



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

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

**“Caracterización molecular de las alteraciones
producidas por trofozoítos de *Naegleria fowleri* en un
modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica”**

Tesis que presenta

M. en C. José Daniel Coronado Velázquez

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En

Infectómica y Patogénesis Molecular

Director de tesis

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

Ciudad de México

Junio, 2018

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 este trabajo estuvo bajo la asesoría de la Dra. Abigail Betanzos Fernández, Dra. Bibiana Chávez Munguía, Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi, Dr. José de Jesús Serrano Luna y de la Dra. Judith Pacheco Yépez.

Durante el desarrollo de este trabajo el autor fue becario de CONACyT con número 418624, además fue apoyado por el proyecto SEP-CONACyT con número 237523.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis tutores y amigos. Gracias a la Dra. Mineko Shibayama y al Dr. Jesús Serrano Luna por el apoyo y estímulo en mi formación personal y científica.

Gracias a los investigadores que evaluaron y tuvieron tiempo para dirigir este trabajo desde su planteamiento hasta la conclusión de este. Gracias a la Dra. Abigail Betanzos Fernández, Dra. Bibiana Chávez Munguía, Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi y a la Dra. Judith Pacheco Yépez.

Gracias a la M. en C. Dora Angélica Silva Olivares por su apoyo con la microscopia confocal y en el manejo de cultivos celulares y amibianos; gracias al técnico Víctor Hernández por su apoyo técnico en la preparación del material de laboratorio; Sra. Martha Aguilar por su apoyo en todos los aspectos secretariales y administrativos; al M. en C. Jaime Escobar Herrera por su apoyo técnico en la microscopia confocal.

Gracias a mi pareja Guadalupe Elide Morales Figueroa por su apoyo y amor incondicional en este camino de la vida.

Gracias a mis padres, José Isaías Coronado Galván (Q.D.E.P.) y Camerina Velázquez Valenzuela por su gran apoyo, su amor, su paciencia y estímulo brindado a su hijo.

Gracias a mis hermanas, María Luisa, Elizabeth y Ana Karina Coronado Velázquez por compartir grandes momentos y por aguantarme todo el tiempo que hemos compartido.

Gracias a mis tíos, Yolanda Velázquez y Rafal León por darnos cobijo a mí y a mi novia Elide en su casa en los primeros meses de llegada a la Ciudad de México, así como a mis primos Carlos Rafael y Rodrigo León por la convivencia en esos meses.

Gracias a mis compañeros y amigos, Moisés Martínez Castillo, Paula Guzmán y Nadia Flores por su amistad y apoyo incondicional.

Gracias al CONACyT por el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia, a mi pareja, a mis amigos y a mis mentores por su apoyo constante, por esa motivación que brindaron en los buenos y malos momentos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Amibas de vida libre.....	3
1.2. <i>Naegleria</i> spp.....	3
1.3. Ciclo de vida y morfología.....	4
1.4. Taxonomía.....	7
1.5. Epidemiología.....	7
1.6. Cuadro clínico.....	10
1.7. Diagnóstico.....	11
1.8. Tratamiento.....	12
1.9. Mecanismos de patogenicidad.....	13
2. Respuesta inmunológica.....	15
3. Barrera hematoencefálica (BHE).....	16
3.1. Componentes celulares de la BHE.....	18
3.2. Células murales.....	19
3.3. Lamina basal.....	20
3.4. Astrocitos.....	20
3.5. Células del sistema inmune en la BHE.....	21
3.6. Células endoteliales.....	22

3.6.1. Moléculas de adhesión celular	22
3.6.2. Producción de óxido nítrico (ON).....	23
4. Uniones estrechas.....	24
4.1. Proteínas transmembranales.....	24
4.2. Proteínas submembranales.....	29
4.3. Uniones estrechas en la BHE.....	30
5. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	32
6. JUSTIFICACIÓN.....	37
7. HIPÓTESIS.....	38
8. OBJETIVO GENERAL.....	38
8.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
9.1. Cultivo amibiano.....	39
9.2. Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP) experimental en el modelo de la rata.....	39
9.3. Inmunohistoquímica en el modelo de la MAP.....	40
9.4. Cultivo primario de células endoteliales RBMEC.....	41
9.5. Cultivo primario de astrocitos de cerebro de rata.....	42
9.6. Efecto citopático de trofozoítos y de productos de secreción de <i>N. fowleri</i> sobre el cultivo de RBMEC.....	43
9.7. Daño endotelial debido a las proteasas de <i>N. fowleri</i>	44
9.8. Medición de la resistencia eléctrica transendotelial (RET).....	44

9.9. Análisis de las uniones estrechas (UE) de las células RBMEC co-cultivadas con trofozoítos de <i>N. fowleri</i> a través de microscopia confocal.....	45
10. Inhibidores de proteasas para los extractos totales de células RBMEC.....	46
10.1. Evaluación del daño a las proteínas de las UE.....	46
10.2. Inducción de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 de las RBMEC por <i>N. fowleri</i>	47
10.3. Cuantificación de la producción de citocinas por las células RBMEC inducidas por trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	49
10.4. Cuantificación de la producción de ON por las células RBMEC interaccionadas con trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	49
11. RESULTADOS.....	51
13. DISCUSIÓN.....	75
14. CONCLUSIONES.....	82
15. PERSPECTIVAS.....	83
16. BIBLIOGRAFÍA.....	84
17. ANEXOS.....	98
17.1. Artículos científicos publicados.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios de vida de <i>Naegleria fowleri</i>	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Naegleria</i> spp.....	6
Figura 3. Mapa donde se muestra la distribución de los casos de MAP a nivel mundial.....	9
Figura 4. Representación esquemática de la unidad neurovascular.....	19
Figura 5. Localización y estructura molecular de las UE en células epiteliales...	25
Figura 6. Representación esquemática de la ocludina.....	26
Figura 7. Representación esquemática de las claudinas.....	28
Figura 8. Representación esquemática de las proteínas ZO's.....	29
Figura 9. Representación esquemática de las UE presentes en los capilares de células endoteliales en el SNC.....	32
Figura 10. Meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) en la rata.....	53
Figura 11. Inmunohistoquímica contra <i>N. fowleri</i> en el modelo de la rata.....	54
Figura 12. Establecimiento del cultivo primario de RBMEC de rata.....	55
Figura 13. Cultivo primario de astrocitos de rata.....	56
Figura 14. Estandarización de la relación de interacción de <i>N. fowleri</i> con las células RBMEC durante 1, 3, 6 y 10 h.....	57
Figura 15. Efecto citopático sobre RBMEC por <i>N. fowleri</i>	59
Figura 16. <i>N. fowleri</i> induce daño a las células RBMEC.....	61
Figura 17. Los PS de <i>N. fowleri</i> inducen daño a las células RBMEC.....	62
Figura 18. Alteraciones de la RET de las células RBMEC por <i>N. fowleri</i>	64

Figura 19. Localización de las proteínas de las UE en RBMEC co-incubadas con <i>N. fowleri</i>	66
Figura 20. Western blot de las UE de RBMEC co-incubadas con <i>N. fowleri</i>	68
Figura 21. La expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en las células RBMEC es inducida por <i>N. fowleri</i>	70
Figura 22. Curvas estándar para las citocinas IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12p70 proporcionadas por el Kit BD CBA.....	71
Figura 23. Producción de citocinas por RBMEC en interacción con <i>N. fowleri</i>	72
Figura 24. Curva estándar para la cuantificación de óxido nítrico utilizando concentraciones conocidas de nitritos proporcionadas por el kit.....	73
Figura 25. <i>N. fowleri</i> induce la producción de ON en las células RBMEC.....	71
Figura 26. Representación esquemática de la interacción de <i>N. fowleri</i> con la BHE.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las proteínas integrales de las uniones estrechas..... 27

Tabla 2. Protozoarios que afectan la integridad del endotelio vascular cerebral
y el mecanismo involucrado en el proceso migración a través de la BHE..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS

AmB – Amfotericina B

AVL – Amibas de vida libre

BHE – Barrera hematoencefálica

H&E – Hematoxilina y eosina

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule-1

LCR – Líquido cefalorraquídeo

LP – Lamina propria

MAP - Meningoencefalitis amibiana primaria

MDCK – Madin Darby Canine Kidney

NO – Neuroepitelio olfatorio

ON – Óxido nítrico

PN – Plexos nerviosos

RBMEC – Rat brain microvascular endothelial cells

RER – Retículo endoplásmico rugoso

RET – Resistencia eléctrica transendotelial

SNC – Sistema nervioso central

TN – Turbinas nasales

UE – Uniones estrechas

VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule-1

RESUMEN

Naegleria fowleri causa una enfermedad fatal conocida como meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), la cual se caracteriza por producir una inflamación aguda en el sistema nervioso central (SNC), originada por el paso libre de células de la circulación sanguínea debido a la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE). En este trabajo, establecimos la MAP en el modelo de la rata, así como un cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de la rata (RBMEC), con el objetivo de evaluar las alteraciones en las proteínas de las uniones estrechas (UE) y la activación de las células endoteliales por la presencia de los trofozoítos de *N. fowleri*, de manera similar a lo que ocurre en la BHE. Se encontró que la rata es capaz de desarrollar la MAP, de manera similar a lo reportado en el modelo del ratón y en el humano. También se evaluó el efecto citopático producido por los trofozoítos de *N. fowleri* y sus productos de secreción sobre el cultivo primario. Dicho efecto fue bloqueado con el uso de inhibidores de cisteína proteasas. *N. fowleri* es capaz de disminuir la resistencia eléctrica transendotelial (RET) a través de la desestabilización de las uniones estrechas endoteliales y de sus componentes como claudina-5, ocludina y ZO-1, de una manera dependiente del tiempo. Además, las amibas inducen la expresión de VCAM-1 e ICAM-1, la producción de las citocinas proinflamatorias IL-8, IL-1 β , TNF- α e IL-6, así como la producción de óxido nítrico (ON) en las células endoteliales. Con todos estos resultados podemos concluir que *N. fowleri* es capaz de alterar a la BHE del huésped, a través del daño a las uniones intercelulares, propiciando la producción de mediadores inflamatorios que podrían facilitar la llegada de células inflamatorias al SNC.

ABSTRACT

Naegleria fowleri causes a fatal disease known as primary amoebic meningoencephalitis (PAM), characterized by an acute inflammation originated by the free pass of peripheral blood cells to the central nervous system (CNS) through the alteration of the blood-brain barrier (BBB). In the present work, we established PAM in the rat model and a primary culture of BBB from rat brain microvascular endothelial cells (RBMEC), with the aim to evaluate alterations of the tight junction proteins and the activation of the endothelial cells by *N. fowleri* trophozoites in a similar way to that occurs in the BBB. We found that the rat develops PAM infection similar to the mouse model and also in human beings. We also evaluated the cytopathic effect produced by the trophozoites and the secreted products over the RBMEC, which was blocked with cysteine proteases inhibitors. *N. fowleri* can decrease the transendothelial electrical resistance (TEER) by triggering the destabilization of the endothelial tight junction proteins, claudin-5, occludin and ZO-1, in a time dependent manner. Furthermore, the expression of VCAM-1 and ICAM-1, the production of IL-8, IL-1 β , TNF- α and IL-6, as well as nitric oxide (NO) were induced by *N. fowleri*. With all these results we can conclude that *N. fowleri* damages the BBB by disrupting the intercellular junctions and inducing the production of inflammatory mediators allowing the arrival of inflammatory cells to the CNS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre son microorganismos eucariotas distribuidos ampliamente en todo el mundo. Se caracterizan por ser organismos anfibios, es decir, que tienen la capacidad de vivir en dos ambientes diferentes. Entre estas amibas se encuentran los géneros de mayor relevancia médica: *Naegleria* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp. y *Sappinia diploidea* (Visvesvara *et al.*, 2007). El más abundante en la naturaleza es el género *Acanthamoeba*, ya que posee la capacidad de resistir condiciones ambientales extremas lográndose encontrar en agua salada, destilada, en aguas residuales, en el suelo y en ambientes hospitalarios (Trabelsi *et al.*, 2012).

1.2. *Naegleria* spp.

El género *Naegleria* posee una amplia distribución en la naturaleza (cosmopolita), pudiéndose encontrar en el suelo y cuerpos de agua dulce, naturales o artificiales. Este organismo se caracteriza por transformarse de su forma amibiana a flagelado, además de presentar una fase de quiste en su ciclo de vida (Kyle & Noblet, 1985; Rodríguez-Zaragoza, 1994; De Jonckheere, 2011). Crece normalmente en climas tropicales o subtropicales a temperaturas cercanas a los 37°C y ha sido aislado de muestras obtenidas de lagos, suelo, albercas mal cloradas, suministros de agua doméstica y aguas residuales (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Así mismo, *Naegleria* spp. ha sido aislada de animales, tales como reptiles, anfibios y también del intestino de peces (Dykova *et al.*, 2001). El lavado de los suelos por la lluvia lleva a las amibas a los cuerpos de agua, donde Kyle y Noblet (1985) observaron que existía una relación directamente proporcional entre el número de amibas en las capas de agua en donde se encontraban grandes cantidades de cianobacterias y otras eubacterias, por lo que se sugirió que pueden servirles como fuente de alimento. Por otro lado, se han aislado un mayor número de amibas en estratos con altos índices de hierro exógeno y manganeso. Así mismo, la amiba patógena *N. fowleri* es capaz de crecer en ambientes con un amplio rango de pH (4.6–9.5), de tal modo que el pH no parece ser un factor limitante para su distribución (Carter, 1970; Duma, 1980; Kyle & Noblet, 1985). En

cuanto a los intervalos de temperatura, se han aislado amibas patógenas de agua dulce a 10°C y del suelo a 8°C. Sin embargo, la mayoría de las cepas de *N. fowleri* han sido aisladas de aguas con temperaturas elevadas. Se ha observado que la temperatura es un factor que favorece el aumento poblacional de *N. fowleri*, también se sabe que estos protozoarios son capaces de tolerar temperaturas de hasta 45°C, a diferencia de otros microorganismos de vida libre. Por otra parte, se tiene la hipótesis de que la alteración del ambiente por acción del humano (contaminación, cambio climático y cloración del agua) impacta negativamente sobre la fauna microbiana termosensible normal de los cuerpos de agua, eliminando así la competencia y favoreciendo la colonización de *N. fowleri*. En un estudio donde se monitoreo el número de trofozoítos de *Naegleria* spp. en el norte de México, se observó mediante el método del número más probable (NMP), que el número de amibas aumenta en los meses más cálidos del año (agosto-octubre), siendo la máxima concentración de 201 amibas NMP/L y la mínima de 18 NMP/L (Lares-Villa & Hernandez-Peña, 2010). La cantidad de trofozoítos en los cuerpos de agua se correlacionó directamente con el riesgo para adquirir la infección (Cabanés *et al.*, 2001).

1.3. Ciclo de vida y morfología

Durante su ciclo de vida, el género *Naegleria* puede presentar tres estadios fisiológica y morfológicamente diferentes: trofozoíto, flagelado y quiste (Figura 1). El trofozoíto es la forma vegetativa; en esta etapa del ciclo de vida se lleva a cabo sus funciones metabólicas, y es capaz de dividirse.

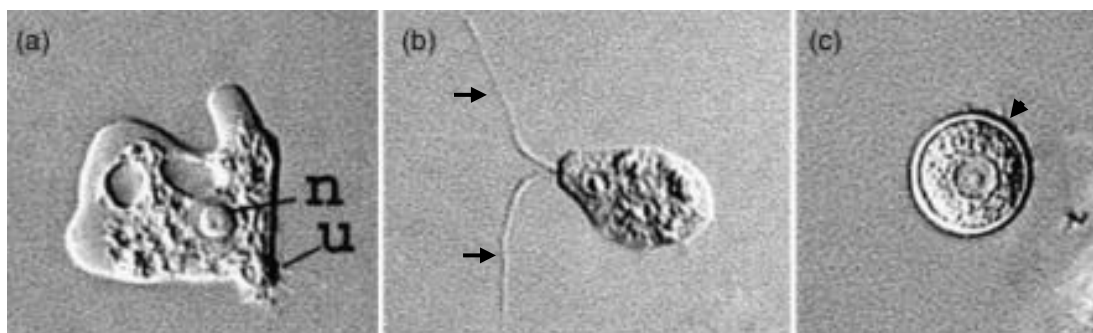


Figura 1. Estadios de vida de *Naegleria fowleri*. a) Trofozoíto (15-25 µm), núcleo (n), uroide (u); b) flagelado (10-16 µm), se observan dos flagelos (flechas). c) quiste (8-12 µm), se observa la pared celular (cabeza de flecha). (Visvesvara *et al.*, 2007).

La división de los trofozoítos de *N. fowleri* es del tipo pro-mitótica, donde la membrana nuclear y el nucléolo permanecen intactos durante la cariocinesis (Fulton & Dingle, 1971; Fritz-Laylin *et al.*, 2011). A nivel ultraestructural, los trofozoítos de *Naegleria* presentan características similares a las células eucariontes, contienen un gran número de ribosomas libres asociados al retículo endoplásmico, aunque también presentan retículo endoplásmico liso. Solo en algunas cepas de *N. fowleri* se ha encontrado una estructura similar al aparato de Golgi. Contienen numerosas mitocondrias alargadas, así como vacuolas contráctiles, que le permite regular cambios osmóticos para evitar el estallamiento celular; además posee un núcleo prominente con un nucléolo conspicuo (Marciano-Cabral, 1988). Cuando en los cuerpos de agua se agotan los nutrientes o las condiciones de pH no son los óptimos para el desarrollo de *N. fowleri*, la fase de trofozoíto presenta cambios morfológicos y funcionales, dando lugar al flagelado (10-16 μm). La diferenciación a esta fase consiste en el cambio de su forma, así como en la síntesis de su aparato flagelar (Marciano-Cabral, 1988). Este estadio puede inducirse en el laboratorio, incubando a los trofozoítos en una solución salina isotónica o en agua destilada (Behets *et al.*, 2003; Martínez-Castillo *et al.*, 2016). La fase de flagelado le permite desplazarse rápidamente hasta alcanzar nuevos ambientes, en donde las condiciones sean favorables para su desarrollo. La forma flagelada 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 de tiempo en cultivos axénicos pierden la capacidad de flagelarse, y esta propiedad no puede recuperarse por ningún método conocido (John *et al.*, 1991). La fase de resistencia o quiste (8-12 μm) se puede inducir cuando las condiciones ambientales son adversas, como la desecación, ausencia de nutrientes, acumulación de productos de desecho, ausencia de oxígeno, cambios de pH, alta salinidad e incluso por sobrepoblación (Chang, 1958; Schuster & Svihla, 1968). El proceso de enquistamiento de *Naegleria spp.* comienza con la expulsión de agua, la reorganización de su citoplasma y la síntesis de una doble pared celular compuesta principalmente por celulosa. Durante la primera etapa de enquistamiento (pre-quiste), la morfología del trofozoíto cambia de una forma irregular a una globular, observándose retículo endoplásmico rugoso (RER) y

vesículas llenas de material fibrilar, las cuales se asocian a la membrana plasmática y al RER.

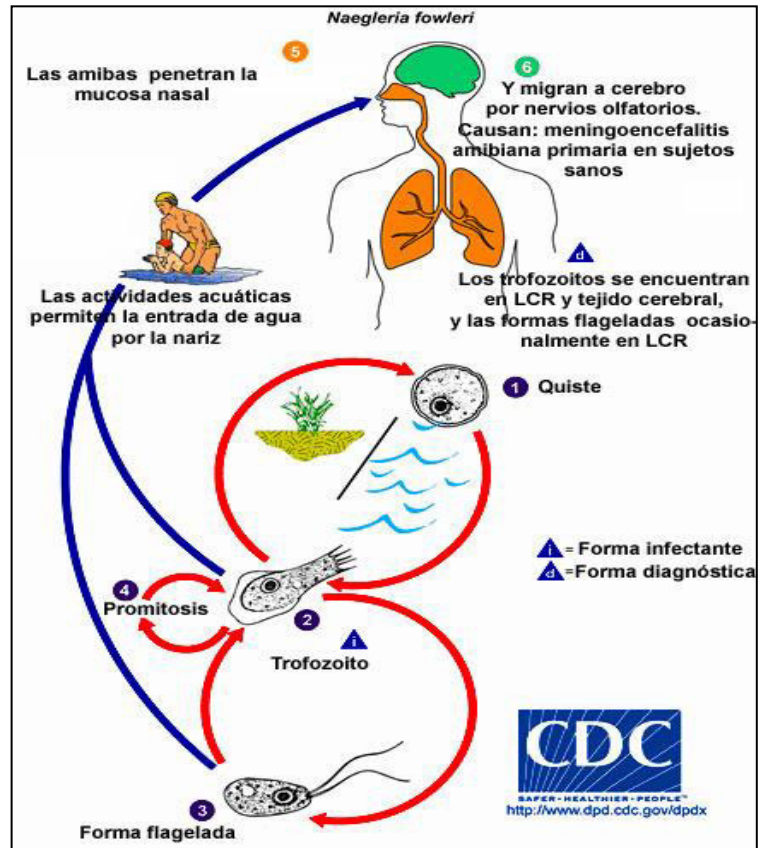


Figura 2. Ciclo de vida de *Naegleria spp* (CDC, 2013).

Después de 8 días los quistes aparecen en el cultivo con su pared quística completa, observándose los ostiolos ya formados (2-3 ostiolos), además de un núcleo con un nucléolo muy visible, así como un citoplasma granular (Chávez-Munguía *et al.*, 2009). El quiste vuelve a su forma vegetativa hasta que las condiciones del ambiente favorecen el desenquistamiento. Se ha observado experimentalmente que tanto los trofozoítos como los quistes pueden ser las fases infectivas en la MAP (Martinez *et al.*, 1973a); por otro lado se ha reportado a nivel experimental, que la inoculación del flagelado es capaz de infectar ratones y provocar la muerte de los animales (Das, 1972). Sin embargo, probablemente el flagelado y el quiste se transforman en trofozoítos antes de penetrar en los tejidos del hospedero (Figura 2). Además sólo se

ha encontrado la fase trófica en las piezas post-mortem de cerebro humano (Martínez & Visvesvara, 1991).

1.4. Taxonomía

La primera clasificación de las especies de *Naegleria* se basó en las características morfológicas del quiste, su tolerancia a la temperatura, patrones enzimáticos y a la patogenicidad mostrada en el modelo del ratón (Willaert *et al.*, 1973; Stevens *et al.*, 1980). Sin embargo, este sistema de clasificación era sumamente subjetivo, ya que se ha demostrado que tales características varían dependiendo de las condiciones y el tiempo que las cepas se mantienen en los cultivos axénicos. Con el objetivo de realizar una reclasificación de las especies de este género, De Jonckheere (2004) analizó la secuencia de los espaciadores de transcripción internos 1 y 2 (ITS1 y ITS2), así como la secuencia de la subunidad 5.8S del ADN ribosomal (rADN). Los resultados de este trabajo mostraron, que es posible definir especies diferentes dentro del género *Naegleria*, basándose en la secuencia y tamaño de los diferentes fragmentos de la subunidad pequeña del rADN (SSU rADN). Apoyado en este nuevo sistema de clasificación, se propuso la existencia de 36 especies de *Naegleria*, de las cuales solo *N. fowleri* es patógena para el humano. Otras especies como *N. australiensis*, *N. italica* y *N. philippiniensis* son patógenas solamente al ser utilizadas en modelos animales (De Jonckheere, 2004). En la actualidad la clasificación se basa en marcadores moleculares y diversas características taxonómicas, que ubican a este protozoario dentro del filo Percolozoa (De Jonckheere, 2011).

1.5. Epidemiología

La ameba *N. fowleri* ha llamado la atención a nivel mundial, ya que es una afección del SNC con una rápida evolución y mortalidad. A nivel mundial existen reportes desde 235 a 300 casos de MAP (De Jonckheere, 2011; Trabelsi *et al.*, 2012), resultando casi siempre fatal, con solo 16 casos de recuperación hasta el año 2017 (Martínez-Castillo *et al.*, 2016; Heggie & Kupper, 2017). Afecta principalmente a menores de edad con historia previa de natación, por lo que esta patología es un serio problema de salud pública (Sood *et al.*, 2014). El primer caso de MAP fue reportado

en 1965 en Australia, donde se reportó que un paciente murió a causa de una meningitis piógena de etiología desconocida (Fowler & Carter, 1965). Posteriormente, se reportaron tres casos más con historias clínicas similares, donde histológicamente en piezas de cerebro post-mortem, se describían formas ameboides distintas a *Entamoeba histolytica*, pero similares a las AVL (Fowler & Carter, 1965). Aunque el agente etiológico no fue identificado en las autopsias, la comunidad científica consideró que el agente etiológico fue *N. fowleri* (Carter, 1970; Carter *et al.*, 1981; Marciano-Cabral, 1988). Posterior a estos reportes, en Europa han sido documentados 24 casos de MAP relacionados con actividades acuáticas en aguas termales y contaminadas con desechos industriales (Cerva & Novak, 1968). En Australia se han reportado 19 pacientes con MAP, de los cuales 14 se infectaron por el uso de los suministros de agua públicos, por nadar en piscinas o por enjuagarse la nariz con soluciones contaminadas con este microorganismo (Dorsch *et al.*, 1983). En Asia se han reportado 39 casos de MAP, donde 12 de los casos ocurrieron en Tailandia, 2 en Japón y 1 en China. De manera relevante, en estos tres países, la infección también se relacionó con individuos que realizaban actividades acuáticas, así como nado en aguas termales (De Jonckheere, 1991; Wang *et al.*, 1993; Wiwanitkit, 2004). En años recientes se reportaron 13 casos de meningoencefalitis en Pakistán en un periodo de 17 meses, probablemente provocado por el uso de agua mal clorada en rituales de ablución. Este ritual consiste en lavarse las manos, la boca, la nariz, oídos, cara, brazos y pies. Cuando los lavados de nariz son realizados los practicantes, fuerzan el paso de agua a través de las fosas nasales, teniendo beneficios para la salud si el agua es limpia; sin embargo, si *N. fowleri* está presente en el agua usada para este ritual de ablución la amiba puede acceder a la mucosa nasal y así alcanzar el SNC y causar la MAP en el individuo (Shakoor *et al.*, 2011; Siddiqui & Khan, 2014). Otro de los factores de riesgo en estas comunidades de la India, es la realización de actividades acuáticas en ríos que son frecuentemente usados para realizar necesidades fisiológicas como la defecación. Desafortunadamente la falta de infraestructura de salud y de información, acerca de estos patógenos que involucran patologías que afectan al SNC, está muy reducida en estas comunidades, lo que podría provocar el aumento de los casos provocados por *N. fowleri* (Siddiqui & Khan,

2014). En los Estados Unidos se han reportado alrededor de 111 casos, desde el año 2008 (Yoder *et al.*, 2010; Trabelsi *et al.*, 2012); así como aproximadamente 35 casos en la república Mexicana (Valenzuela *et al.*, 1984; Lopez-Corella *et al.*, 1989; Lares-Villa *et al.*, 1993; Lares-Villa, 2001; Lares-Villa & Hernandez-Peña, 2010) (Figura 3). En este caso, se repite el patrón de aguas cálidas con contaminación provocada por la industria o provenientes de fuentes termales. En Sudamérica se han reportado 7 casos en Venezuela (Caruzo & Cardozo, 2008) y 5 en Brasil (Salazar *et al.*, 1986), la mayoría relacionado con el nado en lagos y en piscinas no cloradas.

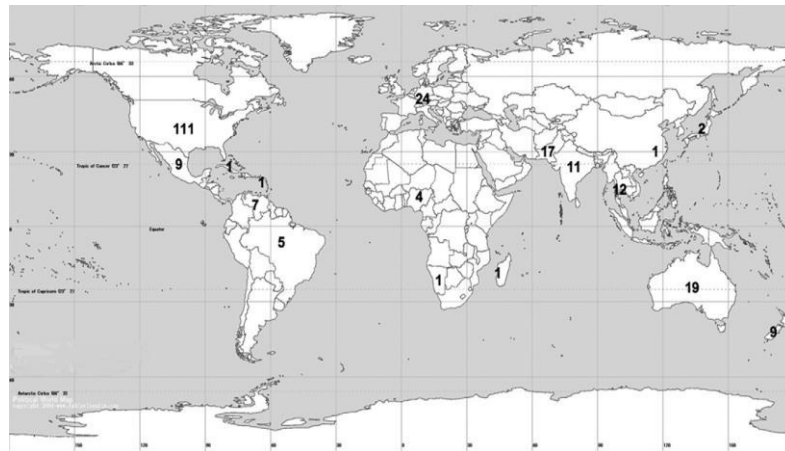


Figura 3. Distribución de los casos de MAP a nivel mundial, acumulándose la mayoría de los casos en los Estados Unidos de Norteamérica (De Jonckheere, 2011).

