–618.
- Leher, H., Silvan, R., Alizadeh, H., Huang, J. & Niederkorn, J. Y. 1998. Mannose induce the release of cytophatic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.*, 66:5–10.
- Leitsch, D., Kohler, M., Marchetti-Deschmann, M., Deutsch, A., Allmaier, G., Duchene, M. & Walochnik, J. 2010. Major role for cysteine proteases during the early phase of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Eukaryot. Cell*, 9:611–618.
- León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Canizalez-Román, A., Bermúdez-Cruz, R. M., Serrano-Luna, J. J., Arroyo, R. & De La Garza, M. 2005. Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*, 151:3859–3871.
- López-Soto, F., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., León-Sicairos, N., Piña-Vázquez, C., Salazar, E.P. & De la Garza, M. 2009. *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *Int. J. Parasitol.*, 39:417–426.
- Luna-Castro, S., Aguilar-Romero, F., Samaniego-Barron, L., Godínez-Vargas, D. & de la Garza, M. 2014. Effect of bovine apo-lactoferrin on the growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biometals*, 27:891–903.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16:273–307.
- Min, D. Y., Hyun, K. H., Ryu, J. S., Ahn, M. H. & Cho, M. H. 1998. Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J. Parasitol.*, 36:261–268.
- Mitra, M. M., Alizadeh, H., Gerard, R. D. & Niederkorn, J. Y. 1995. Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 73:157–164.
- Moon, E. K., Hong, Y., Chung, D. I. & Kong, H. H. 2012. Cysteine protease involving in autophagosomal degradation of mitochondria during encystation of *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 185:121–126.
- Mortazavi, P. N., Keisary, E., Loh, L. N., Jung, S. Y. & Khan, N. A. 2011. Possible roles of phospholipase A(2) in the biological activities of *Acanthamoeba castellanii* (T4 Genotype). *Protist*, 162:168–176.
- Mottram, J. C., Helms, M. J., Coombs, G. H. & Sajid, M. 2003. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol.*, 19:182–187.
- Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L. I., Cristóbal-Ramos, A. R., González-Lázaro, M., Salinas-Moreno, E., Méndez-Cruz, R., Sánchez-Cornejo, M., de la Torre-González, E. & Martínez-Palomo, A. 2010. *Acanthamoeba castellanii* morphological analysis of the interaction with human cornea. *Exp. Parasitol.*, 126:73–78.
- Otto, B. R., Verweij-Van Vught, A. M. J. J. & MacLaren D. M. 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 18:217–233.
- Pawlowski, J. & Burki, F. 2009. Untangling the phylogeny of amoeboid protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 56:16–25.
- Pellegrin, J. L., Ortega-Barria, E., Prioli, R. P., Meijia, J. S. & Pereira, M. E. 1992. The neuraminidases of *Trypanosoma cruzi* and *Acanthamoeba castellanii* are immunologically related. *Trop. Med. Parasitol.*, 43:33–37.
- Reyes López, M. 2011. Mecanismo de Endocitosis de Transferina Humana en *Entamoeba histolytica*. Tesis Doctoral, UAM, Xochimilco 84 p.
- Reyes-López, M., Bermúdez-Cruz, R. M., Ávila, E. E. & de la Garza, M. 2011. Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (EhADH2) and clathrin are involved in internalization of human transferrin by *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*, 157:209–219.
- Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G. & Robles E 1984. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral region of dental patients. *Environ. Res.*, 33:428–440.
- Roger, A. J. & Hug, L. A. 2006. The origin and diversification of eukaryotes: problems with molecular phylogenetics and molecular clock estimation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 361:1039–1054.
- Salas, F., Fichmann, J., Lee, G. K., Scott, M. D. & Rosenthal, P. J. 1995. Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its role as a malarial hemoglobinase. *Infect. Immun.*, 63:2120–2125.
- Serrano-Luna, J. J., Cervantes-Sandoval, I., Calderón, J., Navarro-García, F., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. 2006. Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Can. J. Microbiol.*, 52:16–23.
- Serrano-Luna, J. J., Negrete, E., Reyes, M. & de la Garza, M. 1998. *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp. Parasitol.*, 89:71–77.

- Sissons, J., Kim, K. S., Stins, M., Jayasekera, S., Alsam, S. & Khan, N. A. 2005. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinasedependent mechanism. *Infect. Immun.*, 73:2704–2708.
- Taylor, P. W. 1977. Isolation and experimental infection of free-living amoebae in freshwater fishes. *J. Parasitol.*, 63:232–237.
- 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.
- Weinberg, E. D. 2003. Iron chelation in chemotherapy. *Adv. Appl. Microbiol.*, 52:187–208.
- Wooldridge, K. G. & Williams, P. H. 1993. Iron uptake mechanism of pathogenic bacteria. *Microbiol. Rev.*, 12:325–348.

¹ Present address: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, 54714, Estado de México, México

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) (Martínez *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.

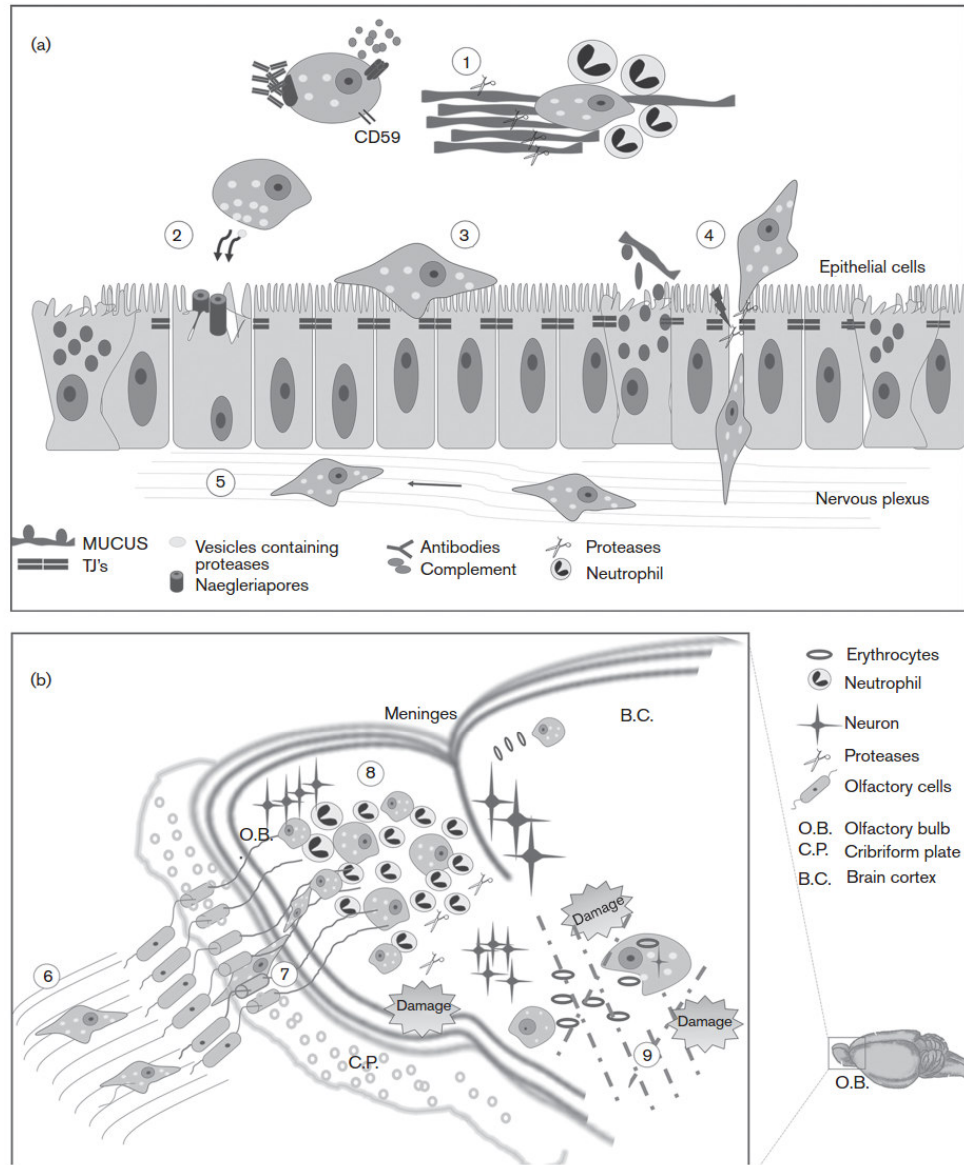


Fig. 1. Schematic representation of *N. fowleri* infection. (a) Initial stages of PAM. (1) Evasion of innate immune response, (2) independent-contact cytotoxicity (naegleriapores), (3) adhesion to epithelial cells, (4) invasion of the neuroepithelium, (5) migration to OBs. (b) Late stages of PAM. (6) 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

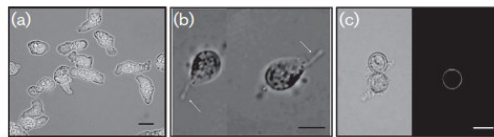


Fig. 2. Different cell stages of *N. fowleri*. (a) Typical morphology of *N. fowleri* trophozoites in axenic culture. (b) Flagellar form induced by isotonic saline solution for 2 h. The flagella (arrows) are evident. (c) Cyst induced by 1323 Page's amoeba saline solution. The cyst wall was stained with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

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

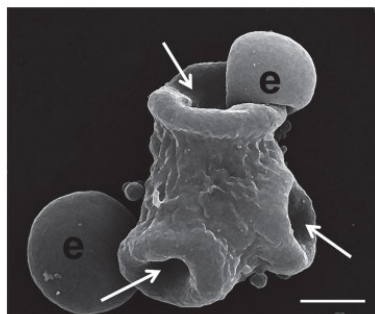


Fig. 3. Scanning electron microscopy of *N. fowleri* trophozoites interacted with erythrocytes. Three phagocytic mouths are seen (arrows), red blood cells (e). Jeol (JSM-6510LV) microscopy. Bar, 5 μ m.

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

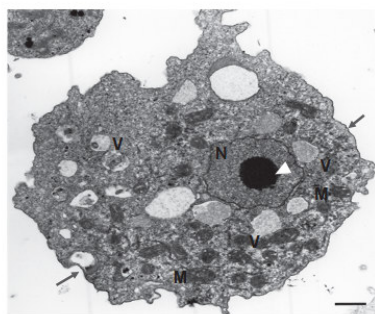