En Cuba (Cubero-Menendez & Cubero-Rego, 2004) y en la isla de Guadalupe sólo se ha reportado un caso de MAP, siendo en esta última donde se relaciona la natación en piscinas de aguas termales (Nicolas *et al.*, 2010). Desafortunadamente, en la actualidad no se cuentan con estudios epidemiológicos exactos, provocando que esta infección sea subvalorada por parte de la comunidad médica, ya que no es imperativo el uso de pruebas diagnósticas específicas, cuando se presentan casos de meningitis en el humano (Marciano-Cabral & Cabral, 2007; De Jonckheere, 2011; Martínez-Castillo *et al.*, 2016).

1.6. Cuadro clínico

Algunos de los casos clínicos reportados en diferentes instituciones médicas en todo el mundo frente a un caso de MAP han sido mal diagnosticados, debido a que los individuos presentaron datos de meningitis que pueden tener una etiología viral o bacteriana. Los pacientes acuden por dolor de cabeza intenso y persistente, principalmente localizado en la zona frontal. Este malestar puede estar acompañado de fiebre elevada (38-40°C), distorsiones en la percepción del sabor y olor, somnolencia, confusión, fotosensibilidad, fiebre, vómito en proyectil y rigidez de cuello (Oddo *et al.*, 2006). 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 (Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara, 2013; Cope *et al.*, 2016). La muerte puede ocurrir entre el tercero y el décimo día después de la aparición de los primeros síntomas (De Jonckheere, 2011). El periodo de incubación dura de 3 a 7 días, los síntomas de la enfermedad comienzan abruptamente al primer o segundo día después de la exposición al agua contaminada. Dado la dificultad del diagnóstico clínico ya que se puede confundir con la sintomatología de otro tipo de meningitis de etiología viral o bacteriana, así como por el desconocimiento por parte de la comunidad médica de que existe el protozooario *N. fowleri* que puede causar meningitis, actualmente se realizan estudios en el modelo murino. En este modelo se ha demostrado experimentalmente que las amibas entran a la cavidad nasal, se adhieren y penetran el neuroepitelio olfatorio y migran a través de los nervios olfatorios atravesando la placa cribosa y llegando a los bulbos olfatorios, lo que provoca una infección mortal en los humanos (Martinez *et al.*, 1973a; Jarolim *et al.*, 2000; Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b). Las autopsias de los pacientes de MAP muestran inflamación del cerebro con daño tisular severo a lo largo de la zona de invasión, con ulceración de la mucosa nasofaríngea y necrosis de los nervios olfatorios. En los tiempos tardíos de la infección en el modelo murino, se observa un infiltrado inflamatorio en los bulbos olfatorios que también tienen características muy similares a las observadas en muestras post-mortem de cerebro humano (Rojas-Hernández *et al.*, 2004; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b).

1.7. Diagnóstico

Para proporcionar un tratamiento adecuado contra la MAP, es muy importante llevar a cabo un diagnóstico rápido y oportuno contra, así como realizar una historia clínica detallada del paciente (Da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). El diagnóstico de la infección por *Naegleria fowleri*, puede realizarse mediante el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) utilizando microscopía de luz para observar la presencia de trofozoítos. El color del LCR puede presentarse como gris a amarillento (Visvesvara *et al.*, 2007). Se ha determinado que en el conteo celular, los eritrocitos alcanzan cifras de 250 células/mm³ en etapas tempranas de infección, pero si la enfermedad progresa el número de eritrocitos puede aumentar hasta 24, 600 células/mm³ (Visvesvara *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha determinado la presencia de leucocitos predominantemente neutrófilos y que puede variar de 300 células por mm³ hasta 26, 000 células por mm³. La concentración de proteínas en líquido cefalorraquídeo (LCR) varía de los 100 mg/100 ml hasta los 1000 mg/100 ml y la glucosa es de 10 mg/100 ml o menor (Hannisch & Hallagan, 1997; Visvesvara *et al.*, 2007). Para observar a los trofozoítos de *N. fowleri* con mayor detalle, se pueden realizar las tinciones de Giemsa o Wright (Martinez & Visvesvara, 1991; Visvesvara *et al.*, 2007). Otra técnica de diagnóstico de laboratorio es la prueba de enflagelación considerada como la prueba de oro para su identificación, ya que se logra realizar la identificación diferencial contra otras amibas que afectan al SNC tales como *E. histolytica*, *Acanthamoeba* spp., y *Balamuthia mandrillaris* (Behets *et al.*, 2003). Esta técnica consiste en incubar el sedimento del LCR en agua destilada hasta que se observe la forma flagelada y así determinar que se trata de *N. fowleri* (Carter, 1970; Schuster & Visvesvara, 2004). La técnica más sensible para el diagnóstico de este protozoario es la PCR, ya que puede detectar hasta una sola amiba en la muestra utilizada (Sparagano, 1993; Reveiller *et al.*, 2002). Diferentes modalidades de PCR tales como tiempo real, anidada y multiplex han sido utilizadas en laboratorios de diagnóstico clínico y de investigación. Para la detección de *N. fowleri* en muestras ambientales, se ha desarrollado una PCR anidada basada en la detección del gen *Mp2Cl5*, el cual está relacionado a la virulencia de amiba (Reveiller *et al.*, 2002; Maclean *et al.*, 2004). Por otro lado, para mejorar el diagnóstico clínico se desarrolló una PCR multiplex en

tiempo real, donde se utilizaron sondas específicas para la subunidad ribosomal 18S, la cual fue capaz de detectar de manera simultánea entre *N. fowleri*, *B. mandrillaris* y *Acanthamoeba* en la misma muestra (Qvarnstrom *et al.*, 2006). Desafortunadamente, pese al desarrollo de estas técnicas más sensibles, no pueden ser aplicadas ampliamente por lo que la mayoría de las confirmaciones de los casos clínicos han sido realizadas mediante tinciones histológicas (H&E) en biopsias de cerebros post-mortem (Martinez & Visvesvara, 1991).

1.8. Tratamiento

Se conocen no más de una docena de casos de recuperación de pacientes infectados con *Naegleria fowleri*, donde se ha observado que este microorganismo es sensible al fármaco antifúngico Amfotericina B (AmB) (Schuster & Visvesvara, 2004). Esta droga aunque no es específica para tratar la infección con *N. fowleri*, ha resultado ser efectiva en 16 casos de recuperación. Cabe resaltar que en estos pacientes, el diagnóstico y tratamiento fue oportuno (Hannisch & Hallagan, 1997; Jain *et al.*, 2002; Vargas-Zepeda *et al.*, 2005; Martínez-Castillo *et al.*, 2016; Heggie & Kupper, 2017). En 1969 Rodney Carter observó que la AmB tenía un efecto amebicida contra *N. fowleri*, por lo tanto se ha convertido en la droga de elección contra la MAP hasta el momento (Carter, 1969). El mecanismo de acción de la AmB consiste en la alteración de las membranas celulares, debido a su gran afinidad por los esteroides, tanto de hongos como de células eucariontes, provocando la pérdida de iones potasio, así como de otros contenidos celulares (Brajtburg & Bolard, 1996). Esta droga se administra por vía intravenosa (IV) o intratecal (IT), y en combinación con otros antibióticos como sulfadiazina, rifampicina, azitromicina y otros antifúngicos, tales como ketoconazol, isoniazid y fluconazol (Duma *et al.*, 1971; Jain *et al.*, 2002; Schuster & Visvesvara, 2004; Heggie & Kupper, 2017). Cabe resaltar que no existe un fármaco específico para tratar la infección de *N. fowleri*, por lo tanto el desarrollo de nuevas drogas como el corifungin ha mostrado efectos amebicidas y de protección en el modelo del ratón, sin presentar los efectos secundarios que presenta la AmB (Debnath *et al.*, 2012). Como se ha mencionado previamente el tratamiento rápido y oportuno siempre deberá de estar acompañado de una historia clínica detallada del

paciente, para que la efectividad del mismo conlleve a la resolución rápida de la MAP.

1.9. Mecanismos de patogenicidad

Dentro del proceso infeccioso de un patógeno se ha reportado que el primer mecanismo que despliega el microorganismo es una alta capacidad de adhesión a los tejidos. *N. fowleri* no es la excepción, ya que se ha descrito una proteína de 60 kDa que es capaz de unirse fuertemente a la fibronectina de la matriz extracelular del hospedero (Han *et al.*, 2004). En el 2010 Cervantes-Sandoval y colaboradores reportaron la presencia de glicoconjugados de tipo manosa y fucosa en la superficie de *N. fowleri* y la especie no patógena *N. gruberi* respectivamente. Se observaron diferencias significativas en la expresión de ambas glicoproteínas en *N. fowleri*, sugiriendo así su capacidad citopática y de adhesión a células MDCK, ya que ambos fenómenos se inhibieron al agregar concentraciones crecientes de manosa y fucosa en los medio de interacción, concluyendo que estos glicoconjugados de superficie pudieran estar cumpliendo un papel como factores de virulencia de *N. fowleri*. Recientemente se ha descrito que *N. fowleri* posee una expresión diferencial de proteínas que tienen afinidad a colágeno tipo-I, fibronectina y laminina-I, en comparación con cepas no patogénicas (Jamerson *et al.*, 2012). La locomoción ameboidea de los trofozoítos de *N. fowleri* se considera como otro mecanismo con que cuenta este protozoario para poder invadir la mucosa olfatoria y así acceder al SNC (Fulton, 1977; Thong & Ferrante, 1986). Se sugiere que para que esta ameba pueda invadir tejidos, secreta enzimas proteolíticas (Martinez *et al.*, 1973b). Serrano-Luna y colaboradores en el 2007 caracterizaron las proteasas de *N. fowleri* y determinaron que la actividad proteolítica es llevada a cabo principalmente por cisteína proteasas, y en menor proporción por serina y metaloproteasas; así mismo el grupo de trabajo determinó que el pH de 7.0 y una temperatura de 37 °C son condiciones óptimas para la actividad de estas proteasas. Estos datos se correlacionan con las condiciones fisiológicas de los mamíferos (Serrano-Luna *et al.*, 2007). En años recientes se ha sugerido que estas proteasas son capaces de causar alteraciones en las uniones estrechas (UE) de los epitelios, pudiendo explicar la manera en que

este microorganismo puede migrar hasta los bulbos olfatorios (Shibayama *et al.*, 2013). Otra proteasa descrita en nuestro laboratorio con actividad mucinolítica es la mucinasa, la cual le puede servir a *N. fowleri* para evadir la respuesta inmune innata (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008a). Siendo en el año 2017 cuando se reportó que se trataba de una glicosil hidrolasa (Nf-GH), con capacidad de degradar mucina (Martínez-Castillo *et al.*, 2017). Por otro lado, se han reportado proteínas formadoras de poros, denominadas naeglerioporos A1 (10 kDa) y B1 (13 kDa), las cuales fueron obtenidas de extractos de *N. fowleri*, mostrando una elevada citotoxicidad en células humanas. Estas proteínas formadoras de poro fueron caracterizadas mediante espectrometría de masas, resolviendo una estructura similar a las proteínas de la familia SAPLIP (Saposin like proteins). Esta familia se caracteriza por contener hélices anfipáticas y tres puentes disulfuro formados por seis residuos de cisteína, lo que les confiere una estructura terciaria muy estable (Herbst *et al.*, 2002). Los miembros de esta familia también comparten la actividad antibacteriana y citolítica. Estas proteínas formadoras de poros originadas en las amibas de vida libre (AVL) representan el arquetipo de la familia “Saposina-like” con actividad citolítica y antimicrobiana. Por lo que se sugiere que los naeglerioporos dieron lugar a las moléculas efectoras en mamíferos como la NK-lisina (porcina) y granulisina (humana), ya que contienen de un 15 a un 30% de homología (Herbst *et al.*, 2004). Cursons y colaboradores (1978), reportaron en estudios *in vitro*, que las especies patógenas de *Naegleria spp.*, también poseen niveles elevados de lisofosfolípasa/fosfolípasa, en comparación con las especies no patógenas. La fosfolípasa A es una hidrolasa de membrana, la cual se ha relacionado con la degradación de la mielina humana (Barbour & Marciano-Cabral, 2001). Recientemente, con el avance de la biología molecular, se han podido identificar genes relacionados con la virulencia de *N. fowleri* como *nfa1*, el cual fue clonado a partir de librerías de cDNA y consiste en 357 pares de bases que se traducen en 119 aminoácidos, los cuales producen una proteína de 13.1 kDa (Cho *et al.*, 2003). Se determinó que este gen codifica para una proteína que se expresa hasta en un 60% durante la formación de las bocas fagocíticas, cuando los trofozoítos se ponen en contacto con células CHO (ovario de hámster chino) (Kang *et al.*, 2005). Otros

mecanismos de patogenicidad involucrados son la fagocitosis (Marciano-Cabral & Fulford, 1986; Scaglia *et al.*, 1991), la lisis contacto-dependiente (Marciano-Cabral & Fulford, 1986), la identificación de una proteína de choque térmico HSP70 (Song *et al.*, 2008), la formación de casquete o “capping” en la membrana plasmática amibiana, y la evasión de la respuesta inmune (Shibayama *et al.*, 2003).

2. Respuesta inmunológica

Como ya se describió anteriormente, *N. fowleri* además de poder adherirse a la mucosa nasal, destruir células mediante fagocitosis (trogocitosis) y liberar moléculas citolíticas, ha desarrollado mecanismos con los cuales puede evadir la respuesta inmunológica del hospedero. Se ha observado que *N. fowleri* es resistente a la lisis por moléculas citolíticas del hospedero como el TNF- α , IL-1 y el complejo de ataque a la membrana (MAC) C5b-C9 del complemento (Fischer-Stenger & Marciano-Cabral, 1992). El complemento es de las primeras líneas de defensa contra organismos invasores y es activado por los trofozoítos de *N. fowleri* (Whiteman & Marciano-Cabral, 1987); y dependiendo de la virulencia de la amiba tendrá mayor o menor sensibilidad (Reilly *et al.*, 1983; Whiteman & Marciano-Cabral, 1987). Estudios *in vitro* han mostrado que hay al menos dos maneras en que *Naegleria* resiste el daño causado por el complemento: 1) expresando proteínas reguladoras del complemento y 2) removiendo al complejo C5b-C9 e incorporándolo en vesículas (Toney & Marciano-Cabral, 1994). Esto sugiere que la inmunidad humoral innata juega un papel importante como primera línea de defensa a la invasión por *N. fowleri*. Por otro lado, también los neutrófilos y macrófagos responden a la infección por *N. fowleri* (Marciano-Cabral & Cabral, 2007). Michaelson y colaboradores (1990) reportaron que los neutrófilos activados *in vitro* con TNF- α se adhieren a *N. fowleri* hasta que la destruyen; de manera interesante el TNF- α por sí sólo no tiene efecto alguno sobre la amiba. También se ha reportado que los macrófagos son parte de las primeras líneas de defensa contra esta amiba, ya que los macrófagos activados funcionan como eficientes células citotóxicas frente a células tumorales y patógenos, produciendo óxido nítrico, así como mediadores no oxidativos como TNF- α e IL-1 (Clearly & Marciano-Cabral, 1986). En estudios *in vitro* utilizando células de la

microglia (macrófagos residentes del cerebro), se observó que también estas células poseen la capacidad de causar daño a *N. fowleri*, por lo que los autores sugieren que los macrófagos son de gran importancia en la defensa contra este organismo en la infección del SNC (Marciano-Cabral & Cabral, 2007). Se ha observado también que cuando se incuban trofozoítos de *N. fowleri* con células de la microglia *in vitro*, se producen grandes cantidades de mRNA de las citocinas proinflamatorias IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Oh *et al.*, 2005; Marciano-Cabral & Cabral, 2007). En resumen, se sabe que la microglia activada puede llevar a cabo una cascada de señales que inducen la expresión de citocinas, resultando en una fuerte respuesta inflamatoria la cual puede alterar la BHE propiciando el paso de las células inflamatorias hacia el cerebro (Marciano-Cabral & Cabral, 2007). En estudios histopatológicos de lesiones de cerebro humano producidas por *N. fowleri*, se observó un infiltrado inflamatorio que consistió en neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (Marciano-Cabral & Cabral, 2007). Estas observaciones en infecciones humanas se reprodujeron en el modelo del ratón, donde se observó que también los neutrófilos se presentaron en un número importante en las etapas tempranas de la infección, demostrando que la respuesta inflamatoria ejercida principalmente por células inflamatorias es un factor clave en el tiempo de desarrollo de la enfermedad (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b).

3. Barrera hematoencefálica (BHE)

Para poder invadir al SNC, *N. fowleri* debe de atravesar la BHE; la cual está compuesta por una red intrincada de microvasos que restringen el paso de ciertas sustancias hacia el cerebro. Estos vasos sanguíneos son necesarios para llevar oxígeno y nutrientes esenciales a órganos y tejidos en el cuerpo. Esta red vascular posee propiedades distintas, dependiendo del tejido de que se trate, lo que conlleva a una diferente permeabilidad vascular, tráfico de linfocitos, regulación del flujo sanguíneo, coagulación y tono vascular. La BHE es un término empleado para describir una serie de propiedades únicas que poseen los vasos sanguíneos en el SNC, los cuales tienen una alta regulación en cuanto al paso de moléculas y iones hacia el tejido nervioso (Daneman & Prat, 2015). Este concepto se deriva de observaciones experimentales realizadas por Paul Ehrlich en 1885 y posteriormente por Goldman en

1913, luego de aplicar colorantes directamente en el flujo sanguíneo. Estos experimentos realizados por Goldman mostraron que el azul tripano teñía todos los tejidos excepto el cerebro. Cuando el colorante se administraba por el LCR solamente se tiñó el cerebro, pero no los demás tejidos, dando evidencia de la existencia de algún tipo de compartimentalización entre el flujo sanguíneo y el LCR (Goncalves *et al.*, 2013). El desarrollo de la BHE es un proceso de varias etapas, que comienza con la angiogénesis, cuando los vasos preexistentes se ramifican en el neuroectodermo dando origen a nuevos vasos sanguíneos. Estas ramificaciones tempranas presentan varias características de la BHE, como la expresión de proteínas de UE y de moléculas transportadores de nutrientes. Estos vasos también contienen un gran número de vesículas de tránsito, y presentan alta expresión de moléculas de adhesión para leucocitos. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) tiene un papel fundamental en la angiogénesis embrionaria, ya que se ha observado que, en ratones deficientes de su receptor, el desarrollo de vasos sanguíneos en el cuerpo falla, provocando la muerte del embrión. En el cerebro embrionario, las células que se encuentran en el neuroectodermo subventricular producen VEGF, el cual promueve el crecimiento de vasos sanguíneos. La reducción o ausencia de este factor provoca baja densidad de microvasculatura y malformaciones particularmente en la corteza (Obermeier *et al.*, 2013). La alteración de la BHE se presenta en todas las patologías del SNC provocadas por traumas y/o infecciones que terminan en una respuesta inflamatoria, propiciando el paso libre de iones y moléculas, así como la infiltración de células de la respuesta inmunológica provocada también por la alteración de las UE. Esta ruptura debería de ser beneficiosa, ya que permitiría la entrada a las células inmunes para limpiar y reparar lesiones neuronales en el SNC, sin embargo, este proceso es altamente perjudicial para la salud del individuo (Obermeier *et al.*, 2013; Daneman & Prat, 2015). Entre otras patologías provocadas por la ruptura de la BHE, se encuentran las causadas por las especies reactivas del oxígeno (ROS) donde se incluyen la esclerosis amiotrófica lateral (ALS), esclerosis múltiple (MS) y los derrames cerebrales (Olmez & Ozyurt, 2012). El estrés oxidativo indica una cantidad excesiva de ROS. Estas especies reactivas contribuyen al daño de la BHE a través de diferentes mecanismos tales como, el daño oxidativo hacia moléculas de las células

(proteínas, lípidos y ADN), la activación de metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), la reorganización del citoesqueleto, la modulación de las proteínas de UE y la sobre-regulación de los mediadores inflamatorios (Pun *et al.*, 2009). Las metaloproteasas se han implicado en el daño a las proteínas de las UE, produciendo una BHE defectuosa que permite el paso de agentes neurotóxicos hacia las áreas afectadas (Gu *et al.*, 2012).

3.1. Componentes celulares de la BHE

La BHE está conformada por células neuronales, células vasculares y por componentes de la matriz extracelular, las cuales le proveen a esta barrera características especiales para restringir el paso de ciertas moléculas hacia el SNC. A esta organización se le conoce como unidad neurovascular, la cual será descrita a continuación. Tanto los capilares del SNC, así como otros tejidos, están conformados por células endoteliales que forman a los vasos sanguíneos, los cuales permiten el flujo de sangre hacia los tejidos. En la superficie abluminal del endotelio, el cual es un espacio entre la cara basal de las células endoteliales y la lámina basal, se encuentra una capa incompleta de pericitos (Armulik *et al.*, 2010) los cuales están rodeadas por una membrana basal compuesta por colágena, laminina y heparán sulfato (Tilling *et al.*, 2002). Los astrocitos son el tipo celular más abundante de la glía en el SNC, además se encuentran asociados a procesos neuronales como sinapsis neurológicas (Carmignoto & Gomez-Gonzalo, 2010; Zheng *et al.*, 2010). La asociación de las células neuronales, vasculares y de los componentes de la matriz extracelular se conoce como unidad neurovascular (Figura 4). Los macrófagos perivasculares residen entre las células vasculares y las terminaciones gliales, promoviendo la protección en la cara basal de los vasos (Williams *et al.*, 2012).

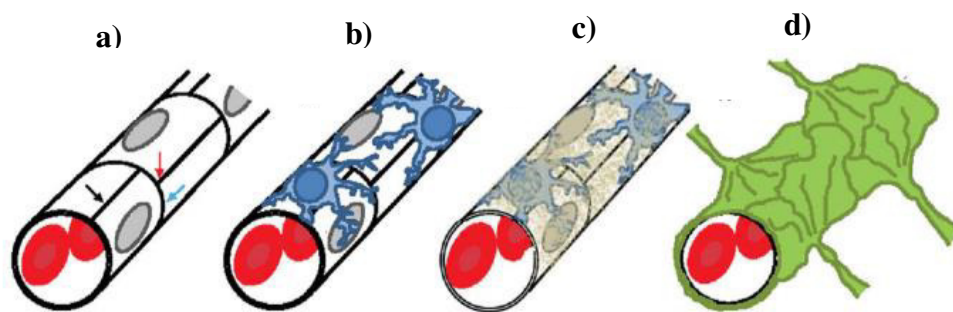


Figura 4. Representación esquemática de unidad neurovascular. a) las células endoteliales forman un tubo el cual permite el flujo sanguíneo. b) Los pericitos se adhieren a la superficie abluminal (espacio entre células endoteliales y lamina basal) de las células endoteliales. c) El tubo formado por las células endoteliales y pericitos se encuentra rodeado por una capa de la lámina basal, la cual se compone por proteínas de matriz extracelular secretadas por células neuronales y vasculares. d) Terminaciones de astrocitos en contacto con los vasos sanguíneos (Daneman, 2012).

3.2. Células murales

En la superficie abluminal de las células endoteliales se encuentran las células murales que son células de músculo liso vascular (MLV) y pericitos. Las células del MLV rodean completamente a los vasos sanguíneos formando capas delgadas en arterias y venas. En arterias y arteriolas, estas células poseen fibras de miosina las cuales promueven la vasodilatación y vasoconstricción del endotelio para el control del flujo sanguíneo (Aird, 2007) . Los pericitos se encuentran formando una capa incompleta en la cara abluminal del vaso sanguíneo, enviando proyecciones semejantes a dedos, las cuales se anclan a las células del endotelio a través de uniones mediadas por N-cadherina (Li *et al.*, 2011). Estas células están involucradas en la regulación de la angiogénesis, la remodelación vascular, el tono vascular, así como la formación y función de la BHE (Armulik *et al.*, 2011). Los pericitos son células derivadas del musculo liso que juegan un papel crucial en mantener la homeostasis cerebral. Se describieron por primera vez en poblaciones de células con

ramificaciones, con propiedades contráctiles y que rodean a las células endoteliales (Hurtado-Alvarado *et al.*, 2017). Cincuenta años después fueron renombradas como “pericitos” por Zimmerman de acuerdo con su localización anatómica: abluminal a las células endoteliales y luminal hacia las células del parénquima (Sa-Pereira *et al.*, 2012). Los pericitos expresan gran cantidad de marcadores de macrófagos tales como: CD14, CD11b, CD146, así como proteínas relacionadas con funciones inmunes, como el receptor del fragmento cristalizante (FcR) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II (Kamouchi *et al.*, 2011).

3.3. Lamina basal

La cara abluminal de los conductos vasculares en todos los tejidos, se encuentra recubierta por una lámina basal la cual funciona como una estructura de unión y de interacción para las células y moléculas de secreción (Del Zoppo *et al.*, 2006). Estas láminas se componen de cuatro componentes principales: colágena tipo IV, fibronectina, laminina y proteoglicanos de heparán sulfato. Los vasos sanguíneos del SNC se encuentran rodeados por dos capas de lámina basal: la membrana basal interna y la membrana basal externa (Sorokin, 2010). La membrana interna es producida por las células endoteliales y los pericitos; por otra parte, la membrana externa o parenquimal es producida por los astrocitos. Estas membranas tienen una composición diferente, la lámina endotelial está compuesta por laminina $\alpha 4$ y $\alpha 5$, mientras que la parenquimal es rica en laminina $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Wu *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2013).

3.4. Astrocitos

El astrocito es la célula glial que se encuentran en mayor proporción en el SNC, encargándose de complejos procesos celulares que involucran a la sinapsis, a los nodos de Ranvier y a los vasos sanguíneos. Morfológicamente los astrocitos son usualmente de forma estrellada, con una gran cantidad de proyecciones provenientes del cuerpo celular y con un tamaño aproximado de 140 μm en el cerebro humano (Oberheim *et al.*, 2009). Los astrocitos interactúan con las células de la microvasculatura endotelial a través de sus proyecciones, las cuales se anclan

alrededor de los capilares, propiciando el contacto con gran cantidad de microvasos y con las sinapsis entre neuronas. Juegan un papel importante en el transporte de oxígeno y glucosa hacia las neuronas a través de la regulación del flujo sanguíneo (Zonta *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2006). Se ha reportado que las proyecciones que envuelven a los vasos sanguíneos provenientes de los astrocitos expresan el canal de agua acuaporina-4, el cual es un importante regulador de la homeostasis del agua en el SNC (Haj-Yasein *et al.*, 2011). Estas células también participan en la formación de la barrera hematoencefálica, mejorando la formación de las UE, modulando la expresión y la polarización de proteínas transportadoras (Janzer & Raff, 1987; Abbott, 2013; Haseloff *et al.*, 2015). Además se sabe que diversos factores derivados de los astrocitos, tales como el factor neurotrópico derivado de glía (GDNF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y la angiopoietina-1 (ANG-1), inducen el comportamiento adecuado de la barrera hematoencefálica en las células endoteliales (Abbott *et al.*, 2006; Haseloff *et al.*, 2015).

3.5. Células del sistema inmune en la BHE

Existe una variedad de células del sistema inmunológico que interactúan con la BHE. Entre estas células se encuentran los macrófagos perivasculares, los cuales residen entre las proyecciones de los astrocitos y la pared de los vasos, y actúan como una línea de defensa fagocitando restos celulares, por lo que la falta de estas células aumenta el riesgo de meningitis (Polfliet *et al.*, 2001). Se ha observado la asociación de células cebadas a los vasos, en algunas regiones del SNC; sin embargo, aún no se conoce con claridad el papel que desempeñan como línea de defensa natural en la BHE (Wilhelm *et al.*, 2011). En el parénquima del SNC, se encuentra la microglia residente la cual pertenece al linaje monocítico. Estas células entran al SNC durante su desarrollo y se encargan del desarrollo neuronal, la respuesta inmune innata, promueve la recuperación del tejido y además pueden actuar como células presentadoras de antígeno (Ajami *et al.*, 2011). Se ha reportado que las células de la microglia interactúan con los vasos del SNC, y además son capaces de regular el paso de células inmunes a través de la BHE (Bechade *et al.*, 2013).

3.6. Células endoteliales

Muchas de las propiedades de la BHE se encuentran presentes en las células endoteliales que conforman a las paredes de los vasos sanguíneos. Las células endoteliales del SNC son diferentes a otras células endoteliales de tejidos no neuronales, ya que se encuentran altamente polarizadas y unidas por UE fuertes que limitan el movimiento de moléculas y iones entre las células (Westergaard & Brightman, 1973). La alta polarización de las células endoteliales localizadas en el SNC les permite desarrollar distintas propiedades de transporte, donde se incluyen transportadores de flujo de salida, los cuales son capaces de excluir toxinas lipofílicas, así como transportadores específicos, para liberar nutrientes a través de la BHE hasta el cerebro (Ueno *et al.*, 2010). Las moléculas hidrofílicas de gran tamaño son excluidas del SNC por las UE y por las membranas celulares. Esta propiedad hidrofílica predice si son capaces de atravesar la BHE (Daneman & Prat, 2015). De manera importante la superficie luminal del endotelio se encuentra cubierta por glicocálix, el cual actúa como una barrera selectiva de carga y tamaño que limita la interacción de moléculas y células con el endotelio (Van Teeffelen *et al.*, 2007).

3.6.1. Moléculas de adhesión celular

Es bien sabido que los organismos patógenos son capaces de activar a las células endoteliales a través de receptores membranales tales como TLR-4, resultando en la promoción de genes proinflamatorios que incluyen a citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión endoteliales como son VCAM-1 e ICAM-1 (Frigerio *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 2001; Liu & Malik, 2006; Clark *et al.*, 2007). Las proteínas VCAM-1 (CD106) e ICAM-1 (CD54) pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y realizan la función de promover la adhesión y el proceso de trans-migración por diapédesis en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral durante un proceso inflamatorio (Shimizu *et al.*, 1991; Rahman & Fazal, 2009; Muller, 2011). La proteína VCAM-1 (110 kDa) se caracteriza por poseer 7 dominios de inmunoglobulina y se expresa en vasos sanguíneos pequeños y largos (Steiner *et al.*, 2010). VCAM-1 es el ligando para las integrinas $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) y $\alpha_4\beta_7$. VLA-4 es capaz de unirse a VCAM-1, a través del primer y cuarto dominio tipo

inmunoglobulina. Esta proteína media la adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, al endotelio vascular (Shimizu *et al.*, 1991). La proteína ICAM-1 (80-115 kDa) es una proteína transmembranal con su amino terminal extracelular, así como un solo dominio transmembranal y su carboxilo terminal intracelular (Deckert-Schluter *et al.*, 1994). ICAM-1 es el ligando para la integrina LFA-1, presente en los leucocitos y media la adhesión y trans migración a través del endotelio vascular (Yu *et al.*, 2014). Se sabe que el parásito *Plasmodium falciparum* es capaz de inducir la expresión de estas proteínas endoteliales para facilitar su migración a través de la BHE, como un mecanismo de invasión hacia el cerebro (Deckert-Schluter *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2010). La sobreexpresión de VCAM-1 e ICAM-1 durante infecciones por protozoarios o virus puede estar dada por la activación de la vía NF- κ B, la cual promueve la transcripción no solo de estas moléculas de adhesión, sino también de otros mediadores inflamatorios tales como las citocinas IL-6 e IL-8 (Yu *et al.*, 2014).

3.6.2. Producción de óxido nítrico (ON)

El óxido nítrico (ON) posee diversas funciones, como la regulación del tono vascular, actúa como neurotransmisor, posee actividad antitumoral y antimicrobiana y forma parte del sistema inmunológico (Palmer *et al.*, 1987; Nathan & Hibbs, 1991; Albrecht *et al.*, 2003). El ON es producido a partir del átomo terminal de la L-arginina promoviendo su oxidación a L-citrulina. Esta reacción es catalizada por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasa (NOS) y se clasifican en tipo I neuronal (NOS1 o nNOS), tipo II inducible (NOS2 o iNOS) y tipo III endotelial (NOS3 o eNOS) (Bateman *et al.*, 2003). La NOS inducible es la responsable de la generación de concentraciones tóxicas de ON, las cuales se ven involucradas en la patogénesis de diversas enfermedades (Moncada *et al.*, 1991). Se sabe que el estrés oxidativo producido por el ON, la presencia de ROS y de mediadores inflamatorios conllevan al mal funcionamiento de la BHE (Briones *et al.*, 2002; Perez-Asensio *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2012).

4. Uniones estrechas (UE)

Los organismos complejos están compuestos por órganos que cumplen con funciones específicas que requieren del mantenimiento constante de su medio interno. Estos órganos se mantienen gracias a la acción de barreras formadas por epitelios y endotelios (Yu & Turner, 2008). Las células de estos tejidos se unen por un complejo de uniones intercelulares, donde se encuentran las UE. Las UE son regiones de la membrana plasmática diferenciadas bioquímica y estructuralmente, y localizadas en la parte más apical de la membrana lateral de la célula (Figura 5) (Cerejido *et al.*, 2000). Estas proteínas de la UE se encuentran cumpliendo funciones de compuerta y barrera en los epitelios y endotelios del organismo; ya sea permitiendo o restringiendo el paso sustancias por la vía paracelular (Kim, 1995; Yu & Turner, 2008). A la fecha se han descubierto una gran cantidad de nuevas proteínas, pero en general está formada por proteínas integrales de membrana, que se unen al citoesqueleto de actina, a través de proteínas corticales o de andamio. Adicionalmente, en esta estructura participan proteínas involucradas en el tráfico vesicular y hasta se han encontrado factores de transcripción, que permiten una comunicación con el núcleo. Las UE se describieron inicialmente en epitelios y endotelios; sin embargo, también se les encuentra en células mielinizadas y durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico (González-Mariscal *et al.*, 2003).

4.1. Proteínas transmembranales

Estas proteínas integrales se dividen en tres regiones (Cerejido *et al.*, 2000; González-Mariscal *et al.*, 2003):

- **Región extracelular.** Son moléculas o porciones de moléculas, que interactúan físicamente con moléculas semejantes de las células adyacentes o con componentes de la matriz extracelular.
- **Dominio transmembranal.** Sirve para conectar las proteínas externas con el citoplasma.
- **Zona submembranal.** Son componentes que median la interacción de los elementos transmembranales con las estructuras internas como el

citoesqueleto. Los componentes de esta zona no están directamente integrados en la bicapa lipídica.

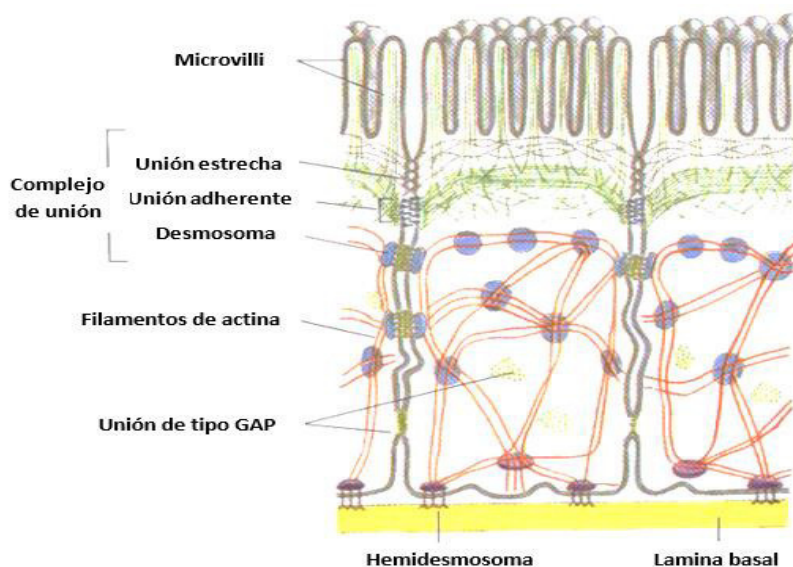


Figura 5. Localización y estructura molecular de las UE en células epiteliales (Niessen, 2007).

La clasificación más reciente de estas proteínas se muestra en la tabla 1. Hasta el momento las proteínas integrales más estudiadas son la ocludina (64 kDa) y la claudina (20-25 kDa). La ocludina fue la primera proteína integral de membrana que se identificó (Figura 6). Su nombre proviene de la denominación en latín de las uniones estrechas: *Zonula occludens* que significa región que ocluye (Furuse *et al.*, 1993). Actualmente se encuentra clasificada dentro del grupo de las TAMP's (Tight Junction-Associated Marvel Proteins) (Shen *et al.*, 2011). La participación de la ocludina en la formación de las UE se ha considerado muy importante, ya que tiene la capacidad de formar estructuras similares a las UE cuando estas son transfectadas en células que carecen de estas proteínas. Mediante la técnica de criofractura se logró observar a la ocludina entre las estructuras con forma de filamentos que conforman a las UE (Furuse *et al.*, 1998). Se tiene una gran cantidad de evidencias sobre la importante función que lleva a cabo la ocludina en las UE, ya que se sabe que la

sobre expresión de formas mutadas de ocludina en células epiteliales, da lugar a cambios en la función de puerta y barrera de las UE (Ikenouchi *et al.*, 2003). Estructuralmente esta proteína se caracteriza por poseer cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y su grupo amino (NH₂) y carboxilo terminal (COOH) se encuentran localizados en el citoplasma (Cerejido *et al.*, 1988; Shen *et al.*, 2011).

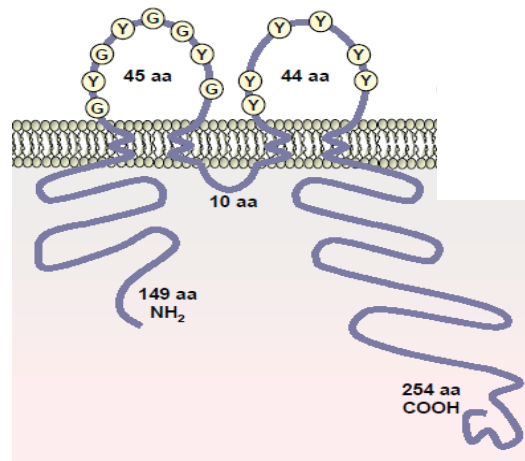


Figura 6. Representación esquemática de la proteína ocludina. Esta proteína posee cuatro pases transmembranales con dos dominios extracelulares y su región carboxilo y amino terminales se encuentran orientados hacia la región intracelular. Ambas asas extracelulares de la ocludina son de aproximadamente el mismo tamaño y poseen residuos cargados y ricos en tirosina (Y). Más de la mitad de los residuos de la primer asa, son ricos en tirosinas y glicinas (G) (González-Mariscal *et al.*, 2003).

La ocludina puede ser fosforilada por PKC en residuos de serina, treonina y tirosina confiriéndole un aumento en su peso molecular de 64 hasta los 82 kDa. En diversas líneas celulares de origen epitelial se ha observado que la proteína ocludina se encuentra altamente fosforilada en las UE y la ocludina fosforilada en menor cantidad se localiza en el citoplasma. La proteína ocludina es un claro constituyente de las UE y su abundancia se relaciona directamente con la capacidad de sellado del epitelio, del cual está formando parte (González-Mariscal *et al.*, 2003).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas integrales de las UE (Shen *et al.*, 2011).

Familia de la claudina	JAM's (Junctional adhesion molecules)
Claudinas (24 miembros)	JAM-1/JAM-A JAM-2/JAM-B JAM-3/JAM-C IGSF5/JAM-4
TAMP's (Tight Junction-associated Marvel proteins)	Familia de proteínas CAR (Coxsackievirus-adenovirus receptor)
Ocludina Tricelulina MarvelD3	CAR ESAM CLMP

Las claudinas (Figura 7) son las principales proteínas transmembranales de las UE, estas proteínas forman parte de la familia de las tetraspaninas con alrededor de 24 miembros (Cerejido *et al.*, 1993; González-Mariscal *et al.*, 2003; Betanzos *et al.*, 2013). Estas proteínas poseen cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y sus grupo amino (NH₂) y carboxilo terminal (COOH) se localiza en el citoplasma (Cerejido *et al.*, 2000). Todas las claudinas poseen un dominio PDZ en su carboxilo terminal, el cual permite la unión a las proteínas andamio ZO-1/2/3; esta asociación une indirectamente a las claudinas con el citoesqueleto de actina, regulando la función de las claudinas (Goncalves *et al.*, 2013). Por su parte las claudinas están divididas en dos subcategorías funcionales: 1) claudinas que incrementan la permeabilidad paracelular a través de la formación de canales paracelulares (claudinas formadoras de poros), y 2) claudinas que reducen la permeabilidad paracelular (claudinas formadoras de barreras) (Inai & Shibata, 2008; Krause *et al.*, 2008).

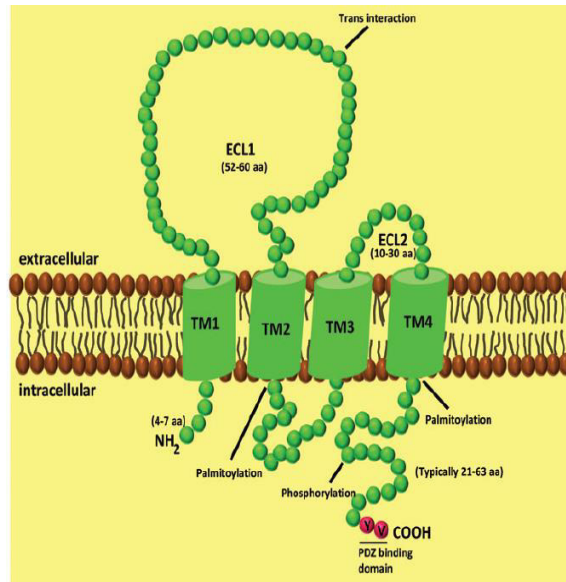


Figura 7. Representación esquemática de las claudinas. Estas proteínas poseen cuatro pases transmembranales con dos dominios extracelulares y sus regiones carboxilo y amino terminales se encuentran orientados hacia la región intracelular. La primera asa extracelular (ECL1) es más larga que la segunda (ECL2). Ambas asas contienen algunos residuos cargados, lo que tiene influencia directa en el paso de iones por el espacio paracelular (Goncalves *et al.*, 2013).

De las claudinas que son capaces de formar poros, la más caracterizada es la claudina-2 (*cldn-2*), descubierta en células MDCK (Madin Darby Canine Kidney), en donde se le adjudicó su fenotipo permeable por su capacidad de formar poros específicos para cationes monovalentes y agua (Rosenthal *et al.*, 2010). Entre otras claudinas formadoras de poros se encuentran las claudinas 7, 15, 16 y 10 (Van Itallie *et al.*, 2005). Entre las claudinas que son capaces de formar barrera están las claudinas 1, 3, 5, 11 y 19. Sin embargo, esta habilidad de las claudinas de formar una barrera no está presente en todos los tejidos (ejemplo: asas del riñón); como la claudina-5 (23 kDa), la cual puede presentar un fenotipo de barrera en el endotelio de la BHE, pero cuando se encuentra en los tejidos alveolares del pulmón, la capacidad de barrera disminuye (Overgaard *et al.*, 2011).

4.2. Proteínas submembranales

El dominio citoplasmático de las proteínas de unión trans-membranales se une a un complejo intracelular constituido por ZO-1 (225 kDa), ZO-2 (160 kDa) y ZO-3 (130 kDa) (Figura 8), las cuales pertenecen a la familia de las guanilato cinasas asociadas a membrana (MAGUK) (Van Itallie *et al.*, 1995). Los miembros de esta familia se caracterizan por: 1) localizarse en estructuras de unión celular especializadas, como la UE y las uniones septadas (el equivalente de las UE en los insectos); 2) estar constituidas por un conjunto de módulos o dominios, cuyo número y disposición se ha conservado a través de la evolución; y 3) reclutar proteínas y transducir señales que modulan el desarrollo embrionario normal y suprimen la formación de tumores (Kim, 1995). El nombre ZO proviene de la abreviatura de “zonula occludens”, el latín de la UE y la numeración 1, 2 ó 3 revela el orden con el que fueron descubiertas. Las proteínas ZO-1 y ZO-2 se asocian con proteínas involucradas en la regulación transcripcional de genes y con la proliferación celular (González-Mariscal *et al.*, 2014).

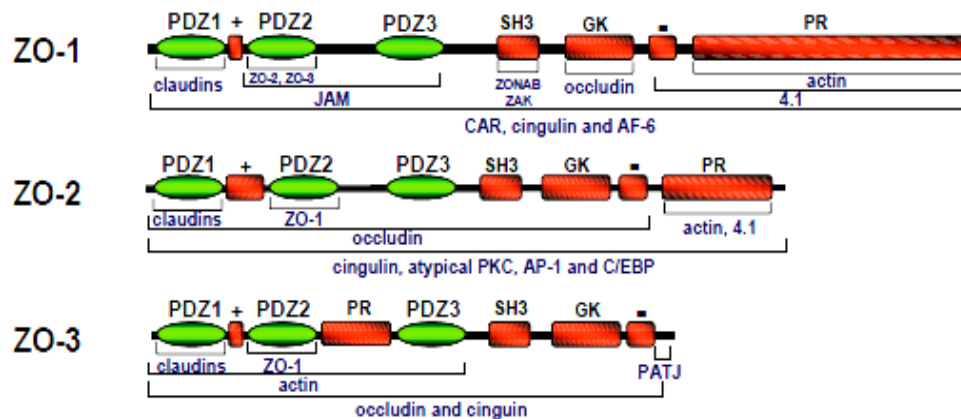


Figura 8. Representación esquemática de las proteínas ZO's. Estas proteínas poseen dominios PDZ de unión a claudina y ocludina y a otras proteínas ZO (González-Mariscal *et al.*, 2012).

Las proteínas ZO contienen una serie de dominios PDZ capaces de interactuar con otras proteínas ZO, claudinas y con el citoesqueleto, así como dominios GUK capaces de unirse a la ocludina, así como dominios capaces de unirse al citoesqueleto

de actina. Las proteínas ZO son andamios que establecen numerosas interacciones proteína-proteína como cinasas, fosfatasas y proteínas G pequeñas (González-Mariscal *et al.*, 2003). Las ZO's se localizan en las UE de las células epiteliales y endoteliales. Sin embargo, también están presentes en el citoplasma y en los contactos puntuales de células no epiteliales tales como astrocitos, células de Schwann, fibroblastos, glioma, sarcoma y en una línea celular de mieloma (Howarth *et al.*, 1992). La expresión de ZO-1 desempeña un papel fundamental en la fisiología de la UE; así, por ejemplo, se observa que existe más ZO-1 en los segmentos de alta resistencia en el riñón (túbulos colectores), que en los de alta permeabilidad (segmentos proximales) (González-Mariscal *et al.*, 2000a). Esta proteína contiene en su secuencia dos señales de direccionamiento nuclear y se encuentra localizada en el núcleo de células epiteliales sub-confluentes o en los contactos célula-célula inmaduros. Esta localización nuclear y la reciente observación de su unión al factor de transcripción (ZONAB), sugiere nuevos papeles para esta proteína como la regulación de la progresión del ciclo celular (Balda & Matter, 2009). ZO-2 contiene en su secuencia, señales de importación y exportación nuclear y es capaz de moverse entre el núcleo y la UE, de acuerdo al estado de confluencia del epitelio (Islas *et al.*, 2002). Por último, se tiene a la proteína ZO-3, la cual se identificó por su co-precipitación con ZO-1. Su secuencia contiene dos señales de localización nuclear (González-Mariscal *et al.*, 2000b).

4.3. Uniones estrechas en la BHE

Como ya se describió anteriormente, toda la información que existe de las UE proviene de trabajos realizados en células epiteliales, las cuales forman capas, forman barreras en tejidos y órganos, incluyendo al intestino, la vejiga y la epidermis entre otros (Furuse, 2010). Las células endoteliales se mantienen unidas mediante UE cuando éstas se pliegan sobre si mismas para formar un tubo (Figura 9) (uniones intra-endoteliales) o cuando se unen a células endoteliales contiguas (uniones inter-endoteliales) (Daneman, 2012). La proteína claudina-5 parece ser la más abundante en las uniones endoteliales de la BHE (Morita *et al.*, 1999; Díaz-Coránguez *et al.*, 2013; Goncalves *et al.*, 2013). También se ha detectado la presencia de claudina-1, 3

y 12; sin embargo, su función aún está por ser determinada (Nitta *et al.*, 2003; Daneman *et al.*, 2010; Liebner *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2013; Liebert *et al.*, 2013). La claudina-5 es una de las más abundantes en las células endoteliales de la BHE y es crítica para la regulación de la permeabilidad (Goncalves *et al.*, 2013). Cuando esta proteína fue silenciada mediante RNAs interferentes por Nitta y colaboradores (2003), la selectividad por tamaño en la BHE fue afectada, permitiendo la difusión de moléculas menores a 800 Daltones. La expresión de claudina-1 se pierde en la microvasculatura de los tumores cerebrales, mientras que la claudina-5 solo se regula de manera negativa, sugiriendo una relación entre la supresión de la claudina-1 y la alteración de las UE, lo que se relaciona con el aumento de la permeabilidad celular (Liebner *et al.*, 2000). Además de las claudinas, la ocludina juega un papel importante en la formación de la BHE. Se ha reportado que la ocludina se encuentra enriquecida en células endoteliales del SNC, en comparación con otros tejidos (Hirase *et al.*, 1997). Por último, pero no menos importante se encuentran las proteínas andamio ZO's, las cuales son necesarias en la formación de UE con funcionamiento óptimo. Esta proteína también ha sido identificada en células endoteliales de la BHE, confirmando el correcto arreglo de la UE (Yamada *et al.*, 2014). Esta proteína se ha visto afectada en patologías como la isquemia cerebral, la esclerosis amiotrófica lateral (ALS) y cuando hay una respuesta inflamatoria por parte de los astrocitos y células de la microglia (IL-1 β y VEGF), promoviendo el aumento de la permeabilidad celular y el mal funcionamiento de la BHE (Obermeier *et al.*, 2013).

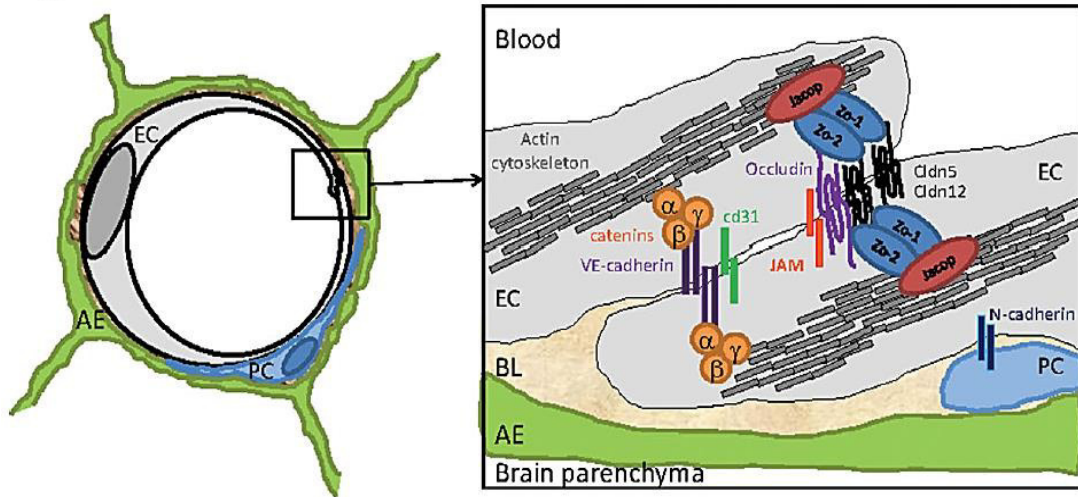


Figura 9. Representación esquemática de las UE presentes en los capilares de células endoteliales en el SNC. En estas estructuras se encuentran las proteínas: claudina-5 (cldn-5), claudina-12 (cldn-12), ocludina y ZO-1 y ZO-2, Jacop y JAM. Además se encuentran proteínas de las uniones adherentes como cadherinas y cateninas (Daneman, 2012).

5. ANTECEDENTES DIRECTOS

En trabajos de Martínez y colaboradores en 1973 mediante microscopía electrónica de transmisión en el modelo del ratón, se realizó la descripción morfológica de la migración de *N. fowleri* a través del neuroepitelio olfatorio hacia el SNC. El autor describe los cambios morfológicos generados por la invasión de *Naegleria* a través de las células del neuroepitelio olfatorio, afectando tanto a las células sustentaculares como a las nerviosas y a las basales. Se logró observar como la amiba se abre paso a través de las uniones intercelulares hasta llegar a lámina basal, rica en fibras de colágeno (tipo IV); en este proceso no se observaron células inflamatorias. Posteriormente se visualizaron amibas en los espacios mesaxonales de las células de Schwann que protegen a los manojos de los nervios olfatorios. Con lo que se concluye que por esta vía los trofozoítos llegan eventualmente a invadir el espacio subaracnoideo, los bulbos olfatorios y a las estructuras del SNC adyacentes. De manera interesante se observó también la presencia de amibas en vasos sanguíneos

del neuroepitelio olfatorio donde aparentemente aún se mantienen intactas las células endoteliales, con sus uniones intercelulares.

En años más recientes, caracterizaron algunos los eventos de la MAP en el modelo del ratón, con lo que se determinó el papel de la inflamación en el desarrollo de la infección. Para esto se utilizaron cepas de ratón C57/BL6J silvestre y “knockout” de CD38, así como en ratones BALB/c. Los autores observaron que los trofozoítos de *N. fowleri* alcanzan los bulbos olfatorios en el SNC posterior a las 72 h y aumentan su número a las 96 h post-infección, esto probablemente debido a su proliferación. En los bulbos olfatorios en estos tiempos no se observó reacción inflamatoria alguna o daño en el parénquima cerebral. A partir de las 96 h se observa que el proceso inflamatorio comienza con la llegada de leucocitos del tipo de los eosinófilos y neutrófilos, los cuales comienzan rodeando a la amiba. Además, se observó que los eosinófilos no afectan la viabilidad de *N. fowleri*, por lo que es probable que se promueva la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-8 y eotaxina). El medio ambiente inflamatorio, aunado a la lisis de células inflamatorias, conlleva a la necrosis del cerebro hasta terminar en la muerte del ratón. Los autores concluyen que la inflamación juega un papel muy importante en el desarrollo agudo de la MAP, ya que en los ratones C57/BL6J Knockout CD38 no son capaces de presentar la quimiotaxis de células inflamatorias, no se observó proceso inflamatorio, y se aumentó la sobrevivencia de los ratones (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b). Se sabe que *N. fowleri* puede producir e inducir la formación de óxido nítrico (NO), ya que en trabajos de Rojas-Hernández y colaboradores (2007) se encontró que anticuerpos dirigidos a los tres tipos de NOS humana (óxido nítrico sintasa): neuronal de 40 kDa (NOS1), inducible de 167 kDa (NOS2) y endotelial de 59 kDa (NOS3), detectaron estas formas mediante western blot en extractos totales de la amiba. Con esto, los autores concluyen que *N. fowleri* podría contener una isoforma de NOS diferente a la descrita en mamíferos, por lo que probablemente esté utilizando al ON como una molécula que participa en la invasión del SNC. Por otro lado, se sabe que algunos protozoarios pueden invadir al SNC a través de la BHE, pudiendo ser por la vía paracelular y por la vía transcelular, manteniendo así la estructura del endotelio o por medio del sistema inmunológico (caballo de Troya) donde también se ha observado

daño en el endotelio, resultando en la destrucción de la BHE (Elsheikha & Khan, 2010). Se ha reportado que la amiba de vida libre *Acanthamoeba castellanii*, posee la capacidad de degradar a la proteína ZO-1 y ocludina en cultivos primarios de células del endotelio microvascular de cerebro humano (HBMEC). En este daño está involucrada la vía dependiente de la cinasa Rho, la cual participa en la contracción del citoesqueleto de actina, lo que probablemente este propiciando la desorganización de los complejos proteicos que conforman a las UE, así como su degradación, facilitando el paso de la amiba por la ruta paracelular, a través del endotelio microvascular cerebral (Khan & Siddiqui, 2009). En trabajos realizados en nuestro laboratorio se encontró que *N. fowleri* es capaz de afectar a las proteínas de las UE en células epiteliales, consistiendo en la degradación en mayor proporción de claudina-1 y ZO-1 y en menor proporción a ocludina, en células de la línea MDCK. Además, se sugiere que la ocludina pudiera estar siendo degradada debido a la deformación del citoesqueleto de actina, ya que a tiempos posteriores de co-cultivo de *N. fowleri* con las células MDCK, el anillo cortical de actina se observaba desorganizado, ocasionando la deformación celular y así promoviendo la migración de la amiba por la vía paracelular en el neuroepitelio olfatorio, hasta llegar a la BHE (Shibayama *et al.*, 2013). Por otro lado, la amiba *Entamoeba histolytica* también es capaz de dañar las UE de las células epiteliales (MDCK) y entéricas (T84), fosforilando a ZO-2 y degradando a ZO-1, aumentando así la permeabilidad paracelular (Leroy *et al.*, 2000). En el 2013 Betanzos y colaboradores describieron que el complejo EhCPADH112 de *E. histolytica* es capaz de unirse y degradar a las proteínas claudina-1, ocludina y ZO-1/2 propiciando la caída de la RET en células MDCK (Betanzos *et al.*, 2013). Otros protozoarios que son capaces de atravesar la BHE por la ruta paracelular son *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma* spp., *Toxoplasma gondii*, *Babesia* spp. y la amiba de vida libre *Balamuthia mandrillaris* (Tabla 2), propiciando la producción de citocinas proinflamatorias, ON y en el caso de *Balamuthia* dañando el endotelio mediante la acción de proteasas (serina y metaloproteasas) y citotoxicidad dependiente de contacto (Elsheikha & Khan, 2010).