Fig. 4. Transmission electron microscopy. Ultrastructural morphology of *N. fowleri*. Trophozoite cultured in Bacto-casitone medium shows a normal nucleus (N) with a prominent nucleolus (arrowhead). The integrity of the cytoplasmic membrane (arrows) is also observed, and multiple normal mitochondria (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

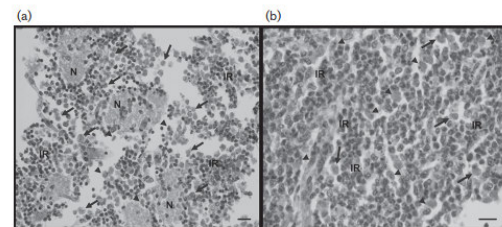


Fig. 5. Histopathology of the OBs infected with *N. fowleri* (mouse model). (a) Sections of OBs 6 days after instillation with the amoebae (arrows). Trophozoites appear to be ingested erythrocytes (arrowheads); lytic necrosis is also seen (N). Magnification, $\times 40$. (b) Important inflammatory reaction 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 amoebic 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 amoebic 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 amoebic 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-Yepetz, M., Campos-Rodríguez, R., Godínez-Victoria, M., Rodríguez-Monroy, M. A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., De Oca, A. C. & Rojas-Hernández, 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 amoebic meningoencephalitis. *Am J Epidemiol* **88**, 436–444.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., García-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., García-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-Gamboja, 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 amoebic 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 Issaquena. *J Protozool* 34, 10–15.
- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J. F., De Moura, H., Rechiruretagoyena, 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.
- Maclean, 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.
- Martinez-Castillo, M., Ramirez-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.
- Naqī, 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.
- Peléndakis, 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 amoebic 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 amoebic 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 meningitidis*. *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.