Tabla 2. Protozoarios que afectan la integridad del endotelio vascular cerebral y el mecanismo involucrado en el proceso migración a través de la BHE.

Organismo	Mecanismo	Proteína involucrada	Referencia
<i>Plasmodium falciparum</i>	Citoadherencia	ICAM-1	(Turner <i>et al.</i> , 1994)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Migración paracelular	ICAM-1 y VCAM-1	(Deckert-Schluter <i>et al.</i> , 1994)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Citoadherencia Migración paracelular	Proteínas de unión a manosa (MBP) y Serina proteasas	(Garate <i>et al.</i> , 2004; Sissons <i>et al.</i> , 2004)
<i>Balamuthia</i> spp.	Citoadherencia Migración paracelular	Proteínas de unión a galactosa (GBP) y Metaloproteasas	(Matin <i>et al.</i> , 2006; Rocha-Azevedo <i>et al.</i> , 2007)
<i>Neisseria meningitidis</i>	Migración paracelular	Metaloproteasas	(Schubert-Unkmeir <i>et al.</i> , 2010)

De acuerdo con la información antes mencionada sobre *Naegleria*, una vez que esta amiba se ha instalado en el neuroepitelio olfatorio, puede continuar su migración hacia el cerebro mediante los nervios olfatorios. Otra vía probable de invasión de *N. fowleri* podría ser por los microvasos presentes en el epitelio olfatorio, como se observó en los reportes de Martínez y colaboradores (1973), o por vía de la microvasculatura presente en el espacio subaracnoideo antes de entrar al SNC, facilitando la invasión a los bulbos olfatorios debido a su proximidad y así desestabilizando a la BHE principalmente a nivel de las UE. Esto probablemente por la expresión de moléculas de adhesión, la producción de citocinas proinflamatorias y de ON, por parte de las células endoteliales que conforman a la BHE.

Por lo tanto, nosotros estamos interesados en estudiar si *N. fowleri* es capaz de dañar a las células endoteliales que conforman a la BHE y debilitar las UE. Para ello evaluamos el efecto citopático de trofozoítos de *N. fowleri* en un cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de rata (RBMEC). Posteriormente, realizamos ensayos de western blot, microscopia confocal, medición de la RET, para evaluar si las amibas son capaces de alterar las propiedades de barrera en el cultivo primario de células endoteliales cerebrales. Por otro lado, también analizamos la activación de las células endoteliales inducida por los trofozoítos de *N. fowleri*, evaluando la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1), la producción de las citocinas IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70, IL-6 e IL-10 y de ON.

6. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la literatura, es bien sabido que *N. fowleri* es capaz de atravesar el neuroepitelio olfatorio a través de las uniones intercelulares de las células sustentaculares en la cavidad olfatoria y abrirse paso a través de la fila olfatoria hasta llegar a los bulbos olfatorios en el SNC. Otra vía probable de invasión de *N. fowleri* podría ser por los microvasos presentes en el epitelio olfatorio, o por la microvasculatura presente en el espacio subaracnoideo, antes de entrar al SNC.

Hasta la fecha se desconocen las alteraciones producidas por este microorganismo en la BHE. Debido a lo anterior, es de nuestro interés caracterizar las alteraciones en la BHE principalmente a nivel de las UE, por la producción de citocinas proinflamatorias y ON, en un cultivo primario de células endoteliales que semejan a la BHE.

7. HIPÓTESIS

N. fowleri es capaz de alterar a las proteínas de las UE de la BHE, además de promover la expresión de moléculas de adhesión, citocinas proinflamatorias y ON.

8. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las alteraciones producidas por trofozoítos de *N. fowleri* en un modelo *in vitro* de BHE.

8.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterización del modelo de la MAP experimental en rata.
- Establecer el cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral (RBMEC) y el cultivo primario de astrocitos de rata.
- Evaluar el efecto citopático de los trofozoítos y de los productos de secreción (PS) de *N. fowleri* en el cultivo primario de células endoteliales.
- Determinar las posibles alteraciones en las proteínas de las uniones estrechas de las células RBMEC.
- Evaluar la expresión de moléculas de adhesión, así como la producción de citocinas y ON en el cultivo primario de células endoteliales post-interacción con *N. fowleri*.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Cultivo amibiano

Se utilizó la cepa patógena de *Naegleria fowleri* ATCC 30808. Las amibas fueron cultivadas axénicamente en medio líquido de Bactocasitona (BD Biosciences, CA, USA) al 2%, suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Microlab, Ciudad de México, México) al 10%. Se incubaron a 37°C, posteriormente se cosecharon y procesaron durante la fase logarítmica de crecimiento (48 h).

9.2. Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP) experimental en el modelo de la rata

Ratas Wistar de 2 semanas de edad fueron utilizadas para establecer el modelo experimental de la MAP. Las ratas fueron ligeramente anestesiadas en una cámara de éter y posteriormente instiladas con 5×10^5 trofozoítos en medio de Bactocasitona al 2%, sin SFB. Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas en los tiempos de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h y 7 días post-infección (PI) y los cráneos sin piel fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.23. Por un lado, los cráneos de las ratas sacrificadas en los tiempos de 3, 6, 12 y 24 h fueron descalcificados en una solución de EDTA al 8% durante 2 semanas a 4°C con cambios cada 24 h. Por otra parte, a los 7 días PI, se obtuvieron solamente los bulbos olfatorios de los animales. Las muestras fijadas fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol (70-100%) durante 1 h en cada solución, hasta llegar a mezclas de alcohol-xilol (100%/100%) y xilol absoluto (100%). Posteriormente, las muestras deshidratadas fueron incluidas en parafina durante 4 h. Por último, las muestras incluidas fueron colocadas en moldes cuadrados y se dejaron solidificar. Una vez que la parafina solidificó en los cubos, se realizaron cortes de 5 μ m, los cuales fueron montados en portaobjetos silanizados (3%). Posteriormente, las muestras fueron procesadas para la tinción de hematoxilina & eosina (H&E). La tinción de H&E se basa en la reacción entre los ácidos nucleicos y el colorante alcalino hematoxilina, observándose una coloración azul-púrpura; por otro lado, el colorante aniónico eosina interacciona con estructuras alcalinas, observándose distintos tonos de rosa (Enciu *et al.*, 2013). El procesamiento consiste

en desparafinar los cortes durante toda la noche en una estufa a 60°C para posteriormente ser rehidratados con xilol, alcohol absoluto y alcohol al 96%. Después, las muestras fueron lavadas con agua corriente, se aplicó la hematoxilina de Harris durante 7 min y se enjuagaron con agua corriente. Se colocó en alcohol ácido durante 10 seg. Se lavaron con agua corriente y se sumergieron en carbonato de litio. Se realizaron lavados con agua corriente y alcohol al 80% durante 1 min. Una vez realizados estos lavados, los cortes fueron teñidos con eosina durante 15 seg y posteriormente las muestras fueron deshidratadas con alcohol al 96%, alcohol absoluto y xilol. Finalmente, los cortes fueron montados con resina y posteriormente observados a través de un microscopio óptico Nikon eclipse 80i (Nikon, Minato, Japan). Todos los animales fueron manejados de acuerdo con lo establecido en las regulaciones federales para el cuidado y manejo de animales de experimentación mexicanas (NOM-062-ZOO-1999) y utilizando el protocolo de animales de laboratorio autorizado por el Comité Institucional de Manejo y Cuidado Animal del Cinvestav (CICUAL-Cinvestav). Las ratas fueron sacrificadas utilizando una sobredosis de Pentobarbital sódico (Pet's Pharma de México S.A. de C.V., Nezahualcóyotl, México) y manejadas de acuerdo con el panel de eutanasia AVMA 2000.

9.3. Inmunohistoquímica en el modelo de la MAP

El procesamiento consiste en desparafinar los cortes durante toda la noche en una estufa a 60°C, para posteriormente ser hidratados con xilol, alcohol etílico (99.5 a 80%), después se realizó un lavado con agua corriente durante 5 min. Las muestras se sumergieron en PBS 1X durante 5 min. Se realizó la recuperación antigénica colocando las muestras en la autoclave a 121°C en amortiguador de citratos 0.01 M pH 6.0 durante 10 min. Terminado el tiempo de autoclave, las muestras se dejaron enfriar y fueron enjuagadas con PBS 1X pH 7.23. A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena con metanol-peroxidasa durante 1 h. Se realizaron lavados con PBS 1X y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con leche al 10% (Svelty) disuelta en PBS por toda la noche a 4°C. Posteriormente las muestras fueron lavadas con PBS 1X. El anticuerpo primario de ratón anti-*N. fowleri* fue utilizado en la

dilución 1:20 e incubado en SFB al 3% en PBS durante toda la noche a 4°C. Terminada la incubación, las muestras fueron lavadas con PBS 1X y el anticuerpo secundario de chivo anti ratón acoplado a peroxidasa (-HRP) (Invitrogen, CA, USA) (dilución 1:50) fue incubado durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con PBS 1X durante 5 min. Se adicionó el sustrato para la peroxidasa que es la diaminobenzidina (DAB) en peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (dilución 1:10) durante 10 min. Se realizaron lavados con PBS y se contra coloreo con hematoxilina durante 8 min. La hematoxilina fue enjuagada con agua corriente y posteriormente se realizaron lavados con PBS. Por último, se procedió a deshidratar las muestras con concentraciones crecientes de alcohol y xilol y fueron montadas con resina epóxica. Las laminillas fueron observadas a través de un microscopio Nikon eclipse 80i.

9.4. Cultivo primario de células endoteliales RBMEC

Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral de rata (RBMEC) se aislaron a partir de ratas Wistar de 2 semanas de edad, siguiendo el procedimiento previamente descrito por Molino y colaboradores (2014). Se removieron las meninges y el cerebro fue cortado en porciones pequeñas, las cuales se procesaron con un homogeneizador de cristal en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco, MA, USA). La mielina fue separada por centrifugación a 3500 rpm por 20 min, en un gradiente de percoll (Sigma-Aldrich, MO, USA) al 30%. Posteriormente, se retiró la fracción superior compuesta de mielina para conservar la fracción inferior con los capilares, a la cual se le realizaron dos lavados con DMEM/F12. La pastilla se recuperó para ser digerida con una mezcla de colagenasa/disypasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, I.N., 11097113001) 60 µg/ml y desoxiribonucleasa 1 (DNAsa tipo 1) (35 µg/ml) (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 37°C durante 45 min. La reacción enzimática fue detenida con medio DMEM/F12 con SFB y centrifugada a 1500 rpm por 5 min. La microvasculatura fragmentada fue colectada luego de ser centrifugada 1500 rpm durante 5 min, para posteriormente ser cultivada en cajas de cultivo de 25 cm² y cubreobjetos recubiertos con una mezcla de fibronectina/colágena a una concentración de 1 µg/cm². Las células endoteliales fueron crecidas en DMEM/F12 con 20% de plasma derivado de

suero (PDS) (11-090423, Animal Technologies Inc., T.X., USA), 10 ng/ml bFGF (basic fibroblastic grow factor) (PrepoTech, NJ, USA), 200 mM GlutaMAX (Gibco, MA, USA), 100 µg/ml heparina (Pisa Farmacéutica S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México), 2.5 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, MO, USA), antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml), y 1 µg/ml de fungizona (Gibco, MA, USA). En las primeras 24 h de cultivo, se agregaron 4 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich, MO, USA) para eliminar a las células no deseadas. Para los experimentos de efecto citopático, las células fueron sembradas en cajas de 24 pozos. Para los ensayos de RET las células fueron sembradas en filtros transwell (Merck-Millipore, MA, USA). Para los ensayos de microscopia confocal, las células fueron sembradas en cubreobjetos silanizados.

9.5. Cultivo primario de astrocitos de cerebro de rata

Los astrocitos fueron obtenidos a partir de cerebros de rata Wistar macho sanos, de 2 semanas de edad, de acuerdo con lo reportado en el protocolo de Molino y colaboradores en el año 2014 (Molino *et al.*, 2014). Estas células servirán para mantener a los cultivos primarios de las células endoteliales ya que proveen en su medio condicionado, factores necesarios para mantener su crecimiento. Los cerebros fueron homogenizados en una solución de tripsina 0.05%/EDTA 0.02% (Gibco, MA, USA; J.T. Baker, NJ, USA) en un homogeneizador de cristal e incubados en un tubo de 50 ml durante 15 min a 37°C. Para detener la reacción enzimática se agregó DMEM/F12 con SFB 10% (Microlab, Ciudad de México México). El homogenado fue centrifugado a 1500 rpm durante 5 min. La pastilla formada se resuspendió en 10 ml de DMEM/F12 con SFB al 10% con antibiótico penicilina/estreptomina (100 U/ml/100 µg/ml). La suspensión fue sembrada en cajas de cultivo de 75 cm² a 37°C. Se realizó el cambio de medio a las 24 h para eliminar el debris celular y posteriormente, se realizó el cambio de medio cada tercer día. Una semana después de haber realizado el aislamiento, la mezcla de células gliales en la caja de cultivo fue colocada en agitación durante 24 h a 37°C en medio de cultivo de astrocitos. Después, el medio de cultivo fue decantado y se realizaron lavados con PBS estéril pH 7.23, para remover a las células no adheridas a la superficie de cultivo y propiciar solo el

crecimiento de los astrocitos. Para corroborar que contábamos con un cultivo puro de astrocitos, se sembraron astrocitos en cubreobjetos silanizados y se procesaron para evaluar mediante microscopia confocal al marcador específico para astrocitos, la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) (Invitrogen, CA, USA).

9.6. Efecto citopático de los trofozoítos y de los productos de secreción de *N. fowleri* sobre el cultivo de RBMEC

Para realizar las interacciones con las células RBMEC, se utilizaron cultivos que tenían una confluencia del 90%. Posteriormente las amibas fueron despegadas de las cajas de cultivo durante 30 min en hielo con PBS estéril pH 7.23, se realizó el ajuste de las amibas para realizar las interacciones con las células RBMEC en una relación de tres células por cada amiba (3:1) (1.3×10^5 RBMEC: 66×10^4 RBMEC), para luego ser centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min. La pastilla formada fue resuspendida en medio DMEM/F12 sin PDS y las interacciones fueron realizadas durante 1, 3, 6 y 10 h en una incubadora a 37°C, con una atmosfera de CO₂ al 5%. Los productos de secreción (PS) fueron obtenidos a partir de los sobrenadantes de 5×10^6 trofozoítos incubados en 3 ml de medio sin SFB durante 24 h. Los sobrenadantes fueron recuperados y centrifugados a 2000 rpm durante 5 min y filtrados a través de una membrana de 0.22 µm de poro (Merck-Millipore, MA, USA) y almacenados a -20°C hasta su uso. Los PS fueron ajustados a la producción de 5×10^4 trofozoítos y mezclados con DMEM/F12 sin PDS y co-incubados con las RBMEC a 37°C durante 1, 3, 6 y 10 h. Como controles se utilizaron RBMEC incubadas sin trofozoítos y con trofozoítos fijados. Terminados los tiempos de interacción para todas las condiciones, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS estéril pH 7.23 durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron las monocapas con PBS estéril y posteriormente fueron observadas a través de un microscopio invertido (Nikon, TMS, JAPAN). Posteriormente, el efecto citopático fue cuantificado mediante la tinción con azul de metileno. Se tiñeron las monocapas durante 10 min con azul de metileno al 1% en solución amortiguadora de boratos 0.1 M pH 8.7 (80 ml ácido bórico 12.4 g/l; 120 ml de tetraborato de sodio 19.1 g/l) (Sigma-Aldrich, MO, USA). Se lavó 3 veces el colorante con el

amortiguador de boratos. Posteriormente se adicionó ácido clorhídrico 1 N (Sigma-Aldrich, MO, USA) durante 30 min a 37°C, para recuperar el colorante que adquirió la monocapa. El colorante extraído fue leído en un espectrofotómetro (Epoch, Biotek, USA) a una longitud de onda de 660 nm. Los datos de absorbancia de las monocapas interaccionada con trofozoítos fueron comparados con las monocapas control, para posteriormente ser graficadas mediante el software GraphPad Prism. Los datos representan el promedio \pm de la desviación estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes. El valor de p fue calculado con el análisis de ANOVA de una vía ($*p < 0.05$).

9.7. Daño endotelial debido a las proteasas de *N. fowleri*

Para analizar el efecto de las proteasas de *N. fowleri*, los trofozoítos y los PS fueron pre-incubados por separado durante 45 min a temperatura ambiente con el inhibidor de cisteína proteasas E-64 (10 μ M) y el inhibidor de serina proteasas Aprotinina (6 μ M) (Roche, Basel, Suiza) en medio sin SFB. Como controles, se utilizaron las monocapas de las células endoteliales incubadas con los trofozoítos, con los PS y con los trofozoítos en ausencia de inhibidores durante 10 h. Posteriormente, las monocapas fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS y observadas a través de microscopia de luz (Nikon TMS, Nikon, JAPAN). El efecto citopático se cuantificó con la tinción de azul de metileno como se mencionó anteriormente. Los datos de absorbancia fueron graficados con el software GraphPad Prism. Los datos representan el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. El valor de p fue calculado mediante el análisis de ANOVA de una vía ($*p < 0.05$).

9.8. Medición de la resistencia eléctrica transendotelial (RET)

Las células RBMEC fueron sembradas en filtros semipermeables Millicell de 8 μ m de poro de 1.12 cm² de diámetro (Merck-Millipore, MA, USA) y colocadas en placas de 12 pozos (Corning-Costar, NY, USA). Una vez que las células alcanzaron una resistencia de 240 Ω cm², se realizaron las interacciones con los trofozoítos de *N. fowleri*, a una relación 3:1. Como controles, se tomaron los valores de RET de RBMEC incubadas con amibas fijadas, monocapas sin amibas y de monocapas

incubadas con 25 mM de NaOH (JT Baker, NJ, USA). Los valores de RET fueron tomados durante 0, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 180 y 360 min. Las mediciones se realizaron con un voltímetro EVOM (World Precision Instruments, FL, USA). Antes de introducir los electrodos en las cajas de cultivo, estos fueron limpiados con etanol al 70% y enjuagados con PBS estéril. Uno de los electrodos fue sumergido en la cámara superior, mientras que el otro electrodo quedó inmerso en la cámara inferior. La resistencia fue registrada en Ohm's (Ω) y reportada como porcentajes relativos a la máxima resistencia de las monocapas sin interaccionar. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism. Los datos representan el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. El valor de p fue calculado con el análisis de ANOVA de una vía ($*p < 0.05$).

9.9. Análisis de la localización de las proteínas de UE de células RBMEC co-cultivadas con trofozoítos de *N. fowleri*, a través de microscopia confocal

Se cultivaron células RBMEC en cubreobjetos forrados con la mezcla de fibronectina/colágena IV (Sigma-Aldrich, MO, USA) y se co-incubaron con trofozoítos de *N. fowleri* durante 5, 15, 30 y 60 min a una relación 3:1 en DMEM/F12 sin PDS. Finalizados los tiempos de interacción, se retiró el medio de interacción y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 20 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS estéril para eliminar el fijador durante 5 min cada vez. Las células fueron permeabilizadas con tritón X-100 (Sigma-Aldrich, MO, USA) al 0.2% en PBS estéril durante 30 min, y se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada lavado. Las muestras fueron bloqueadas con albúmina al 1%, durante 60 min a 37°C. Transcurrido el tiempo de bloqueo se eliminó la albúmina, nuevamente con tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Posteriormente, las células se incubaron durante 2 h a 37°C con los anticuerpos primarios contra las proteínas de las UE: de ratón anti-occludina (dilución 1:25), de conejo anti-claudina-5 (dilución 1:20) y de conejo anti-ZO-1 (dilución 1:20) (Invitrogen, CA, USA). Para marcar a los trofozoítos, se empleó un anticuerpo casero de ratón anti-*N. fowleri* (dilución 1:25). Concluido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS. Posteriormente, las muestras se incubaron con los

anticuerpos secundarios fluoresceinados de chivo anti-conejo (dilución 1:50) (Invitrogen, CA, USA) y acoplado a CY5 de chivo anti-ratón (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), durante 1 h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados durante 5 min cada uno con PBS. Para el marcaje de los núcleos, se empleó yoduro de propidio al 0.001% durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se montaron en portaobjetos con el medio de montaje Vecta Shield (Vector Laboratories, CA, USA) y se sellaron con barniz transparente. Las muestras se almacenaron en oscuridad a 4°C para conservar la fluorescencia. Finalmente, se realizó el análisis de las muestras mediante un microscopio confocal LEICA TCS SP8 (Leica Microsystems, Glattbrugg, Suiza).

10. Inhibidores de proteasas para los extractos totales de células RBMEC

Para la preservación de los extractos totales de la interacción de las células RBMEC con trofozoítos de *N. fowleri*, se utilizó un cocktail de inhibidores de proteasas como se describe a continuación. Para cisteína proteasas: 10 mM de ácido parahidroximercuribenzoico (PHMB), 5 mM de N-etil maleimida (NEM) (Sigma-Aldrich, MO, USA) y 10 mM de L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano (E-64) (Roche, Basel, Switzerland). Para serina proteasas: 5 mM de fenilmetilosulfonilfluoruro (PMSF), 6 mM de Aprotinina (Sigma-Aldrich, MO, USA). Para metaloproteasas: 2 mM de ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) (JT Baker, NJ, USA).

10.1. Evaluación del daño a las proteínas de las UE

Para la evaluación de la posible degradación de las proteínas de la UE, las células RBMEC se interaccionaron con los trofozoítos de *N. fowleri* en medio sin SFB durante 30 min, 1, 3, 6 y 10 h. Posteriormente, se retiró el medio y se agregó PBS pH 7.4 y las preparaciones se colocaron en hielo por 15 min para despegar a las amibas adheridas a la monocapa. A continuación, las células se lisaron con amortiguador de lisis (150 mM NaCl, 1% (v/v) Tritón X-100 y Trizma base 50 mM pH 8.4 (Sigma-Aldrich, MO, USA) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas. El lisado recuperado se dejó en agitación en vortex durante 4 h a 4°C y posteriormente, fue

centrifugado a 15 000 rpm por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976). Se tomaron 60 µg de extractos totales de las interacciones y de monocapas no interaccionada con los trofozoítos. Estas muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 7.5% (ZO-1), 10% (occludina) 12% (actina) y 15% (claudina-5). El protocolo de corrimiento electroforético fue el siguiente: 80 voltios (V) durante 15 min y 100 V durante 180 min. Se realizó la electro-transferencia a membranas de poli fluoruro de vinilideno (PVDF) (Merck-Millipore, MA, USA) por 90 min a 400 miliamperes (mA) a 4°C. Terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche descremada (Svelty) al 10%, en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS-tween 20 al 0.05% (Sigma-Aldrich, MO, USA) durante 5 min. Para incubar la membrana con los anticuerpos primarios para las proteínas de las UE las diluciones fueron las siguientes: conejo anti-ZO-1 (1:500), conejo anti-claudina-5 (1:500) y ratón anti-occludina (1:500) (Invitrogen, CA, USA); y como control de carga se utilizó actina, la cual fue detectada con un anticuerpo de ratón anti-actina (1:500), durante 2 h a 37°C. La membrana se lavó 4 veces con PBS-tween 20 al 0.05% frío durante 5 min cada lavado. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP) de chivo anti-conejo y anti-ratón (Invitrogen, CA, USA) ambos a una dilución 1:1000 durante 1 h a temperatura ambiente. Para el revelado de la asociación antígeno-anticuerpo se utilizó una solución de luminol-peroxidasa (1:1) (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA). Las imágenes de las membranas reveladas fueron obtenidas con un fotodocumentador (BioRad, CA, USA) y el análisis densitométrico se realizó con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) y fue expresado como densidad óptica relativa (DOR). Los datos fueron graficados con el programa GraphPad Prism y representan el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. El valor de *p* fue calculado con el análisis de ANOVA de una vía (**p*<0.05).

10.2. Inducción de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 de las células RBMEC por *N. fowleri*

Para evaluar la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, el cultivo primario de RBMEC sembrado en los cubreobjetos fue interaccionado con trofozoítos de *N. fowleri* en medio de cultivo sin PDS durante 15 min, 30, 1 y 3 h. Como control positivo de inducción se utilizó lipopolisacárido (LPS) en una concentración de 20 µg/ml (Sigma-Aldrich, MO, USA) y adicionado en medio DMEM/F12 sin PDS en las células RBMEC durante 3 h. Como control negativo de inducción, se incubaron las RBMEC en medio DMEM/F12 sin PDS durante 3 h. Terminados los tiempos de ensayo, se realizaron tres lavados con PBS frío y estéril para eliminar el medio de interacción y posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS pH 7.23 durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS frío y estéril para eliminar el fijador durante 5 min. Las células se permeabilizaron con tritón X-100 (Sigma- Aldrich, MO, USA) al 0.2% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, y se realizaron tres lavados con PBS. Las muestras se bloquearon con albumina al 1% (Equitech-Bio, USA), durante 60 min a 37°C. Transcurrido el tiempo de bloqueo se eliminó el exceso de albumina, realizando tres lavados con PBS frío de 5 min cada uno. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 2 h con los anticuerpos primarios de conejo anti-VCAM-1 (dilución 1:50) (Invitrogen, CA, USA) y de conejo anti-ICAM-1 (dilución 1:50) (Invitrogen, CA, USA). Para marcar a los trofozoítos, se empleó un anticuerpo ratón anti-*N. fowleri* (dilución 1:20). Concluido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS frío y estéril. Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios: de chivo anti-conejo-FITC (verde) (dilución 1:100) y anti-ratón-CY5 (azul) (dilución 1:50) durante 1 h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS estéril durante 5 min. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio al 0.001% durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje Vecta Shield y se sellaron con barniz transparente. Las muestras fueron almacenadas en oscuridad y a 4°C para conservar la fluorescencia. Finalmente, las muestras se analizaron utilizando un microscopio confocal LEICA TCS SP8 (Leica Microsystems, Glattbrugg, Suiza). Se cuantificó la fluorescencia observada para VCAM-1 e ICAM-1 con el programa ImageJ y fue

representada como la corrección de la fluorescencia celular total (CTCF) y graficada con el programa GraphPad Prism. Los datos representan el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. El valor de p fue calculado con el análisis de ANOVA de una vía ($*p<0.05$).

10.3. Cuantificación de la producción de citocinas por las células RBMEC inducidas por trofozoítos de *N. fowleri*

Se realizó la cuantificación de las citocinas producidas por las células endoteliales interaccionadas con los trofozoítos de *N. fowleri* durante 30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h. Como control positivo de inducción se utilizó LPS 20 μ g/ml (Sigma Aldrich, MO, USA) y fue incubado en DMEM/F12 sin PDS con las células RBMEC durante los tiempos previamente mencionados. Posteriormente, se recuperaron los sobrenadantes de las interacciones y las citocinas se evaluaron empleando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biosciences, USA). Este kit se basa en la utilización de perlas fluorescentes acopladas a anticuerpos específicos para las siguientes citocinas: IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70, IL-6 e IL-10. Los sobrenadantes de interacción fueron incubados con las perlas acopladas a los anticuerpos específicos para cada citocina, posteriormente se agregó el reactivo de detección (ficoeritrina), formando un complejo tipo sándwich (perla + citocina + reactivo de detección). Estos complejos se detectaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo BD FACSCelestaTM (BD Biosciences, CA, USA). Los datos de intensidad media de fluorescencia se obtuvieron a través del programa KaluzaTM (Beckman-Coulter, Life Sciences, IN, USA) y se graficaron mediante el programa GraphPad Prism. Los valores representan el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. El valor de p fue calculado mediante el análisis de ANOVA de una vía ($*p<0.05$).

10.4. Cuantificación de la producción de ON por las células RBMEC interaccionada con trofozoítos de *N. fowleri*

Para cuantificar la producción de ON en los sobrenadantes de interacción de RBMEC con *N. fowleri* (relación 3:1) obtenidos durante 30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h, se utilizó un

kit de detección de óxido nítrico (Abcam, CAM, UK) basado en colorimetría. Primero se realizó una curva estándar de nitritos y nitratos, mezclando 5 µl del estándar 100 mM, con 495 µl del amortiguador de prueba para obtener un stock de trabajo 1 mM. Se utilizó una placa de 96 pozos de fondo plano, donde se añadieron 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µl del estándar y se ajustó a un volumen final de 85 µl con el amortiguador de prueba para tener las concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pozo del estándar de nitritos o nitratos. Posteriormente, se procedió a preparar las muestras y los estándares. Para el blanco se tomaron 5 µl de la muestra y se ajustaron a 200 µl con el amortiguador de prueba.

Tanto para los estándares (curva) y las muestras problema se añadió:

- 5 µl de la mezcla de nitrato reductasa en cada pozo
- 5 µl del cofactor de la enzima en cada pozo

Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h para llevar a cabo la conversión de nitrato a nitrito. Por último, se añadieron 5 µl del potencializador a cada pozo y fueron incubados durante 10 min. Para evidenciar la presencia de los nitritos se agregaron 50 µl del reactivo de Griess R1 (ácido sulfanílico) y 50 µl del reactivo de Griess R2 (sulfanilamida) y la mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para el desarrollo del color (esta reacción es estable por alrededor de 1 h). Posteriormente, la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro Epoch (BioTek, USA) a una longitud de onda de 540 nm. La fórmula para obtener la concentración de nitratos/nitritos es la siguiente:

$$\text{Concentración nitrato/nitrito} = \left[\frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}}{\text{Pendiente de la curva}} \right] \div (\mu\text{l de muestra})$$

Como controles se utilizaron, monocapas de RBMEC incubadas sin amibas e incubadas con 20 µg/ml de lipopolisacárido (LPS) y monocapas incubadas solo en medio DMEM F/12 sin PDS. Los datos de absorbancia fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism 5.0. Los datos representan el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. El valor de *p* fue calculado con el análisis de ANOVA de una vía (**p*<0.05).

11. RESULTADOS

11.1. Proceso de invasión de *N. fowleri* en el modelo de la rata

Para evaluar si la rata es un modelo susceptible a la infección *N. fowleri* se instilaron ratas Wistar macho de 2 semanas de edad. Secciones histológicas de la región del neuroepitelio olfatorio (NO) de ratas Wistar, muestran una capa continua compuesta por un epitelio pseudoestratificado. Los plexos nerviosos (PN) se encuentran constituidos, en la zona de la submucosa por manojos de nervios olfatorios o fila olfatoria (FO), los cuales se comunican con las neuronas presentes en los bulbos olfatorios (BO) (Figura 10A). De igual manera también se obtuvieron imágenes donde se muestran a los BO, se observa como la FO atraviesa entre la lámina cribosa hasta conectarse a la zona glomerular e interconectarse a la capa de células mitrales y a su vez a la zona granular (Figura 10A). En los cortes histológicos de los animales instilados con 5×10^5 trofozoítos de 3 h PI, se observó que la continuidad del NO se perdió, además de presentar pequeñas zonas de ulceración. Una gran cantidad de amibas fue observada entre las células sustentaculares, presentes en el NO. Se observó que la morfología de la lámina propia fue modificada; se observó la hiperplasia de las glándulas de Bowman, así como un infiltrado inflamatorio en esta zona (Figura 10B). A las 12 h PI, los trofozoítos de *N. fowleri* fueron observados en los BO rodeados de una importante respuesta inflamatoria (Figura 10C). A las 24 h PI, la presencia de las amibas fue más evidente y el daño en el tejido cerebral fue evidente (Figura 10D). A las 48 h PI, las células inflamatorias incrementaron en número, y los trofozoítos se observaron cercanos a los focos inflamatorios (Figura 10E). Los principales tipos celulares observados en estos focos fueron principalmente macrófagos y algunos neutrófilos.

En algunas zonas, las amibas fueron encontradas cerca de los vasos sanguíneos (Figura 10E). A las 72 h PI, una gran cantidad de amibas fueron observadas en los BO, así como importantes áreas necróticas (Figura 10F). Macrófagos y células polimorfonucleares fueron observadas rodeando a las amibas (Figura 10F). También en este tiempo de infección se observaron eritrocitos, células inflamatorias y trofozoítos en el espacio subaracnoideo (ES) (Figura 10G). Este espacio está

localizado entre la meninge aracnoides y el hueso del cráneo (Figura 10G). Finalmente, a los 7 días PI, la reacción inflamatoria aumento notablemente, así como las zonas hemorrágicas, la cantidad de amibas y las áreas necróticas en los BO (Figura 10H). Estos resultados nos permiten recomendar el uso del modelo de la rata para reproducir la MAP, de manera similar a lo reportado en el ratón, así como en los casos humanos.

Para corroborar la presencia de las amibas en el cerebro de la rata, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en los tiempos de 6, 24, 48 y 72 h. Después de 6 h PI, los trofozoítos fueron observados entre las células sustentaculares en el NO de la rata (Figura 11A), en los tiempos tardíos de 24 a 72 h se observó la presencia de las amibas en color café, así como respuesta inflamatoria en los BO (Figura 11B-D). También a las 72 h PI como se observó por H&E, corroboramos la presencia de las amibas en el espacio subaracnoideo en los cráneos de las ratas (Figura 11E).

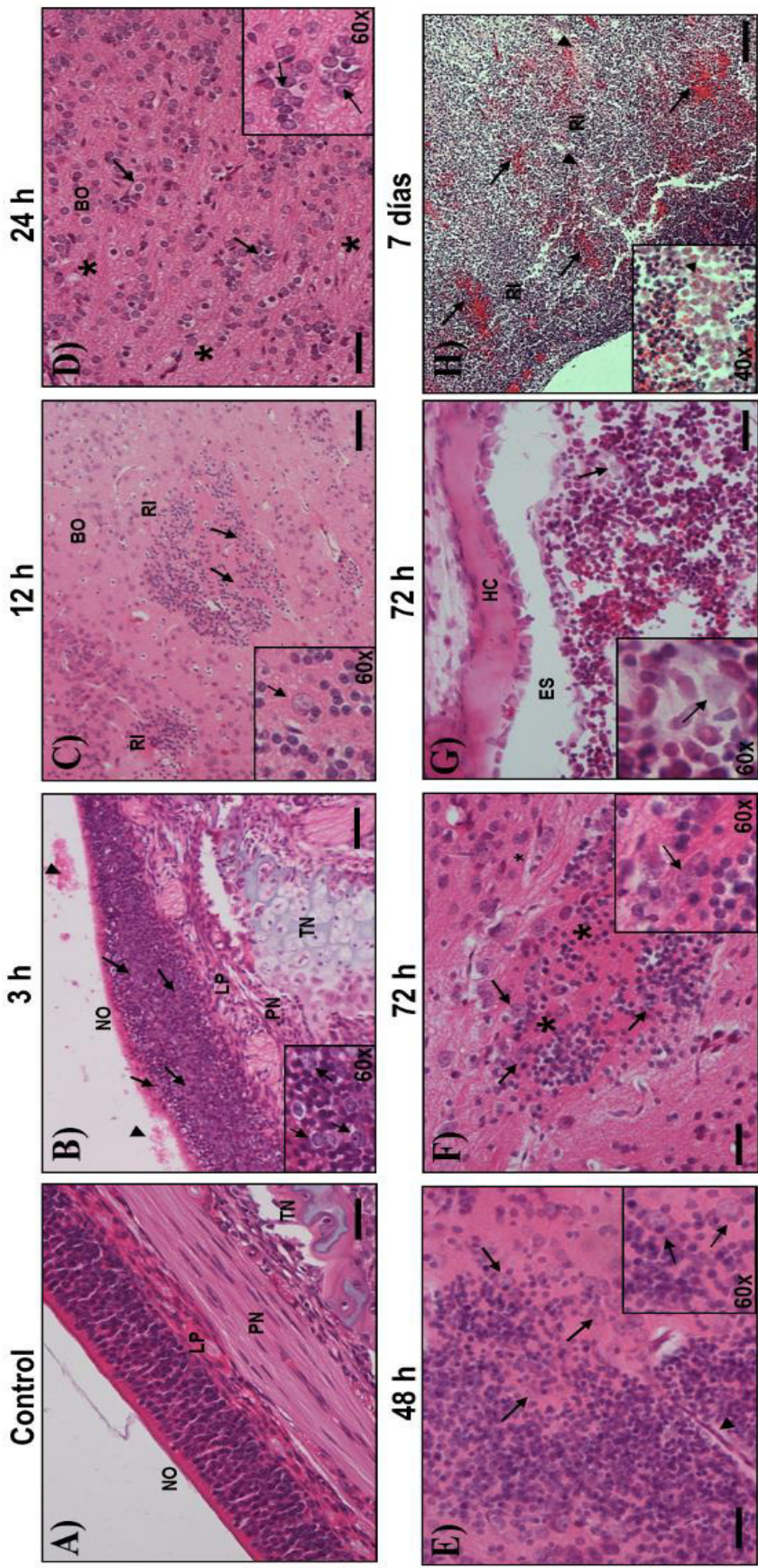


Figura 10. Meningoencefalitis ambiana primaria (MAP) en la rata. A) Sección histológica teñida con H&E de ratas sin amibas, donde se observa el neuroepitelio olfatorio (NO), la lámina propia (LP), los plexos nerviosos (PN) y el hueso de las turbinas nasales (TN). B) Sección del NO a las 3 h PI con trofozoítos de *N. fowleri* (flechas); pérdida de la continuidad del NO (cabeza de flecha). C) A las 12 h PI, se observan amibas (flechas), reacción inflamatoria (RI) en los bulbos olfatorios (BO). D) A las 24 h PI, se observan amibas (flechas) así como áreas de necrosis en los BO (asteriscos). E) A las 48 h PI, las células inflamatorias incrementan y los RI incrementa (flechas). El espacio subaracnoideo (ES) se observa cercano a los vasos capilares (cabeza de flecha). F-G) A las 72 h PI, se observan células inflamatorias, eritrocitos y trofozoítos (flechas). H) A los 7 días PI, se observan zonas de hemorragia (flechas), una intensa reacción inflamatoria (RI) y presencia de amibas (cabeza de flecha) en los BO. Barra= 50 µm.

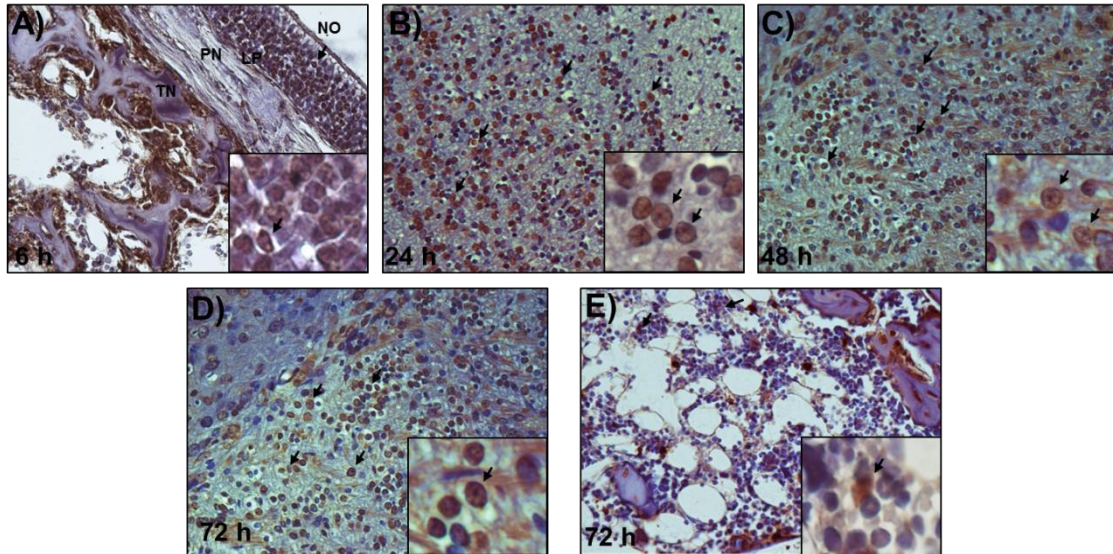


Figura 11. Inmunohistoquímica contra *N. fowleri* en el modelo de la rata. A) Sección del neuroepitelio olfatorio (NO) a las 6 h, observándose amibas en color café entre las células sustentaculares (flecha). B-D) Secciones de los BO's (24, 48 y 72 h), donde se observa la presencia de las amibas (flechas), así como la presencia de células inflamatorias. E) A las 72 h, se observan amibas (flecha) en color café en el espacio subaracnoideo. Barra= 50 μ m

11.2. Establecimiento del cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral (RBMEC) y de los astrocitos de rata

Una vez que establecimos la MAP en la rata, se decidió establecer los cultivos primarios de RBMEC y de astrocitos provenientes de la rata para evaluar la interacción de las amibas con la BHE en condiciones *in vitro*. Los resultados que obtuvimos fueron congruentes con los observados en el protocolo establecido por Molino y colaboradores en 2014, observando la adherencia de los capilares al sustrato de fibronectina/colágena, así como el crecimiento de las células endoteliales fuera de los capilares en el primer día de cultivo (Figura 12C). Observamos células con una morfología de tipo alargada y estableciendo uniones con las células adyacentes, formando una monocapa en el día 12 de cultivo con una confluencia del 90% aproximadamente (Figura 12D). A partir de estas monocapas de células endoteliales confluentes se realizaron los experimentos siguientes.

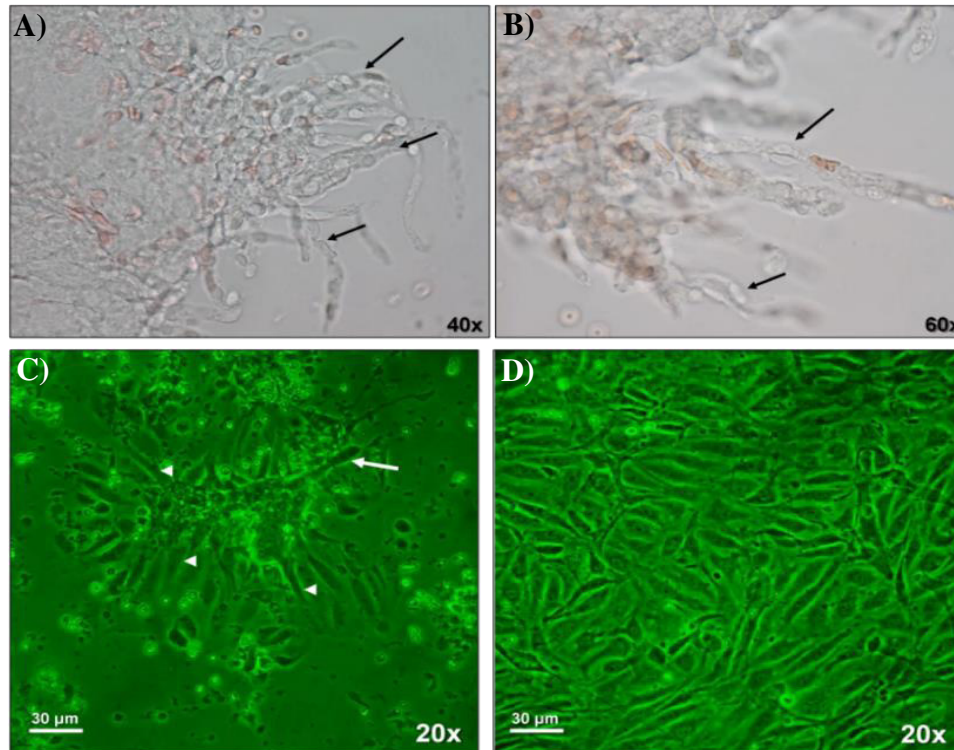


Figura 12. Establecimiento del cultivo primario de RBMEC de rata. A-B) Paquete de capilares de cerebro de rata (flechas) obtenidos mediante gradiente de percoll y observados por microscopia de luz. C) Capilares adheridos al sustrato de fibronectina/colágena (flecha) al tercer día de cultivo. Se observan células endoteliales creciendo fuera de los capilares (cabezas de flecha). D) Monocapa de RBMEC al décimo día de cultivo. Barra= 30 μm .

Por otro lado, en el modelo *in vitro* de BHE reportado por Molino *et al.* (2014), se utiliza un cultivo primario de astrocitos para propiciar el óptimo crecimiento y maduración de las células endoteliales para así presentar un fenotipo más parecido a las condiciones fisiológicas de la BHE. En nuestros resultados observamos a los astrocitos adheridos a las cajas de cultivo (Figura 13A) y continuaron su crecimiento hasta formar una monocapa a los 30 días de cultivo. La pureza del cultivo primario de los astrocitos fue corroborada realizando inmunomarcajes utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína gliofibrilar ácida (GFAP). Los resultados nos mostraron que nuestro cultivo primario estaba compuesto por astrocitos (Figura 13B). Por lo tanto, con estos cultivos primarios establecidos podemos conformar el modelo *in vitro* de BHE para llevar a cabo los ensayos siguientes con *N. fowleri*.

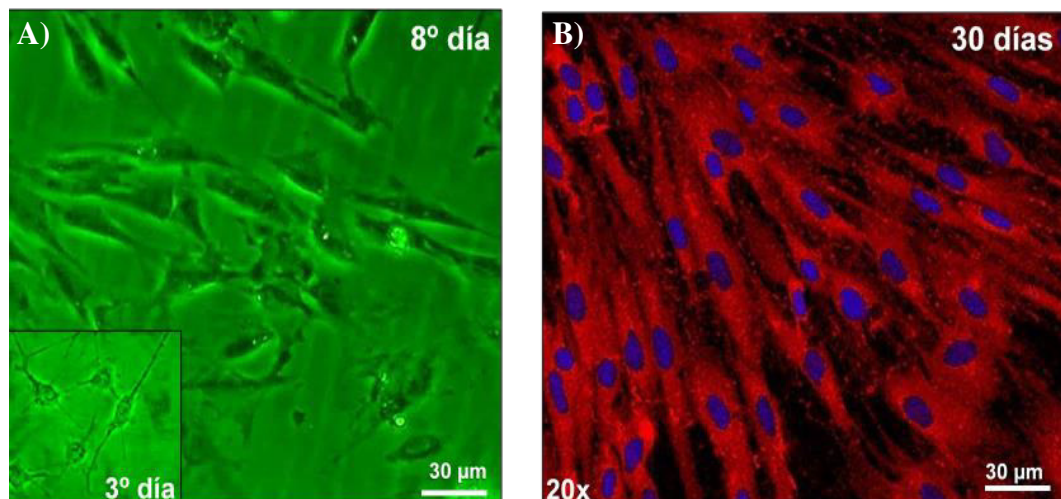


Figura 13. Cultivo primario de astrocitos de rata. A) Astrocitos en el tercer y octavo día de cultivo observados mediante microscopía de luz. B) Astrocitos marcados contra la proteína GFAP (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul), imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. Barra= 30 μm.

11.3. Estandarización de la relación de interacción de trofozoítos de *N. fowleri* con las células RBMEC

Para determinar el efecto citopático producido por *N. fowleri* sobre los cultivos primarios de células endoteliales provenientes de cerebro de rata, se estandarizaron las relaciones de interacción que fueron 1:1, 1:2 y 1:3 durante 1, 3, 6 y 10 h. Las interacciones se llevaron a cabo en medio DMEM/F12 sin PDS. Se utilizaron como controles en todos los tiempos células RBMEC sin interactuar con trofozoítos de *N. fowleri* y células interaccionadas con trofozoítos fijados. En todas las relaciones excepto en los controles, se observó daño desde 1 h PI hasta las 10 h PI, mostrando zonas de lisis celular, así como huecos en la monocapa (Figura 14). Observamos que la relación 1:3 de interacción con las células RBMEC el efecto citopático fue en menor proporción comparado con las otras relaciones estudiadas (1:1 y 1:2). Por lo tanto, encontramos que la relación 1:3 fue la relación de interacción ideal para llevar a cabo la evaluación del daño a las proteínas de las UE, así como para el análisis de la activación de las células endoteliales en interacción con *N. fowleri*, ya que nos permite evaluar los fenómenos que ocurren en la monocapa de RBMEC en tiempos largos sin perder a estas células del cultivo.

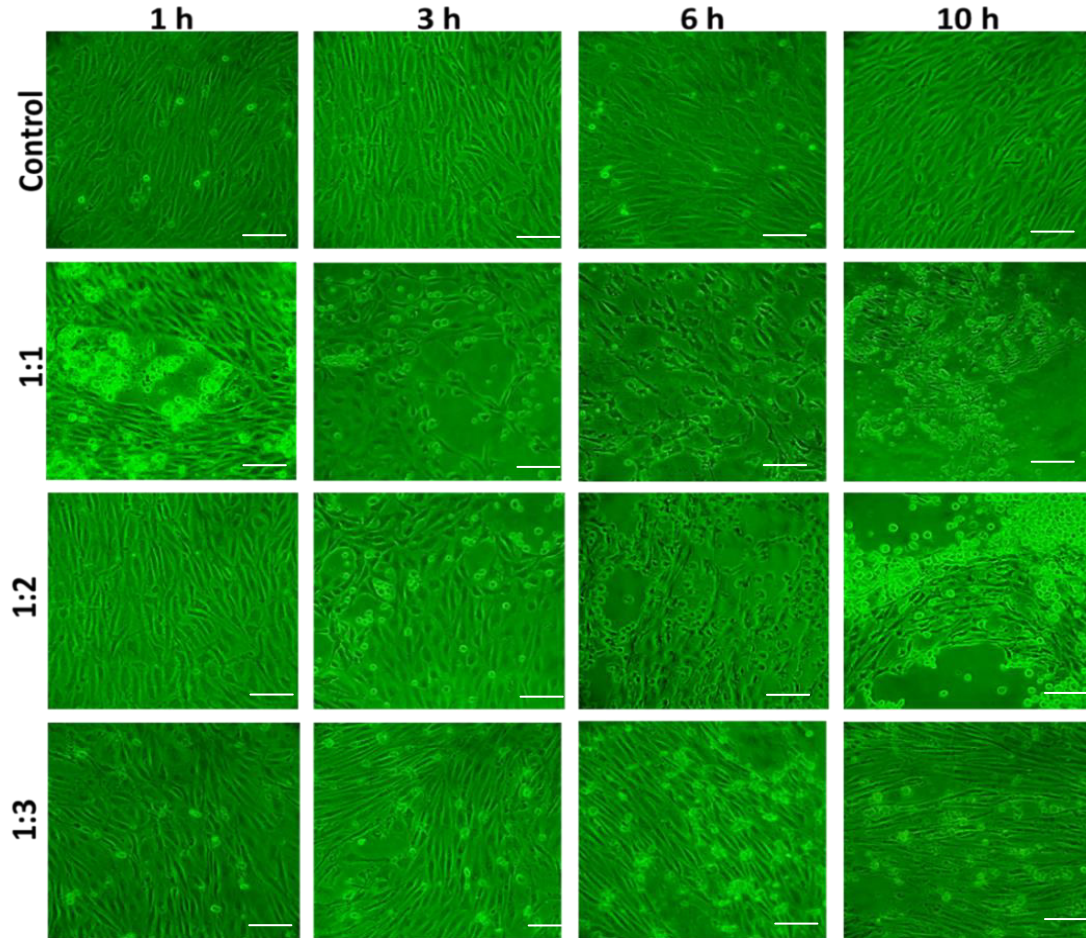


Figure 14. Estandarización de la relación de interacción de trofozoítos vivos de *N. fowleri* con las células RBMEC durante 1, 3, 6 y 10 h. Interacciones en las relaciones 1:1, 1:2 y 1:3 (amiba/RBMEC). Barra= 30 μ m.

11.4. Efecto citopático sobre las células RBMEC producido por trofozoítos de *N. fowleri*

Para determinar el daño producido por *N. fowleri* sobre las RBMEC en la relación 1:3, se realizaron experimentos para evaluar la morfología y el efecto citopático usando la tinción de azul de metileno. Nuestros resultados mostraron que los trofozoítos comienzan a adherirse a las RBMEC para producir la discontinuidad de la monocapa endotelial después de 1 h de co-incubación (Figura 15I). Después de 3 h, las áreas líticas incrementaron, y las células endoteliales presentaron signos de daño (Figura 15J). A las 6 h, algunas células mostraron vacuolización y a las 10 h la integridad de la monocapa se perdió como resultado del incremento de las zonas

líticas (Figura 15K-L). También fue evaluado el efecto de los PS de *N. fowleri* en las RBMEC, ajustando la proporción de PS a las amibas en la relación 1:3. Las monocapas fueron incubadas con los PS en los tiempos de 1 hasta 10 h. Los resultados mostraron que el daño a las células endoteliales comenzó desde la primera hora de co-incubación, observándose como el desprendimiento de las células del sustrato en la caja de cultivo. Efecto que fue más fuerte al producido por los trofozoítos vivos (Figura 15M). Luego de 3 h, el daño celular y las áreas líticas incrementaron, algunas células presentaron vacuolas en su citoplasma y comenzaron a redondearse (Figura 15N). Estos cambios aumentaron a las 6 h (Figura 15O). Después de 10 h de co-incubación, las zonas de lisis incrementaron de manera importante, y las células perdieron su forma alargada (Figura 15P). Como controles, se utilizaron RBMEC sin amibas (Figura 15A-D) y RBMEC co-incubadas con trofozoítos fijados (Figura 15E-H). Los resultados mostraron que las monocapas mantuvieron su integridad en ambas condiciones control en los tiempos evaluados. Para cuantificar el efecto citopático se utilizó la tinción de azul de metileno (Figura 15Q). Con los trofozoítos fijados, el valor de absorbancia fue similar al control de RBME sin trofozoítos a las 10 h, indicando que no hubo efecto citopático. En contraste con la disminución de los valores de absorbancia, observados cuando las RBMEC fueron incubadas con trofozoítos vivos comparado con los controles. Los resultados para las RBMEC incubadas con los PS arrojaron un efecto citopático mayor al observado con los trofozoítos completos a las 10 h de co-incubación. Con estos resultados podemos concluir que los trofozoítos y sus PS son capaces de producir daño sobre los cultivos primarios de células endoteliales.

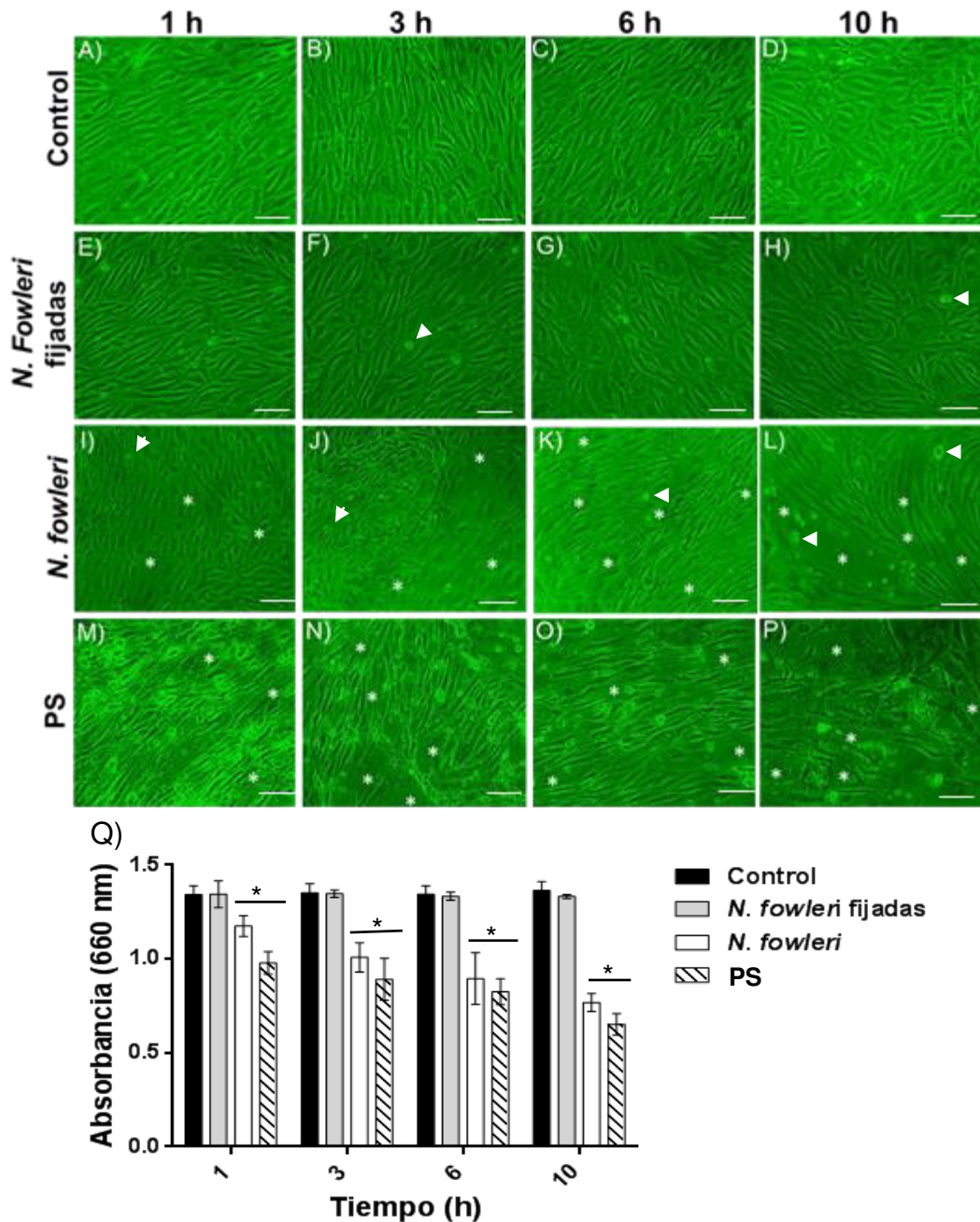


Figura 15. Efecto citopático de *N. fowleri* sobre RBMEC. A-D) RBMEC control sin amibas, mostrando integridad de la monocapa desde 1 a 10 h. E-H) RBMEC co-incubadas con trofozoítos fijados, se observa la integridad de la monocapa. I-L) Los trofozoítos completos (cabezas de flecha) son capaces de producir efecto citopático (asteriscos) desde 1 a las 10 h de co-incubación. M-P) En RBMEC co-incubadas con productos de secreción (PS), se observan áreas líticas (asteriscos) y daño celular, Barra= 20 μm . Q) Análisis cuantitativo del daño por azul de metileno. RBMEC sin amibas (barras negras); amibas fijadas (barras grises); trofozoítos de *N. fowleri* (barras blancas) y PS (barras con líneas). Los datos representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de p fueron calculados con ANOVA de dos vías (* $p < 0.05$).

11.5. Papel de las proteasas y productos de secreción de *N. fowleri* en el daño a las RBMEC

Para evaluar la importancia de las proteasas producidas por la amiba en el daño a las células RBMEC, trofozoítos completos y sus productos de secreción (PS) fueron incubados con las monocapas durante 10 h. Ambas condiciones produjeron daño importante a las monocapas a las 10 h de co-incubación (Figura 16B y 17B). Para determinar el tipo de proteasas que participan en el daño a las células endoteliales, se realizaron pre-incubaciones de las amibas con E-64 10 μ M y Aprotinina 6 μ M; los resultados mostraron que el daño provocado por los trofozoítos completos y los PS fue abolido en las monocapas de RBMEC con el inhibidor de cisteína proteasas E-64 (Figura 16C y 17C), efecto que no fue observado con el inhibidor de serina proteasas en donde se observa daño en el cultivo (Figura 16D y 17D). Para corroborar que el daño este siendo llevado a cabo por los inhibidores de proteasas, las RBMEC se incubaron solo con E-64 y Aprotinina en las concentraciones antes mencionadas durante 10 h. Observamos que los inhibidores no son capaces de producir daño sobre las monocapas de RBMEC utilizadas en las interacciones con amibas completas y los PS (Figura 16 y 17E y F). Estos resultados fueron corroborados mediante análisis densitométrico. Con estos resultados podemos concluir que el daño producido por *N. fowleri* sobre las monocapas de RBMEC es producido por la acción de cisteína proteasas.

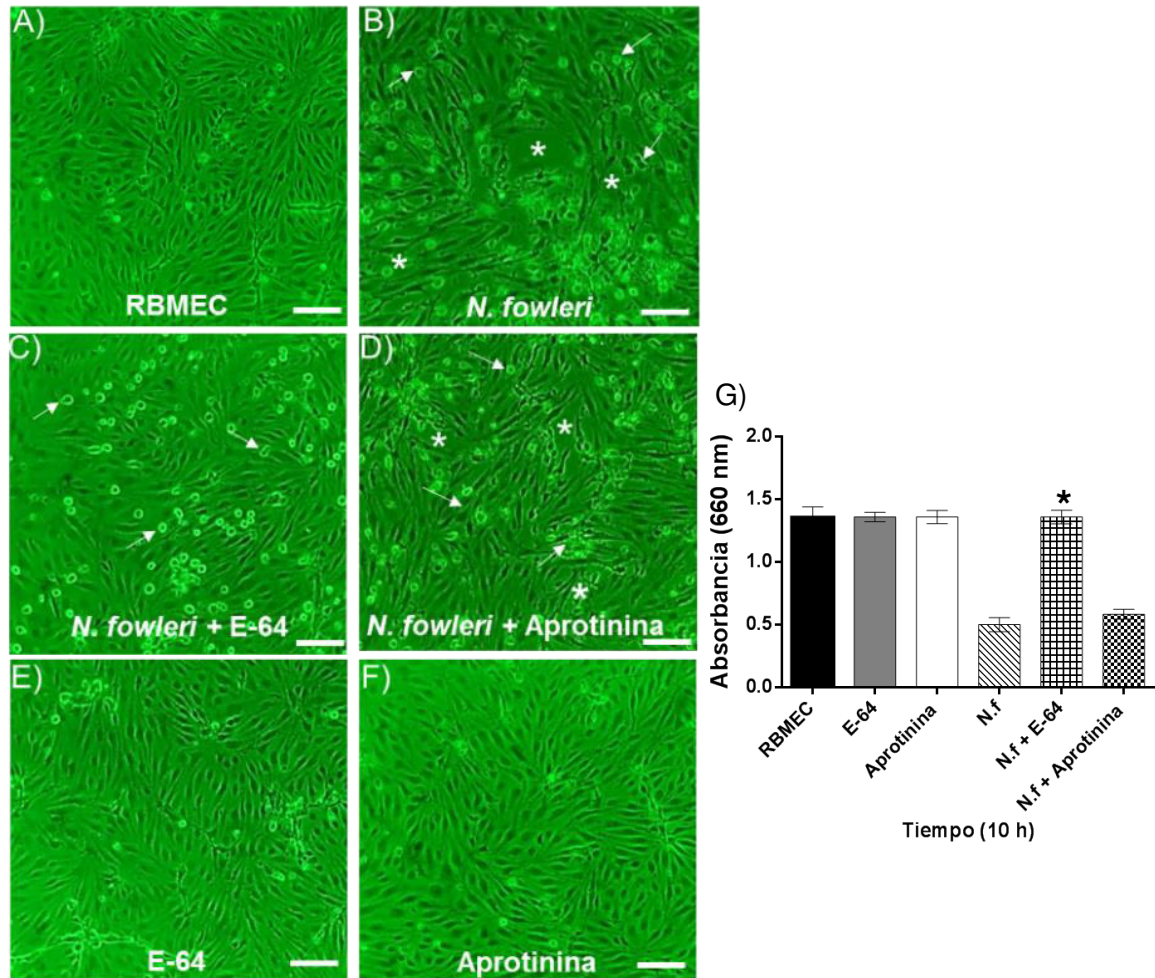


Figura 16. *N. fowleri* induce daño a las células RBMEC. A) RBMEC sin amibas. B) RBMEC co-incubadas con trofozoítos (flechas), se observan áreas líticas (asteriscos) a las 10 h de incubación. C) Trofozoítos pre-incubados con E-64 (10 μM) e incubados durante 10 h con RBMEC. D) Amibas pre-incubadas con Aprotinina (6 μM) e incubadas durante 10 h con el cultivo primario, se observan zonas de lisis (asteriscos). E-F) Monocapas incubadas con E-64 y Aprotinina durante 10 h. Barra= 20 μm. G) Análisis cuantitativo del daño mediante azul de metileno. RBMEC sin amibas (barra negra); RBMEC incubada con E-64 (barra gris); RBMEC incubada con Aprotinina (barra blanca); RBMEC co-incubada con amibas (barra con líneas); Trofozoítos pre-incubados con E-64 (barra con cuadros); Trofozoítos pre-incubados con Aprotinina (barra con puntos). Los datos representan la media ± SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de *p* fueron calculados con ANOVA de dos vías (**p*<0.05).

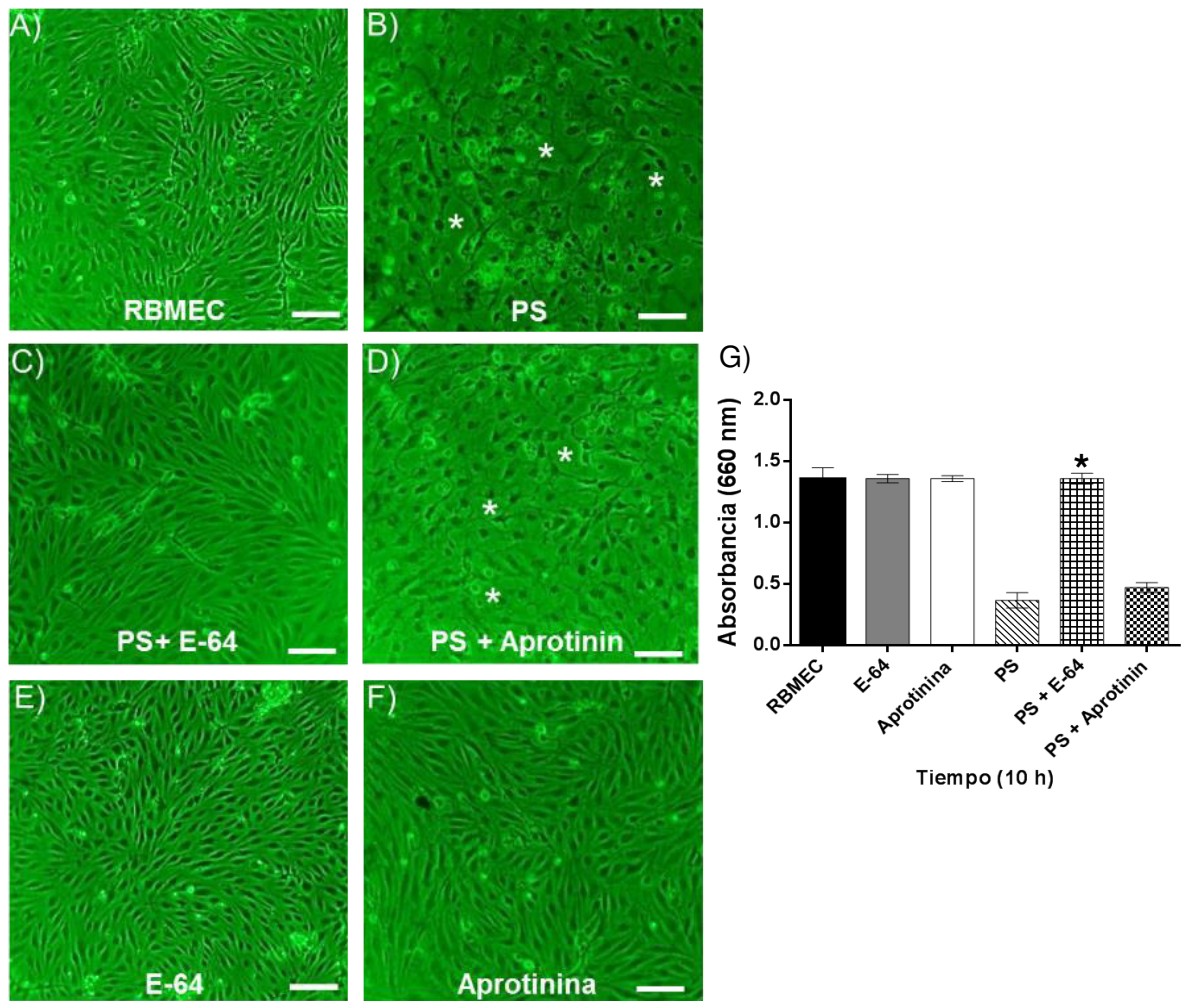


Figura 17. Los PS de *N. fowleri* inducen daño a las células RBMEC. A) RBMEC sin PS. B) RBMEC co-incubadas con PS, se observan áreas líticas (asteriscos) a las 10 h de incubación. C) PS pre-incubados con E-64 (10 μM) e incubados durante 10 h con RBMEC. D) PS pre-incubadas con Aprotinina (6 μM) e incubadas durante 10 h con el cultivo primario, se observan zonas de lisis (asteriscos). E-F) Monocapas incubadas con E-64 y Aprotinina durante 10 h. Barra= 20 μm. G) Análisis cuantitativo del daño mediante azul de metileno. RBMEC sin PS (barra negra); RBMEC incubada con E-64 (barra gris); RBMEC incubada con Aprotinina (barra blanca); RBMEC co-incubada con PS (barra con líneas); PS pre-incubados con E-64 (barra con cuadros); PS pre-incubados con Aprotinina (barra con puntos). Los datos representan la media ± SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de *p* fueron calculados con ANOVA de dos vías (**p*<0.05).

11.6. Disminución de la RET producida por *N. fowleri*

Para evaluar la funcionalidad de la integridad de las uniones intercelulares de las células RBMEC co-incubadas con los trofozoítos de *N. fowleri*, se evaluó la RET durante 360 min (Figura 18). Como controles se utilizaron RBMEC sin amibas, RBMEC co-incubadas con trofozoítos fijados y RBMEC incubados con E-64 10 mM, las cuales mostraron valores constantes de RET en todos los tiempos analizados ($260 \Omega \cdot \text{cm}^2$); valores similares fueron obtenidos con las células incubadas con las amibas fijadas. Como control positivo daño sobre la monocapa de RBMEC, se utilizó una solución de NaOH 25 mM, los resultados muestran una caída repentina de la RET en un 23% a los 5 min de incubación, y continuó cayendo hasta un 99% a los 40 min de incubación. Los resultados mostraron una caída del 4% de la RET a los 5 min de co-incubación con las amibas, en comparación con el control (sin amibas); y continuó cayendo hasta un 92% a los 600 min. Cuando se co-incubaron los PS con las RBMEC, observamos la caída de la RET hasta un 13% a los 5 min comparado con el control, alcanzando una disminución del 98% a los 600 min de co-incubación. Finalmente, cuando pre-incubamos a las amibas y a sus PS con E-64 previo a la co-incubación con las RBMEC, la disminución de la RET fue detenida en todos los tiempos analizados. Con estos resultados podemos concluir que los trofozoítos y sus PS son capaces de inducir la caída de la RET a través de la acción de cisteína proteasas; (* $p < 0.05$).

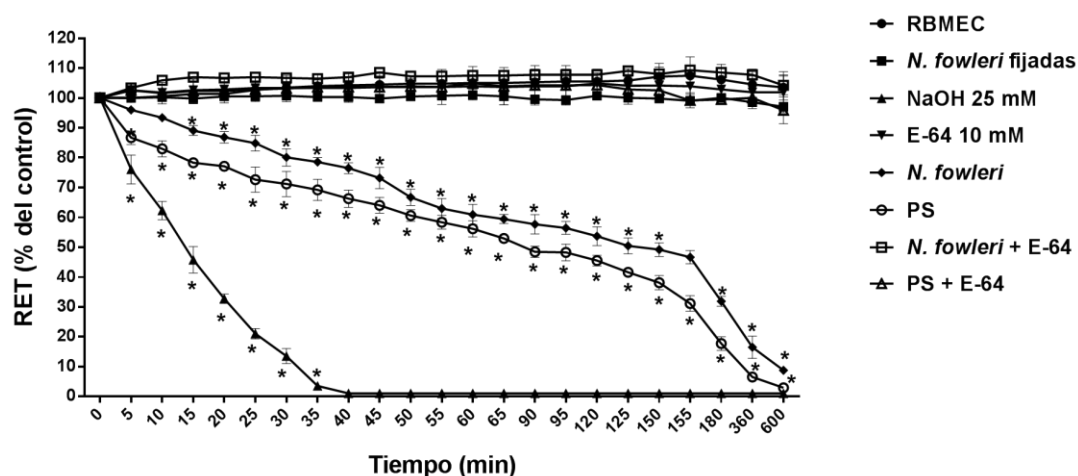


Figura 18. Alteraciones de la RET de las células RBMEC por *N. fowleri*. Monocapas de RBMEC sin amibas. Trofozoítos fijados (-■-) co-incubados con RBMEC. RBMEC incubadas con NaOH (25 mM) (-▲-). RBMEC co-incubadas con E-64 (10 mM) (-▼-). Monocapas co-incubadas con trofozoítos de *N. fowleri* (-◆-) y sus PS (-○-). Células endoteliales incubadas con amibas (-□-) y PS (-△-) pre-incubados con E-64. El porcentaje de RET fue comparado con los valores control ($260 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism y representa el porcentaje de la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de p fueron calculados con ANOVA de dos vías ($*p < 0.05$).

11.7. Localización de las proteínas de la UE durante la co-incubación de RBMEC con trofozoítos de *N. fowleri*

Se evaluó la localización celular mediante microscopia confocal de las proteínas de la UE, claudina-5, ocludina y ZO-1 en las células RBMEC cuando fueron co-incubadas con trofozoítos de *N. fowleri*. Los resultados mostraron que todas las proteínas analizadas presentaron un patrón continuo en la periferia de las células RBMEC sin trofozoítos (controles). Los cortes en XZ mostraron a las proteínas de las UE en la membrana lateral de las células. En el caso de claudina-5 y ZO-1 también se localizaron en el núcleo (Figura 19A y K). En cambio, la ocludina se distribuyó principalmente en la membrana (Figura 19F). Cuando las amibas fueron co-incubadas con las células, estas se observaron cerca de las uniones intercelulares (Figura 19D, I y N). También se observó un rearrreglo de la claudina-5, ocludina y ZO-1, desde los 5 hasta los 60 min de co-incubación; estas proteínas se distribuyeron de manera difusa

en el citoplasma y núcleo. Sin embargo, estas proteínas empiezan a desaparecer después de los 30 y 60 min de co-incubación. Los cortes XZ confirmaron la distribución de cada proteína en todos los tiempos evaluados. Es bien sabido que las proteínas de las UE son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina. Por lo tanto, decidimos evaluar la distribución de la F-actina en las células RBMEC co-incubadas con los trofozoítos de *N. fowleri*. Después de 5 min de co-incubación, se observó un incremento de las fibras de estrés en las células endoteliales (Figura 19Q). La desorganización de la actina, así como la separación entre las células fue evidente desde los 15 hasta los 60 min de co-incubación (Figura 19R-T). En las células control (sin trofozoítos), el citoesqueleto de actina mostró una organización normal principalmente formando el anillo cortical en los bordes celulares el cual fue corroborado en los cortes XZ (Figura 19P-T). Con esto podemos concluir que *N. fowleri* es capaz de alterar y deslocalizar a las proteínas de las UE, así como de alterar el citoesqueleto de actina en el cultivo primario de RBMEC.

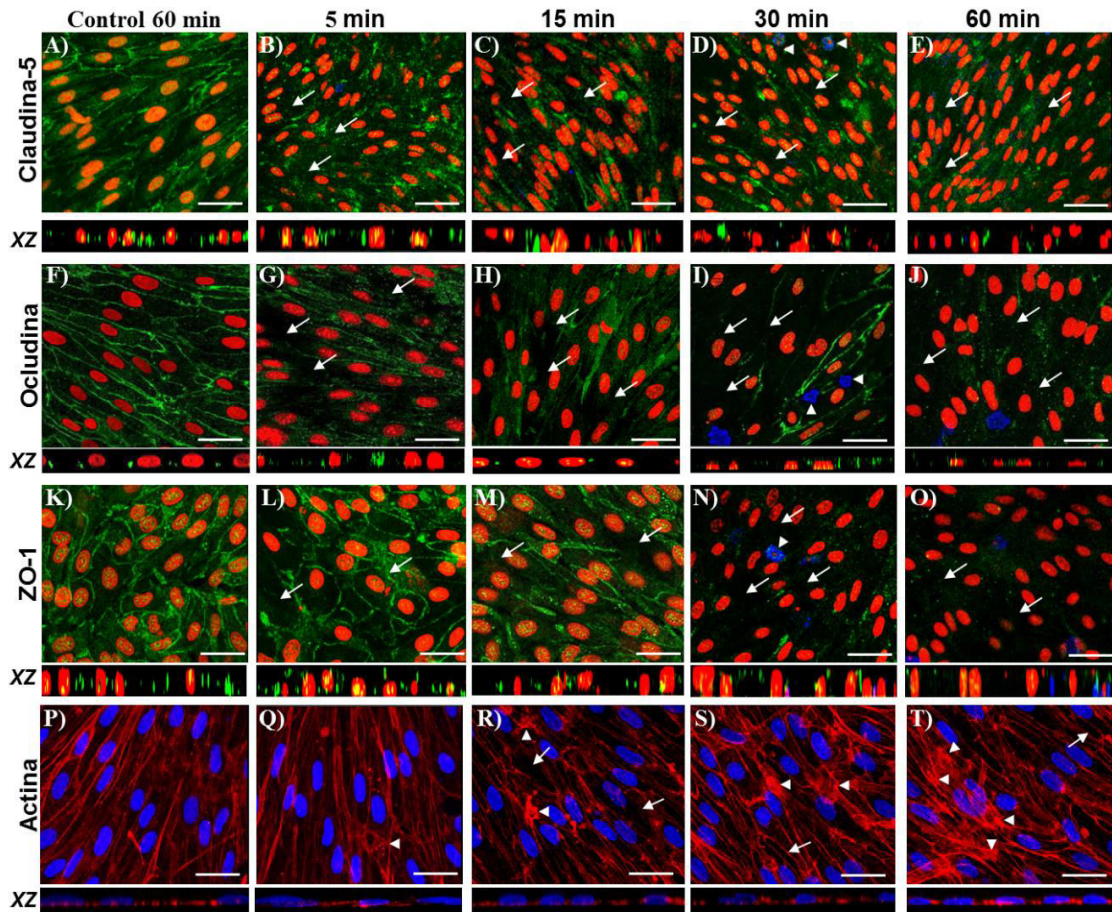


Figura 19. Localización de las proteínas de las UE en RBMEC co-incubadas con *N. fowleri* mediante microscopia confocal. La localización de las proteínas claudina-5 (A-E), ocludina (F-J) y de ZO-1 (K-O) fue analizada en los tiempos de 5, 15, 30 y 60 min. Claudina-5, ocludina y ZO-1 fueron marcadas con FITC, los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio, y los trofozoítos fueron marcados con CY5. Deslocalización de las proteínas (flechas). P-T) Reorganización del citoesqueleto de actina, la F-actina fue teñida con faloidina rodamina y los núcleos con DAPI. Aparición de fibras de estrés (cabezas de flecha), y las células comenzaron a separarse desde los 15 a los 60 min (flechas). Barra= 30 μ m.

11.8. Degradación de las proteínas de las UE de las células RBMEC co-incubadas con trofozoítos de *N. fowleri*

Para evaluar la integridad de las proteínas de la UE en el cultivo primario de RBMEC interaccionado con los trofozoítos de *N. fowleri*, realizamos ensayos de western blot. Las monocapas fueron procesadas para obtener los extractos totales, los cuales fueron resueltos mediante SDS-PAGE a diferentes concentraciones de acrilamida;

posteriormente, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF para evaluar la degradación de las proteínas de las UE mediante el empleo de anticuerpos específicos. Los controles mostraron que la claudina-5 se detectó con un peso molecular de 25 kDa, el cual permaneció constante desde los 5 hasta los 60 min (Figura 20A). En las monocapas co-incubadas con los trofozoítos la banda de 25 kDa disminuyó de manera dependiente del tiempo (Figura 20A). Por otro lado, el blot correspondiente a la proteína ZO-1 de las RBMEC sin amibas mostró una banda en el peso molecular de 220 kDa, la cual se mantiene en todos los tiempos evaluados (Figura 20B). Las células RBMEC co-incubadas con *N. fowleri* mostraron la degradación de la proteína ZO-1 de manera dependiente del tiempo (15 min hasta los 60 min de co-incubación) (Figura 20B). De manera interesante, el anticuerpo anti-ZO-1 detectó una banda en el peso de 50 kDa, tanto en los controles como en las RBMEC interaccionadas con las amibas. Esta banda podría corresponder a la proteína ZONAB, la cual se sabe interacciona con ZO-1. Por otro lado, la proteína ocludina también fue evaluada en las monocapas del cultivo primario, encontramos una banda de 65 kDa, sin ningún cambio en todos los tiempos evaluados en el cultivo celular sin amibas (Figura 20C). Cuando las células RBMEC fueron co-incubadas con las amibas, se observó que la degradación de ocludina comenzó desde los 30 min e incrementó a los 60 min de co-incubación (Figura 20C). La proteína actina, usada como control de carga, no presentó degradación en todos los tiempos y condiciones evaluadas. La degradación de las proteínas fue expresada como densidad óptica relativa (DOR) con respecto al control de carga. Este análisis nos permitió cuantificar la degradación de las proteínas de las UE, que fue observada en los ensayos de western blot (Figura 20D). Con estos resultados podemos concluir que *N. fowleri* es capaz de degradar a las proteínas claudina-5 y ZO-1 en el cultivo primario de células endoteliales de manera dependiente del tiempo.

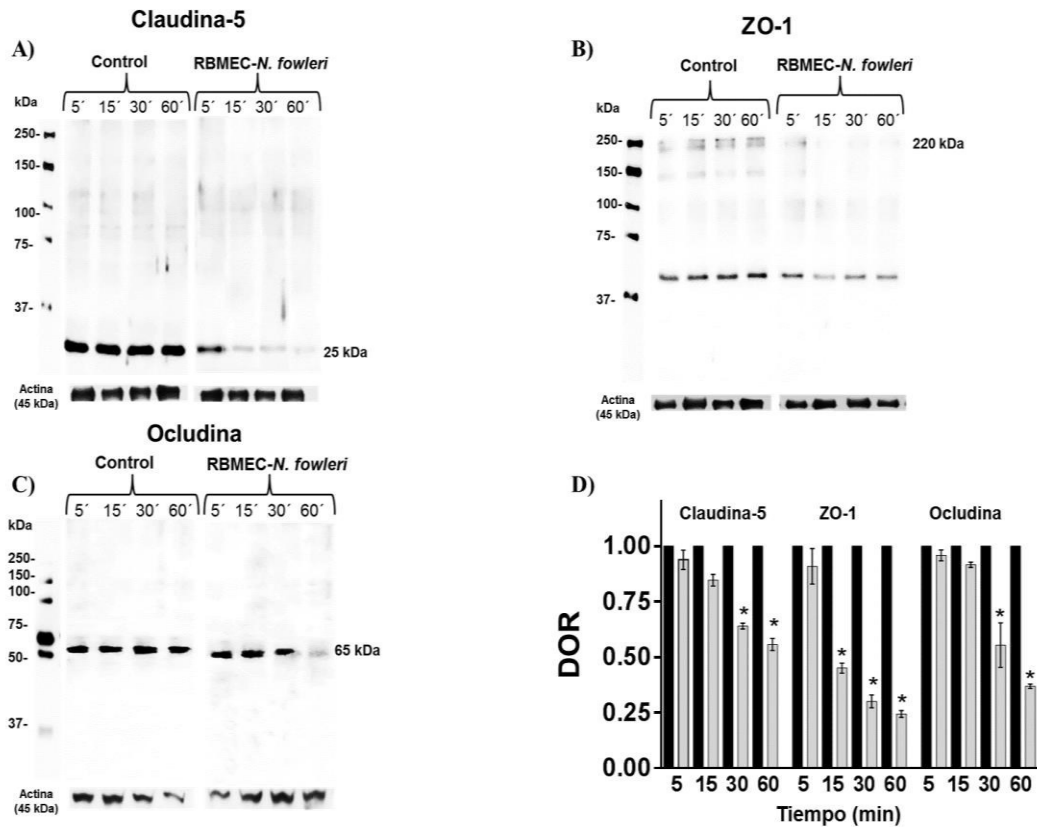


Figura 20. Western blot de las UE de RBMEC co-incubadas con *N. fowleri*. A) Bandas de 25 kDa que corresponden a la proteína claudina-5. B) Bandas de 220 kDa que corresponden a la proteína ZO-1. C) Bandas de 65 kDa que corresponden a ocludina. La proteína actina (45 kDa) fue usada como control de carga. D) Análisis densitométrico. La densidad óptica relativa (DOR) para las proteínas de la UE (barras grises) fue normalizada con el control de carga de actina. Las interacciones fueron comparadas con el control sin amibas (barras negras). Los datos representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de p fueron calculados con ANOVA de dos vías ($*p < 0.05$).

11.9. La expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en las células RBMEC es inducida por *N. fowleri*

Por otro lado, mediante microscopia confocal, se decidió evaluar la expresión las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, en las células endoteliales incubadas con las amiba, ya que estas proteínas además de su expresión pueden propiciar la ruptura de la BHE. El control de RBMEC sin amibas (180 min) mostró una fluorescencia basal pobre tanto para VCAM-1 como para ICAM-1 (Figura 21F y L). El control

positivo de RBMEC co-incubadas con LPS (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 180 min mostró una señal importante para ambas proteínas en la periferia celular y en el citoplasma (Figura 21E y K). Por otro lado, cuando las células fueron co-incubadas con los trofozoítos durante 15 min, se observó una señal basal de VCAM-1 muy similar al control (Figura 21A). A los 30 min PI, la marca incrementó de manera sutil comparada con el tiempo inicial (Figura 21B). En la RBMEC co-incubada durante 60 min, la marca para VCAM-1 incrementó, exhibiendo un patrón citoplasmático difuso (Figura 21C). Finalmente, a los 180 min PI, la fluorescencia de VCAM-1 fue similar a lo observado con las RBMEC estimuladas con LPS (Figura 21D). Otra proteína de adhesión expresada por las RBMEC implicada en la trans migración de leucocitos hacia el SNC durante un proceso inflamatorio es la proteína ICAM-1. Nuestros resultados mostraron que a los 15 min de co-incubación es posible observar una señal similar al control de la proteína (Figura 21G). A los 30 min PI, la señal de la proteína se observa distribuida en toda la célula (Figura 21H). Como fue observado para la proteína VCAM-1, la fluorescencia para ICAM-1 incrementó desde los 60 a los 180 min PI, alcanzando una fluorescencia máxima en este último periodo de tiempo (Figura 21J). En los cortes XZ corroboramos la distribución de la proteína en la membrana celular así de manera difusa en el citoplasma, además de no encontrar localización nuclear para ambas proteínas. Para llevar a cabo la cuantificación de la señal de fluorescencia para ambas proteínas, la intensidad de fluorescencia fue medida y la corrección total de la fluorescencia (CTCF) fue obtenida, mediante el software ImageJ (Figura 21M). La CTCF mostró un incremento significativo en la marca para ambas proteínas desde los 60 min de co-incubación de las células RBMEC con las amibas (Figura 21M). Con estos resultados, demostramos que *N. fowleri* induce la expresión de ambas proteínas de adhesión en el cultivo primario de RBMEC.

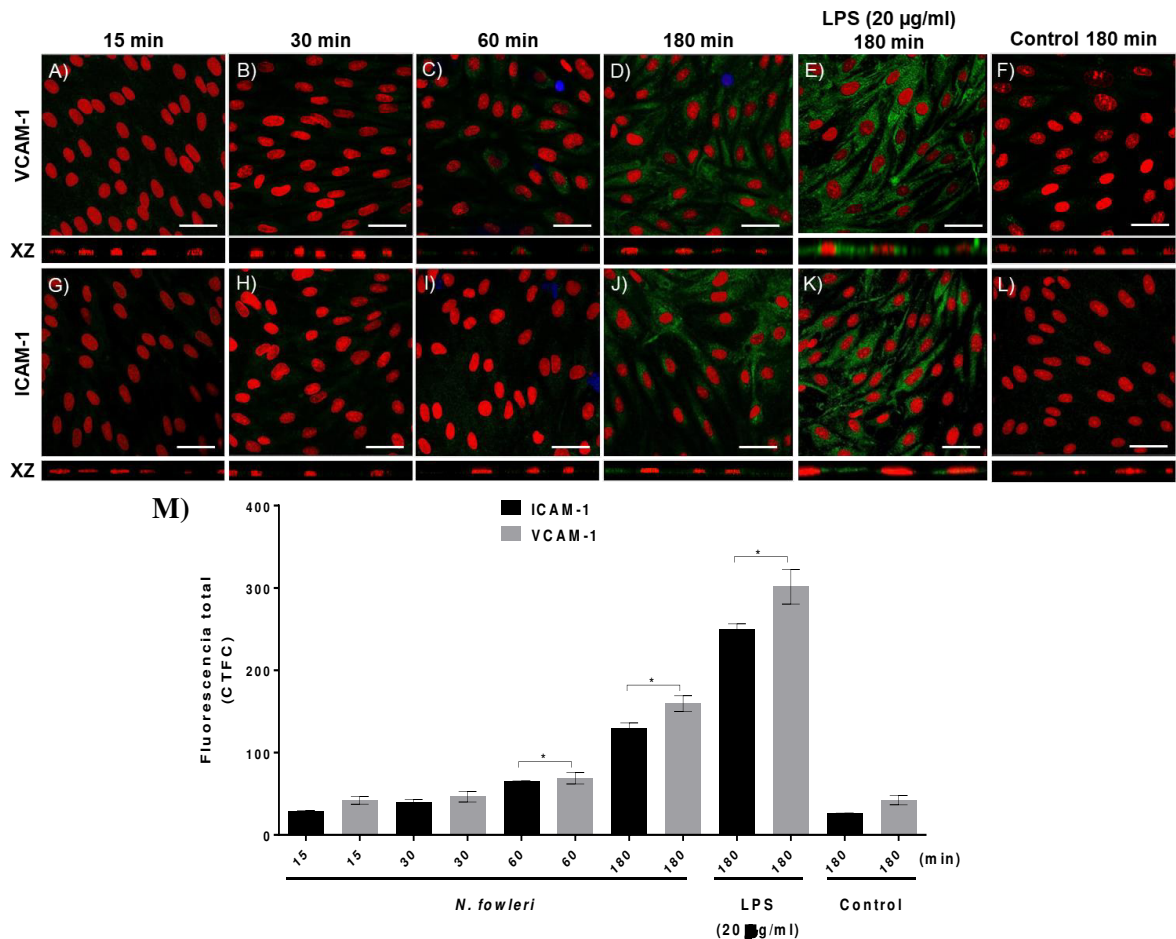


Figura 21. La expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en las células RBMEC es inducida por *N. fowleri*. Inducción de VCAM-1 (A-D) e ICAM-1 (G-J) en RBMEC por las amibas. E-K) Expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en RBMEC co-incubadas con LPS (20 µg/ml) durante 180 min (control positivo). F-L) Expresión basal de VCAM-1 e ICAM-1 en RBMEC sin amibas (control negativo) durante 180 min. VCAM-1 e ICAM-1 fueron marcadas con FITC, los trofozoítos están marcados con CY5, los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio. Barra=20 µm. M) La fluorescencia se representó como la fluorescencia total corregida (CTFC). Los datos representan la media ± SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de *p* fueron calculados con ANOVA de dos vías (**p*<0.05).

12. Producción de citocinas por las células RBMEC inducida por los trofozoítos de *N. fowleri*

La producción de citocinas es una respuesta a la activación de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, la cual puede ser implicada en el daño a las UE. Para evaluar esta producción utilizamos FACS para cuantificar la presencia de las citocinas en los sobrenadantes de células RBMEC incubadas con los trofozoítos de *N. fowleri*. Primero se realizaron las curvas estándar para cada citocina que contiene el kit BD

CBA, de acuerdo con las instrucciones de fabricante (Figura 22). Los resultados para las células incubadas solamente en medio DMEM/F12 sin PDS, mostraron niveles basales de IL-1 β e IL-12p70 a las 24 h (Figura 23A y B), pero no se observó la producción de IL-8, TNF- α , IL-6 e IL-10 bajo estas condiciones. Como control positivo de inducción se utilizó LPS, el cual mostró que es capaz de inducir la producción de IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 e IL-6 (Figura 23C y D). La producción de IL-10 fue nula en esta condición (Figura 23D). Por otro lado, cuando co-incubamos a las células con los trofozoítos de *N. fowleri* observamos la producción significativa de IL-8, IL-1 β , TNF- α e IL-6 a las 24 h (Figura 23E y F) comparado con el control sin amibas. Por otra parte, se observó que las RBMEC co-incubadas con las amibas no indujeron la producción de IL-10 (Figura 23F) comparado con el control sin amibas. Con estos resultados podemos concluir que *N. fowleri* es capaz de inducir la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los cultivos primarios de RBMEC.

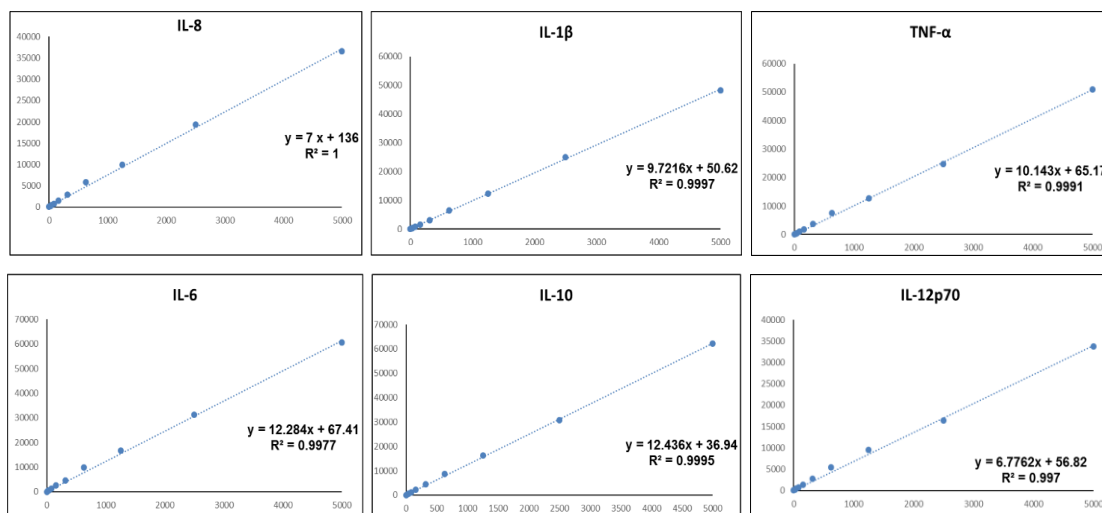


Figura 22. Curvas estándar para las citocinas IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12p70 proporcionadas por el Kit BD CBA.

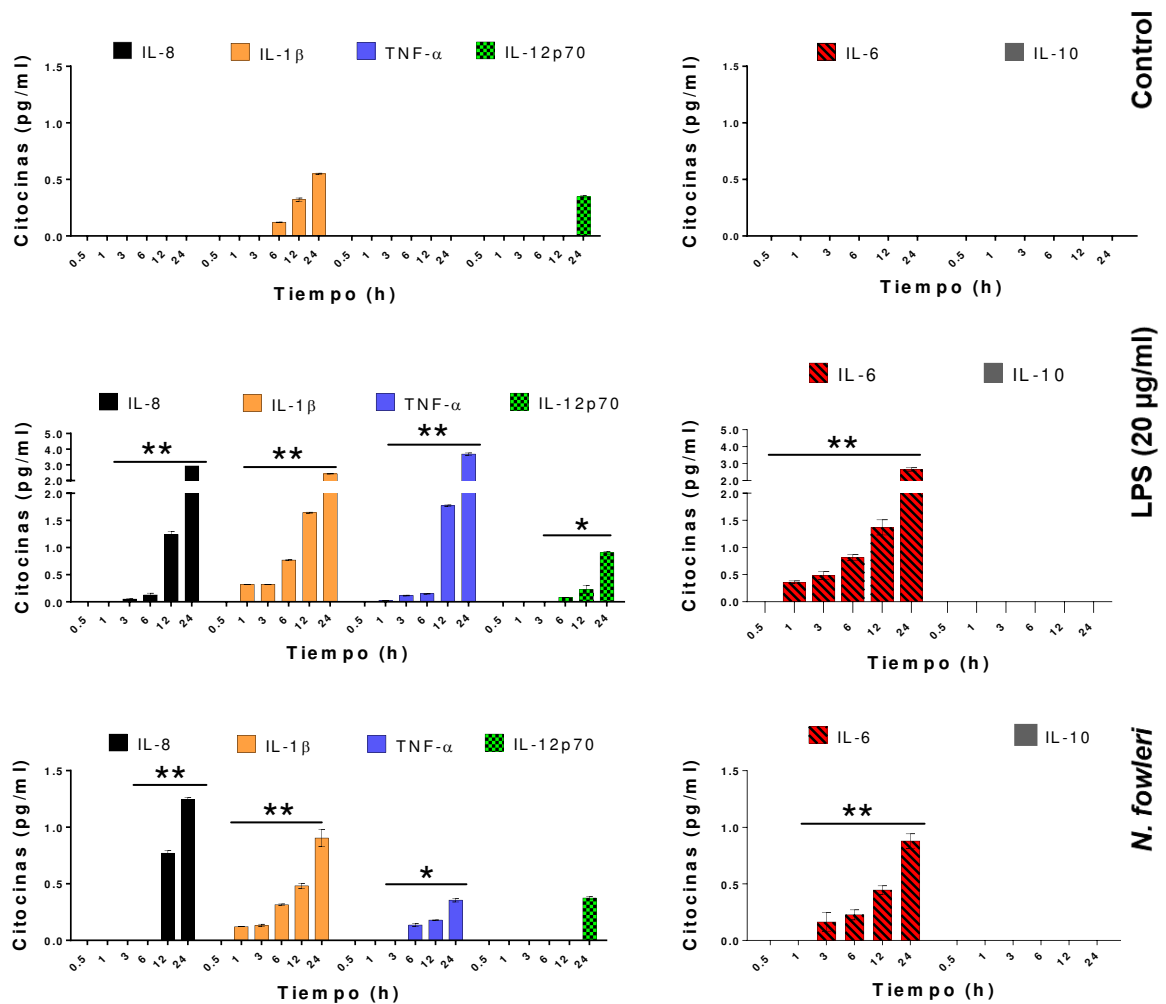


Figura 23. Producción de citocinas por RBMEC en la interacción con *N. fowleri*. La concentración de IL-8 (barras negras), IL-1β (barras grises), TNF-α (barras blancas), IL-12p70 (barras con puntos), IL-6 (barras con líneas) e IL-10 (gris oscuro) fue determinada a través de FACS. A-B) Producción basal de IL-8, IL-1β, TNF-α, IL-12p70, IL-6 e IL-10 por las RBMEC durante 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h. C-D) Producción de citocinas por RBMEC co-incubadas con LPS (control positivo). E-F) Producción de citocinas por RBMEC co-incubadas con los trofozoítos de *N. fowleri*. Los datos representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de *p* fueron calculados con ANOVA de dos vías; (**p*<0.05).

12.1. Los trofozoítos de *N. fowleri* son capaces de inducir la producción de óxido nítrico en las células RBMEC

Para analizar la producción de ON durante la interacción de *N. fowleri* con las monocapas de RBMEC, decidimos utilizar un kit para cuantificar los nitritos presentes en los sobrenadantes de interacción de las células RBMEC co-incubadas

con las amibas. Primero se realizó la curva estándar de concentración de nitritos de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para posteriormente realizar la cuantificación en las condiciones problema (Figura 24).

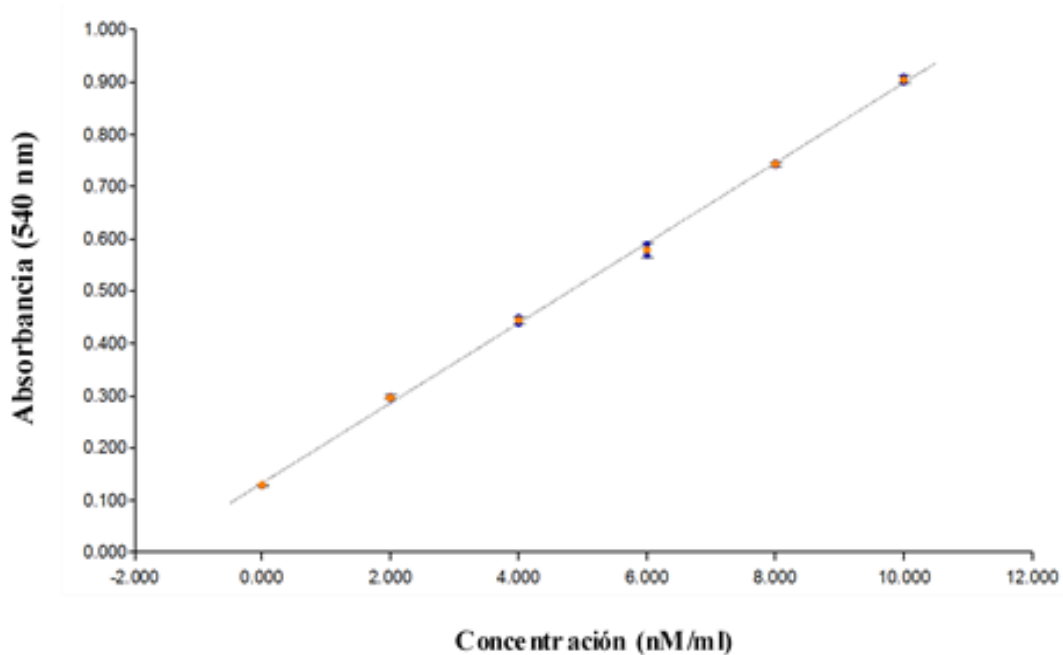


Figura 24. Curva estándar para la cuantificación de óxido nítrico utilizando concentraciones conocidas de nitritos proporcionadas por el kit.

Las células incubadas sin trofozoítos (control) mostraron una producción basal de nitritos desde 1.6 a 2.2 nM/ml a las 24 h (Figura 25). Las RBMEC que fueron co-incubadas con el control positivo de LPS, arrojaron una producción de nitritos desde 1.6 a 9.6 nM/ml de manera dependiente de tiempo (Figura 25). Por otro lado, las células co-incubadas con los trofozoítos mostraron un incremento en la concentración de nitritos desde 1.6 a 8.9 nM/ml; valores que fueron similares a los encontrados en las RBMEC incubadas con LPS (Figura 25). Los resultados obtenidos demuestran que *N. fowleri* es capaz de inducir la producción de ON en los cultivos primarios de RBMEC de una manera dependiente del tiempo.

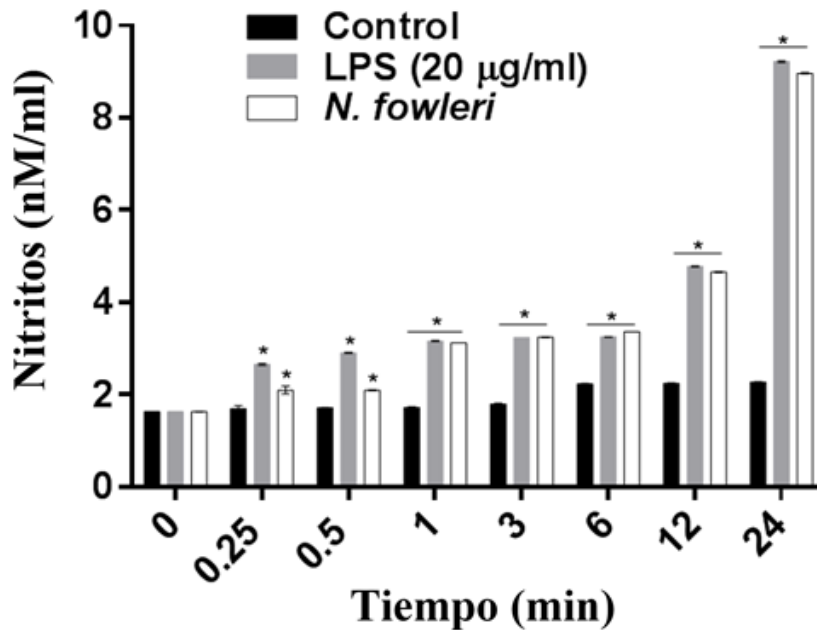


Figura 25. *N. fowleri* induce la producción de ON en las células RBMEC. La concentración basal de nitritos por las células RBMEC fue de 1.6 nM/ml, con una producción máxima de 2.2 nM/ml a las 24 h . La producción de nitritos en RBMEC co-incubadas con LPS alcanzó la concentración máxima de 9.6 nM/ml a las 24 h (control positivo). La co-incubación de los trofozoítos con las células RBMEC indujo la producción de nitritos de 1.6 hasta 8.9 nM/ml a las 24 h. Los datos representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los valores de p fueron calculados con ANOVA de dos vías; (* $p < 0.05$).

13. DISCUSIÓN

N. fowleri es una ameba de vida libre, capaz de causar la MAP, una infección aguda y fulminante que puede afectar al SNC en el ser humano (Schuster & Visvesvara, 2004). La infección ocurre generalmente en personas sanas con el antecedente de haber practicado actividades acuáticas (Visvesvara, 2013). El desarrollo de la MAP ha sido evaluado en el modelo del ratón y ha sido de gran ayuda para la caracterización del proceso de invasión de *N. fowleri* a los bulbos olfatorios en el SNC (Martinez *et al.*, 1973b; Jarolim *et al.*, 2000; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b). Es importante mencionar que en el modelo del ratón, se han logrado observar las amebas cerca o dentro de los vasos capilares del cerebro, sugiriendo la participación de la BHE durante el proceso de invasión y diseminación en el cerebro de los animales (Fowler & Carter, 1965; Martinez *et al.*, 1971; Cogo *et al.*, 2004).

Además, la llegada de células inflamatorias al cerebro durante la MAP puede ser debido al rompimiento del privilegio inmunológico en el SNC, el cual provee la BHE. Ya que se desconoce el proceso de interacción entre *N. fowleri* y esta barrera, decidimos desarrollar un modelo *in vitro* de BHE a partir de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de ratas, con el objetivo de evaluar el efecto de *N. fowleri* sobre las células endoteliales. Recientemente, se ha reportado el uso de un modelo *in vitro* de BHE el cual posee condiciones fisiológicas similares a las observadas en condiciones *in vivo*; este modelo está constituido por un cultivo primario de células endoteliales y por un cultivo de astrocitos obtenidos a partir de cerebros de rata (Molino *et al.*, 2014; Schuhmann *et al.*, 2015). El establecimiento de este modelo *in vitro* nos permitirá evaluar la interacción de los trofozoítos de *N. fowleri* con las células endoteliales que conforman a la BHE, así como evaluar cómo se lleva a cabo el proceso de daño a esta barrera y así permitir la invasión y la respuesta inflamatoria que se presenta durante el desarrollo de la MAP. Nuestros resultados sobre el establecimiento del cultivo primario de BHE, nos dicen que a pesar de que la duración en cultivo de estas células es limitado, el cultivo de RBMEC es viable para llevar a cabo la evaluación de la interacción con *N. fowleri*, ya que se encontró estas células continúan presentando una alta RET, así como una importante expresión de

las proteínas de las UE y moléculas de adhesión, además de que las RBMEC son capaces de producir citocinas y ON, los cuales serán discutidos más adelante.

Por otro lado, está reportado que el modelo de la rata ha sido usado para evaluar las etapas tardías de la MAP, con el objetivo de establecer un modelo *ex vivo* conformado por rebanadas del cerebro de la rata. Los autores decidieron usar este tipo de modelo para evitar el uso de animales vivos y así tener un mejor control de las condiciones experimentales (Gianinazzi *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el momento, los eventos histopatológicos del proceso de invasión de *N. fowleri* en la rata, desde las etapas tempranas hasta etapas tardías no habían sido evaluadas previamente. Nuestros resultados apoyan la conclusión de que la rata, de manera similar al ratón es un animal susceptible a la infección a *N. fowleri* con similitudes al ratón y a muestras de biopsias post-mortem de cerebros humanos (Carter, 1970; Hannisch & Hallagan, 1997; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b). El modelo de la rata puede proporcionar información más exacta sobre las posibles vías de diseminación de *N. fowleri* en el SNC. Esto debido a sus características anatómicas, tales como el tamaño del espacio subaracnoideo, el cual permite analizar mejor la presencia y distribución de la amiba. Además, la edad de las ratas utilizadas en este modelo, se correlaciona con las edades de los casos humanos, que corresponden a niños y personas jóvenes.

Una vez que confirmamos que la rata fue susceptible a desarrollar la MAP, analizamos el efecto de los trofozoítos de *N. fowleri* sobre el modelo *in vitro* de BHE. Los resultados mostraron que los trofozoítos y sus PS son capaces de producir un efecto citopático muy importante, así como producir la caída de la RET en el cultivo primario de RBMEC. Reportes previos mostraron que el efecto citopático producido por *A. castellanii*, *E. histolytica*, *Toxoplasma gondii*, y *Giardia duodenalis* en cultivos de células HBMEC y de MDCK, fueron el producto de la acción de cisteína proteasas (Khan & Siddiqui, 2009; Schubert-Unkmeir *et al.*, 2010; Betanzos *et al.*, 2013; Shibayama *et al.*, 2013; Briceno *et al.*, 2016; Halliez *et al.*, 2016; Cuellar *et al.*, 2017). Para llevar a cabo la evaluación del daño producido por las proteasas de *N. fowleri*, se llevó a cabo la pre-incubación de los trofozoítos y sus PS, en presencia de E-64 o de Aprotinina, de manera interesante observamos que el inhibidor de cisteína

proteasas E-64, pero no el inhibidor para serina proteasas Aprotinina, ejerce un efecto protector sobre la monocapa endotelial. Estos resultados nos indicaron que las cisteínas proteasas de *N. fowleri* pueden estar participando en el daño a las uniones intercelulares que en consecuencia disminuyen la RET. De igual manera, encontramos que la caída de la RET producida por la presencia de las amibas, ya ha sido previamente asociada con el daño a las proteínas de las UE claudina-1, ocludina y ZO-1 (Shibayama *et al.*, 2013). Nuestros resultados por microscopia confocal y por western blot correlacionan con lo descrito previamente en las células MDCK, mostrando tanto el re-arreglo de las proteínas de las UE como en la degradación de la claudina-5 (el principal tipo de claudina presente en las células endoteliales de la BHE), ocludina y ZO-1 en el cultivo primario de RBMEC. En particular con el protozooario *Plasmodium falciparum* se ha reportado que es capaz de promover la deslocalización de claudina-5, ocludina y ZO-1 en células endoteliales (Gillrie *et al.*, 2007). Además, existen reportes en donde *A. castellanii* fue capaz de degradar a la proteína ocludina en cultivos de HBMEC a través de la vía de Rho, la cual según los autores puede ser activada a través de las moléculas de adhesión y de las proteasas amibianas. Además, estas enzimas son capaces de inducir la contracción del citoesqueleto de actina, lo que promueve el incremento de la permeabilidad de la BHE (Khan & Siddiqui, 2009). En relación con la localización nuclear de claudina-5, y ZO-1, ha sido reportado que claudina-2 puede formar un complejo con las proteínas ZO-1 y ZONAB para posteriormente ser translocado al núcleo donde interacciona con la ciclina D1 y promueve la proliferación de células de adenocarcinoma de pulmón humano (French *et al.*, 2009; Beard *et al.*, 2012; Lesage *et al.*, 2017).

En este trabajo también se encontró que *N. fowleri* es capaz de modificar el citoesqueleto de actina de las células RBMEC e inducir la formación de fibras de estrés. Además, de alterar las UE así como el citoesqueleto de actina, esta amiba podría estar participando en el libre paso de células inflamatorias provenientes de la circulación periférica, a través de los vasos capilares que se encuentran constituidos en la BHE (Martinez *et al.*, 1971; Hannisch & Hallagan, 1997). Por lo tanto, podemos concluir que *N. fowleri* es capaz de dañar a las células endoteliales, alterando a las uniones celulares; sin embargo, estos resultados no excluyen la posibilidad de que la

vía transcelular esté siendo afectada por otros mecanismos de virulencia de la amiba, tales como sus moléculas de adhesión y el proceso de fagocitosis.

Para demostrar el papel que toman las células endoteliales en el reclutamiento de células inflamatorias hacia el SNC, decidimos evaluar la producción de moléculas de adhesión y citocinas, por parte del cultivo primario de RBMEC. Se sabe que microorganismos patógenos pueden activar a las células endoteliales, a través de receptores tipo Toll (TLR) y receptores asociados a proteasas (PAR), resultando en la producción de citocinas y moléculas de adhesión endotelial, tales como VCAM-1 e ICAM-1 (Frigerio *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 2001; Liu & Malik, 2006; Clark *et al.*, 2007). Estas proteínas están implicadas en el proceso de diapédesis, a través de los vasos sanguíneos hacia el cerebro (Shimizu *et al.*, 1991; Rahman & Fazal, 2009; Muller, 2011). En este trabajo, observamos que *N. fowleri* es capaz de inducir la expresión de ambas moléculas de adhesión de una manera dependiente de tiempo. Se han reportado hallazgos similares para *P. falciparum*. Este parásito induce la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 para facilitar su migración por la vía paracelular a través de las células endoteliales como un mecanismo de invasión hacia el cerebro (Deckert-Schluter *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2010). La sobreexpresión de VCAM-1 e ICAM-1 provocada por *N. fowleri* puede estar asociada con la llegada de células inflamatorias hacia el SNC, lo que podría incrementar el daño al SNC (Gordeeva, 1970; Clark *et al.*, 2007).

Se sabe que cuando ocurre un proceso de daño cerebral (isquemia cerebral, esclerosis múltiple o provocado por la acción de microorganismos patógenos), la producción de citocinas está relacionada con un incremento de la permeabilidad de la BHE (Tsukada *et al.*, 1991; Sharief *et al.*, 1993; O'Carroll *et al.*, 2015). En nuestros resultados encontramos que *N. fowleri* es capaz de inducir la producción de IL-8, IL-1 β , TNF- α e IL-6 en las células endoteliales. La producción de IL-8 puede asociarse al reclutamiento de leucocitos hacia el sitio de la infección, como fue previamente descrito en la MAP experimental (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2008b). Además, se ha reportado que las citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-12p70 son capaces de producir la desregulación de claudina-5, así como la expresión de moléculas de adhesión

(VCAM-1 e ICAM-1) durante un proceso de daño sobre las células endoteliales (Lienenluke *et al.*, 2000; Benedetto *et al.*, 2003). Así mismo, el TNF- α y la IL-1 β son capaces de activar la vía p38/ERK1/2 en células cerebrales humanas y promueven la sobre activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). Las consecuencias de esta activación desembocan en el incremento del flujo paracelular, así como en la degradación de la proteína ocludina, lo que induce el aumento de la permeabilidad entre las células (Ni *et al.*, 2017). En el mismo sentido se sabe que la producción de IL-6 por células HBMEC que fueron expuestas a las proteínas Tat.B and Tat.AG del virus del VIH-1, provoca la desregulación de claudina-5 y ZO-1. Este efecto podría estar alterando a la BHE y consecuentemente promoviendo el desarrollo de la neuropatogénesis viral (Bhargavan & Kanmogne, 2017). Por último, la citocina IL-10 también fue evaluada en el cultivo de RBMEC co-incubado con trofozoítos de *N. fowleri*. Como se esperaba, no observamos la producción de esta proteína en los sobrenadantes de interacción de las células RBMEC. Estos resultados concuerdan con estudios donde células endoteliales de cerebro humano que fueron estimuladas con LPS, no mostraron la producción de esta citocina (Frigerio *et al.*, 1998).

Otra molécula importante producida por las células endoteliales presentes en el cerebro es el ON, el cual participa en la regulación del tono vascular, así como en el control de los microorganismo patógenos (Shukla *et al.*, 1996; Minami *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 2001; Villalba-Magdaleno *et al.*, 2011). La producción de esta molécula por parte del endotelio cerebrovascular puede ser inducida por la activación de las enzimas óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) a través de TLR4 o a través de receptores de citocinas (IL-6R y TNF- α R), durante una infección bacteriana o por protozoarios (Shimizu *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1996; Viswambharan *et al.*, 2003; Ehrchen *et al.*, 2009; Olefsky & Glass, 2010). Además, se sabe que el ON es capaz de dañar a los complejos de unión, presentes en las células endoteliales del SNC. Esta molécula induce la desregulación de claudina-5 y ocludina en la BHE por la translocación de ZONAB al núcleo, permitiendo la interacción con los promotores de las proteínas de la UE e inhibiendo su producción, lo cual resulta en el incremento de la permeabilidad de la barrera (Liu *et al.*, 2015). Es posible que la producción de ON inducido por la presencia de las amibas durante el

desarrollo de la MAP pueda estar alterando a la BHE, lo que pudiera estar facilitando la migración de leucocitos durante la infección hacia el SNC. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para entender la participación de diferentes vías de señalización como p38-MAPK y ERK1/2, que pudieran estar implicadas en los procesos de aumento de la permeabilidad y la producción de mediadores proinflamatorios por parte del endotelio que compone a la BHE.

En resumen, nuestros resultados demostraron que los trofozoítos de *N. fowleri* y sus PS son capaces de dañar a las células endoteliales, a través de cisteína proteasas en el modelo *in vitro* de BHE. El daño provocado por las amibas incluye la deslocalización y degradación de las proteínas de las UE, así como la reorganización del citoesqueleto de actina que en consecuencia altera las propiedades de barrera de la BHE. Por lo tanto, es posible que el microambiente inflamatorio promueva el reclutamiento y transmigración de los leucocitos, aumentando la reacción inflamatoria en los bulbos olfatorios (Figura 26). Nuestros resultados aportan nuevos conocimientos acerca de la participación de las células endoteliales de la BHE durante el desarrollo de la MAP, lo que podría servir como una nueva herramienta para el diseño y prueba de nuevos fármacos para el tratamiento de la infección producida por *N. fowleri*.

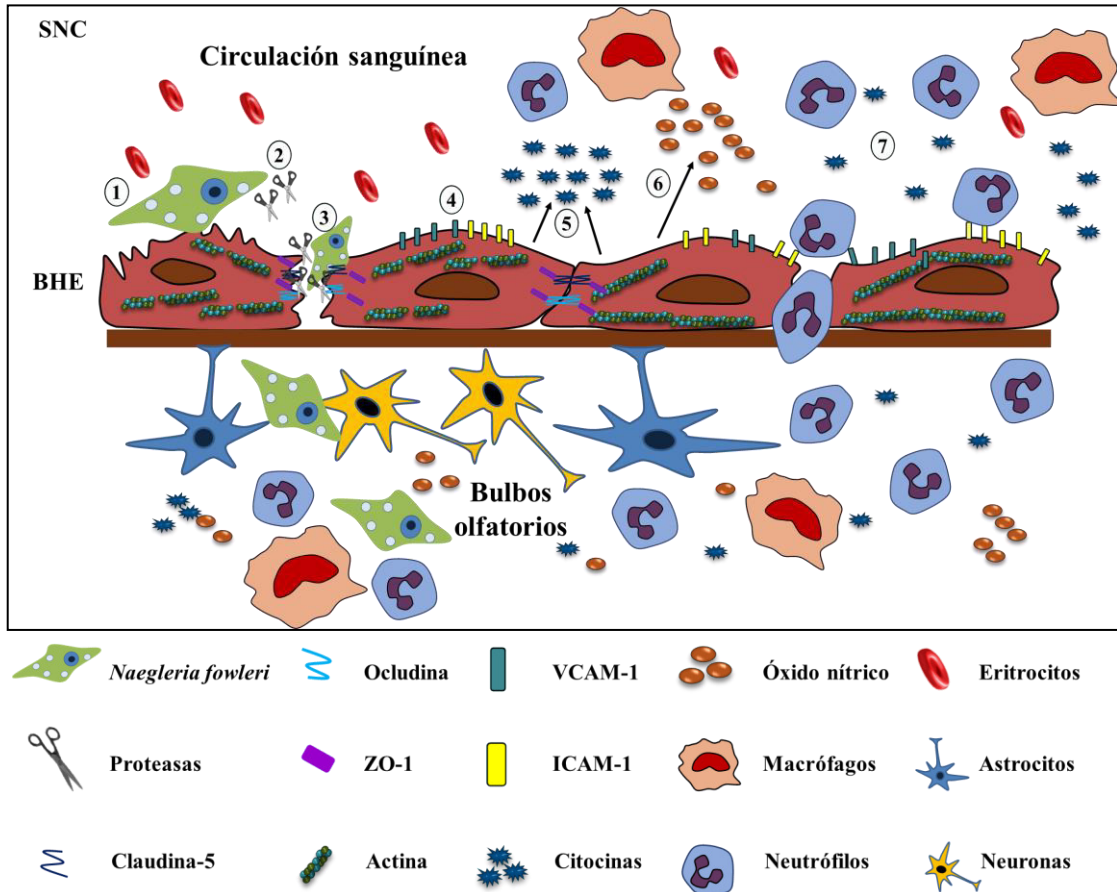


Figura 26. Representación esquemática de la interacción de *N. fowleri* con la BHE. (1) interacción y daño a las células endoteliales, (2) secreción de cisteína proteasas, (3) daño a las UE y al citoesqueleto de actina, proceso de invasión de las amibas, (4) sobre-expresión de moléculas de adhesión endotelial (VCAM-1 e ICAM-1), (5, 6) producción de citocinas proinflamatorias y ON, (7) reclutamiento de leucocitos y diapédesis a través de las células endoteliales hacia los bulbos olfatorios.

14. CONCLUSIONES

1. El modelo de la rata es susceptible a desarrollar la MAP, al igual que el modelo del ratón y los casos humanos.
2. Los trofozoítos y sus productos de secreción causan daño a las células endoteliales, mediante la acción de cisteína proteasas.
3. *N. fowleri* provoca la deslocalización y degradación de las proteínas de las UE en las células RBMEC, de manera dependiente del tiempo.
4. *N. fowleri* es capaz de inducir la expresión de las proteínas VCAM-1 e ICAM-1 en las células RBMEC.
5. Las amibas indujeron la producción de citocinas proinflamatorias en el cultivo primario de BHE.
6. Los trofozoítos de *N. fowleri* inducen la producción de ON en las células RBMEC, de manera dependiente del tiempo.

15. PERSPECTIVAS

1. Evaluar las alteraciones de la BHE provocadas por *N. fowleri* en el modelo *in vivo* de la rata.
2. Evaluar la importancia de las vías p38-MAPK y ERK1/2, durante la infección de *N. fowleri* en las células RBMEC.
3. Analizar mediante microscopia electrónica de transmisión y de barrido, el proceso de infección de *N. fowleri* en el cultivo primario de RBMEC.
4. Evaluar el efecto de los productos de secreción sobre las UE de las células RBMEC.
5. Analizar el efecto de los productos de secreción, en la producción de citocinas y óxido nítrico en el cultivo primario de células endoteliales.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abbott, N. J. (2013).** "Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery." *J Inherit Metab Dis* **36**(3), 437-449.
2. **Abbott, N. J., L. Ronnback & E. Hansson (2006).** "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nat Rev Neurosci* **7**(1), 41-53.
3. **Agarwal, S., P. Manchanda, M. A. Vogelbaum, J. R. Ohlfest & W. F. Elmquist (2013).** "Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma." *Drug Metab Dispos* **41**(1), 33-39.
4. **Aird, W. C. (2007).** "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms." *Circ Res* **100**(2), 158-173.
5. **Ajami, B., J. L. Bennett, C. Krieger, K. M. McNagny & F. M. Rossi (2011).** "Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool." *Nat Neurosci* **14**(9), 1142-1149.
6. **Albrecht, E. W., C. A. Stegeman, P. Heeringa, R. H. Henning & H. van Goor (2003).** "Protective role of endothelial nitric oxide synthase." *J Pathol* **199**(1), 8-17.
7. **Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter other authors (2010).** "Pericytes regulate the blood-brain barrier." *Nature* **468**(7323), 557-561.
8. **Armulik, A., M. Mae & C. Betsholtz (2011).** "Pericytes and the blood-brain barrier: recent advances and implications for the delivery of CNS therapy." *Ther Deliv* **2**(4), 419-422.
9. **Balda, M. S. & K. Matter (2009).** "Tight junctions and the regulation of gene expression." *Biochim Biophys Acta* **1788**(4), 761-767.
10. **Barbour, S. E. & F. Marciano-Cabral (2001).** "*Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2)." *Biochim Biophys Acta* **1530**(2-3), 123-133.
11. **Bateman, R. M., M. D. Sharpe & C. G. Ellis (2003).** "Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide." *Crit Care* **7**(5), 359-373.
12. **Beard, R. S., Jr., J. J. Reynolds & S. E. Bearden (2012).** "Metabotropic glutamate receptor 5 mediates phosphorylation of vascular endothelial cadherin and nuclear localization of β -catenin in response to homocysteine." *Vascul Pharmacol* **56**(3-4), 159-167.
13. **Bechade, C., Y. Cantaut-Belarif & A. Bessis (2013).** "Microglial control of neuronal activity." *Front Cell Neurosci* **7**, 32.
14. **Behets, J., F. Seghi, P. Declerck, L. Verelst, L. Duvivier, A. Van Damme & F. Ollevier (2003).** "Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR." *Water Sci Technol* **47**(3), 117-122.
15. **Benedetto, N., F. Rossano, F. Gorga, A. Folgore, M. Rao & C. Romano Carratelli (2003).** "Defense mechanisms of IFN-gamma and LPS-primed murine microglia against *Acanthamoeba castellanii* infection." *Int Immunopharmacol* **3**(6), 825-834.
16. **Betanzos, A., R. Javier-Reyna, G. García-Rivera, C. Bañuelos, L. González-Mariscal, M. Schnoor & E. Orozco (2013).** "The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage." *PLoS One* **8**(6), e65100.

17. **Bhargavan, B. & G. D. Kanmogne (2017).** "Differential Mechanisms of Inflammation and Endothelial Dysfunction by HIV-1 Subtype-B and Recombinant CRF02_AG Tat Proteins on Human Brain Microvascular Endothelial Cells: Implications for Viral Neuropathogenesis." *Mol Neurobiol* **2017**, 1-12.
18. **Brajtburg, J. & J. Bolard (1996).** "Carrier effects on biological activity of amphotericin B." *Clin Microbiol Rev* **9**(4), 512-531.
19. **Briceno, M. P., L. A. Nascimento, N. P. Nogueira, P. V. Barenco, E. A. Ferro, K. Rezende-Oliveira, L. R. Goulart, P. T. Alves, F. Barbosa Bde, W. R. Lima other authors (2016).** "Toxoplasma gondii Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells." *J Histochem Cytochem* **64**(8), 459-469.
20. **Briones, A. M., M. J. Alonso, R. Hernanz, M. Miguel & M. Saldaña (2002).** "Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats." *J Cardiovasc Pharmacol* **39**(3), 378-388.
21. **Cabanes, P. A., F. Wallet, E. Pringuez & P. Pernin (2001).** "Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*." *Appl Environ Microbiol* **67**(7), 2927-2931.
22. **Carmignoto, G. & M. Gomez-Gonzalo (2010).** "The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling." *Brain Res Rev* **63**(1-2), 138-148.
23. **Carter, R. F. (1969).** "Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria* sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis." *J Clin Pathol* **22**(4), 470-474.
24. **Carter, R. F. (1970).** "Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it." *J Pathol* **100**(4), 217-244.
25. **Carter, R. F., G. J. Cullity, V. J. Ojeda, P. Silberstein & E. Willaert (1981).** "A fatal case of meningoencephalitis due to a free-living amoeba of uncertain identity--probably *Acanthamoeba* sp." *Pathology* **13**(1), 51-68.
26. **Caruzo, G. & J. Cardozo (2008).** "Primary amoebic meningoencephalitis: a new case from Venezuela." *Trop Doct* **38**(4), 256-257.
27. **Cereijido, M., L. Gonzalez-Mariscal & R. G. Contreras (1988).** "Epithelial tight junctions." *Am Rev Respir Dis* **138**(6 Pt 2), S17-21.
28. **Cereijido, M., L. Gonzalez-Mariscal, R. G. Contreras, J. M. Gallardo, R. Garcia-Villegas & J. Valdes (1993).** "The making of a tight junction." *J Cell Sci Suppl* **17**, 127-132.
29. **Cereijido, M., L. Shoshani & R. G. Contreras (2000).** "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**(3), G477-482.
30. **Cerva, L. & K. Novak (1968).** "Amoebic meningoencephalitis: 16 fatalities." *Science* **160**(3823), 92.
31. **Cervantes-Sandoval, I., J. Serrano-Luna, E. Garcia-Latorre, V. Tsutsumi & M. Shibayama (2008a).** "Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion." *Microbiology* **154**(Pt 12), 3895-3904.
32. **Cervantes-Sandoval, I., J. Serrano-Luna, E. García-Latorre, V. Tsutsumi & M. Shibayama (2008b).** "Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis." *Parasitol Int* **57**(3), 307-313.
33. **Clark, P. R., T. D. Manes, J. S. Pober & M. S. Kluger (2007).** "Increased ICAM-1 expression causes endothelial cell leakiness, cytoskeletal reorganization and junctional alterations." *J Invest Dermatol* **127**(4), 762-774.

34. Clearly, S. F. & F. Marciano-Cabral (1986). "Soluble amoebicidal Factors Mediate Cytolysis of *Naegleria fowleri* by Activated Macrophages." *Cellular Immunology* **101**, 62-71.
35. Cogo, P. E., M. Scagli, S. Gatti, F. Rossetti, R. Alaggio, A. M. Laverda, L. Zhou, L. Xiao & G. S. Visvesvara (2004). "Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy." *Emerg Infect Dis* **10**(10), 1835-1837.
36. Cope, J. R., D. A. Conrad, N. Cohen, M. Cotilla, A. DaSilva, J. Jackson & G. S. Visvesvara (2016). "Use of the Novel Therapeutic Agent Miltefosine for the Treatment of Primary Amebic Meningoencephalitis: Report of 1 Fatal and 1 Surviving Case." *Clin Infect Dis* **62**(6), 774-776.
37. Cubero-Menendez, O. & D. Cubero-Rego (2004). "Primary amoebic meningoencephalitis: a case report." *Rev Neurol* **38**(4), 336-338.
38. Cuellar, P., E. Hernández-Nava, G. García-Rivera, B. Chávez-Munguía, M. Schnoor, A. Betanzos & E. Orozco (2017). "*Entamoeba histolytica* EhCP112 Dislocates and Degrades Claudin-1 and Claudin-2 at Tight Junctions of the Intestinal Epithelium." *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 372.
39. Chang, S. L. (1958). "Cultural, cytological and ecological observations on the amoeba stage of *Naegleria gruberi*." *J Gen Microbiol* **18**(3), 565-578.
40. Chávez-Munguía, B., M. Omana-Molina, G. Castanon, P. Bonilla, M. Gonzalez-Lazaro, D. Hernandez-Martinez, L. Salazar-Villatoro, A. Esparza-Garcia, A. Martinez-Palomo & G. Ortega-Pierres (2009). "Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp." *J Eukaryot Microbiol* **56**(1), 66-72.
41. Cho, M. S., S. Y. Jung, S. Park, K. H. Kim, H. I. Kim, S. Sohn, H. J. Kim, K. I. Im & H. J. Shin (2003). "Immunological characterizations of a cloned 13.1-kilodalton protein from pathogenic *Naegleria fowleri*." *Clin Diagn Lab Immunol* **10**(5), 954-959.
42. Da Rocha-Azevedo, B., H. B. Tanowitz & F. Marciano-Cabral (2009). "Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae." *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2009**, 251406.
43. Daneman, R. (2012). "The blood-brain barrier in health and disease." *Ann Neurol* **72**(5), 648-672.
44. Daneman, R. & A. Prat (2015). "The blood-brain barrier." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**(1), a020412.
45. Daneman, R., L. Zhou, D. Agalliu, J. D. Cahoy, A. Kaushal & B. A. Barres (2010). "The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells." *PLoS One* **5**(10), e13741.
46. Das, S. R. (1972). "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.
47. De Jonckheere, J. F. (2004). "Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*." *Protist* **155**(1), 89-103.
48. De Jonckheere, J. F. (2011). "Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*." *Infect Genet Evol* **11**(7), 1520-1528.
49. De Jonckheere, J. F., Yagita, K., Kuroki, T., Endo, T. (1991). "First isolation of pathogenic *Naegleria fowleri* in Japan." *Japan Journal of Parasitology* **40**, 352-357.
50. Debnath, A., J. B. Tunac, S. Galindo-Gomez, A. Silva-Olivares, M. Shibayama & J. H. McKerrow (2012). "Corifungin, a new drug lead against *Naegleria*, identified from a high-throughput screen." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(11), 5450-5457.

51. Deckert-Schluter, M., D. Schluter, H. Hof, O. D. Wiestler & H. Lassmann (1994). "Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study." *J Neuropathol Exp Neurol* **53**(5), 457-468.
52. Del Zoppo, G. J., R. Milner, T. Mabuchi, S. Hung, X. Wang & J. A. Koziol (2006). "Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 6), 1261-1266.
53. Díaz-Coránguez, M., J. Segovia, A. López-Ornelas, H. Puerta-Guardo, J. Ludert, B. Chávez, N. Meraz-Cruz & L. González-Mariscal (2013). "Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells." *PLoS One* **8**(4), e60655.
54. Dorsch, M. M., A. S. Cameron & B. S. Robinson (1983). "The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77**(3), 372-377.
55. Duma, R. J. (1980). "Non-*Naegleria* amebic meningoencephalitis." *Trans Am Clin Climatol Assoc* **91**, 65-72.
56. Duma, R. J., W. I. Rosenblum, R. F. McGehee, M. M. Jones & E. C. Nelson (1971). "Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review." *Ann Intern Med* **74**(6), 923-931.
57. Dykova, I., I. Kyselova, H. Peckova, M. Obornik & J. Lukes (2001). "Identity of *Naegleria* strains isolated from organs of freshwater fishes." *Dis Aquat Organ* **46**(2), 115-121.
58. Ehrchen, J. M., C. Sunderkotter, D. Foell, T. Vogl & J. Roth (2009). "The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer." *J Leukoc Biol* **86**(3), 557-566.
59. Elsheikha, H. M. & N. A. Khan (2010). "Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system." *FEMS Microbiol Rev* **34**(4), 532-553.
60. Enciu, A. M., M. Gherghiceanu & B. O. Popescu (2013). "Triggers and effectors of oxidative stress at blood-brain barrier level: relevance for brain ageing and neurodegeneration." *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 297512.
61. Fischer-Stenger, K. & F. Marciano-Cabral (1992). "The Arginine-Dependent Cytolytic Mechanism Plays a Role in Destruction of *Naegleria fowleri* Amoeba by Activated Macrophages." *Infection and Immunity* **60**(12), 5126-5131.
62. Fowler, M. & R. F. Carter (1965). "Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report." *Br Med J* **2**(5464), 740-742.
63. French, A. D., J. L. Fiori, T. C. Camilli, P. D. Leotlela, M. P. O'Connell, B. P. Frank, S. Subaran, F. E. Indig, D. D. Taub & A. T. Weeraratna (2009). "PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells." *Int J Med Sci* **6**(2), 93-101.
64. Frigerio, S., M. Gelati, E. Ciusani, E. Corsini, A. Dufour, G. Massa & A. Salmaggi (1998). "Immunocompetence of human microvascular brain endothelial cells: cytokine regulation of IL-1 β , MCP-1, IL-10, sICAM-1 and sVCAM-1." *J Neurol* **245**(11), 727-730.
65. Fritz-Laylin, L. K., M. L. Ginger, C. Walsh, S. C. Dawson & C. Fulton (2011). "The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology." *Res Microbiol* **162**(6), 607-618.
66. Fulton, C. (1977). "Intracellular regulation of cell shape and motility in *Naegleria*. First insights and a working hypothesis." *J Supramol Struct* **6**(1), 13-43.

67. **Fulton, C. & A. D. Dingle (1971).** "Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*." *J Cell Biol* **51**(3), 826-836.
68. **Furuse, M. (2010).** "Molecular basis of the core structure of tight junctions." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(1), a002907.
69. **Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto & S. Tsukita (1998).** "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." *J Cell Biol* **141**(7), 1539-1550.
70. **Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura & S. Tsukita (1993).** "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 2), 1777-1788.
71. **Garate, M., Z. Cao, E. Bateman & N. Panjwani (2004).** "Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*." *J Biol Chem* **279**(28), 29849-29856.
72. **Gianinazzi, C., M. Schild, N. Muller, S. L. Leib, F. Simon, S. Nunez, P. Joss & B. Gottstein (2005).** "Organotypic slice cultures from rat brain tissue: a new approach for *Naegleria fowleri* CNS infection *in vitro*." *Parasitology* **131**(Pt 6), 797-804.
73. **Gillrie, M. R., G. Krishnegowda, K. Lee, A. G. Buret, S. M. Robbins, S. Looareesuwan, D. C. Gowda & M. Ho (2007).** "Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins." *Blood* **110**(9), 3426-3435.
74. **Goncalves, A., A. F. Ambrosio & R. Fernandes (2013).** "Regulation of claudins in blood-tissue barriers under physiological and pathological states." *Tissue Barriers* **1**(3), e24782.
75. **González-Mariscal, L., P. Bautista, S. Lechuga & M. Quiros (2012).** "ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis." *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 133-141.
76. **González-Mariscal, L., A. Betanzos & A. Avila-Flores (2000a).** "MAGUK proteins: structure and role in the tight junction." *Semin Cell Dev Biol* **11**(4), 315-324.
77. **González-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava & B. E. Jaramillo (2003).** "Tight junction proteins." *Prog Biophys Mol Biol* **81**(1), 1-44.
78. **González-Mariscal, L., A. Domínguez-Calderon, A. Raya-Sandino, J. M. Ortega-Olvera, O. Vargas-Sierra & G. Martínez-Revollar (2014).** "Tight junctions and the regulation of gene expression." *Semin Cell Dev Biol* **36**, 213-223.
79. **González-Mariscal, L., M. C. Namorado, D. Martin, J. Luna, L. Alarcon, S. Islas, L. Valencia, P. Muriel, L. Ponce & J. L. Reyes (2000b).** "Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules." *Kidney Int* **57**(6), 2386-2402.
80. **Gordeeva, L. M. (1970).** "Primary amoebic meningoencephalitis caused by free-living amoebae of the genus *Hartmannella*, *Acanthamoeba* and *Naegleria* (a review of literature)." *Med Parazitol (Mosk)* **39**(2), 227-237.
81. **Gu, Y., G. Zheng, M. Xu, Y. Li, X. Chen, W. Zhu, Y. Tong, S. K. Chung, K. J. Liu & J. Shen (2012).** "Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury." *J Neurochem* **120**(1), 147-156.
82. **Haj-Yasein, N. N., G. F. Vindedal, M. Eilert-Olsen, G. A. Gundersen, O. Skare, P. Laake, A. Klungland, A. E. Thoren, J. M. Burkhardt, O. P. Ottersen other authors (2011).** "Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(43), 17815-17820.

83. Halliez, M. C., J. P. Motta, T. D. Feener, G. Guerin, L. LeGoff, A. Francois, E. Colasse, L. Favennec, G. Gargala, T. K. Lapointe other authors (2016). "*Giardia duodenalis* induces paracellular bacterial translocation and causes postinfectious visceral hypersensitivity." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **310**(8), G574-585.
84. Han, K. L., H. J. Lee, M. H. Shin, H. J. Shin, K. I. Im & S. J. Park (2004). "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.
85. Hannisch, W. & L. F. Hallagan (1997). "Primary amebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature." *Wilderness Environ Med* **8**(4), 211-213.
86. Haseloff, R. F., S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg & I. E. Blasig (2015). "Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects." *Semin Cell Dev Biol* **38**, 16-25.
87. Heggie, T. W. & T. Kupper (2017). "Surviving *Naegleria fowleri* infections: A successful case report and novel therapeutic approach." *Travel Med Infect Dis* **16**, 49-51.
88. Herbst, R., F. Marciano-Cabral & M. Leippe (2004). "Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule." *J Biol Chem* **279**(25), 25955-25958.
89. Herbst, R., C. Ott, T. Jacobs, T. Marti, F. Marciano-Cabral & M. Leippe (2002). "Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*." *J Biol Chem* **277**(25), 22353-22360.
90. Hirase, T., J. M. Staddon, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, K. Fujimoto, S. Tsukita & L. L. Rubin (1997). "Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells." *J Cell Sci* **110** (Pt 14), 1603-1613.
91. Howarth, A. G., M. R. Hughes & B. R. Stevenson (1992). "Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types." *Am J Physiol* **262**(2 Pt 1), C461-469.
92. Hurtado-Alvarado, G., E. Becerril-Villanueva, A. Contis-Montes de Oca, E. Dominguez-Salazar, N. Salinas-Jazmin, S. M. Perez-Tapia, L. Pavon, J. Velazquez-Moctezuma & B. Gomez-Gonzalez (2017). "The yin/yang of inflammatory status: Blood-brain barrier regulation during sleep." *Brain Behav Immun*.
93. Ikenouchi, J., M. Matsuda, M. Furuse & S. Tsukita (2003). "Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail." *J Cell Sci* **116**(Pt 10), 1959-1967.
94. Inai, T. & Y. Shibata (2008). "Structure and function of integral membrane proteins of tight junction, claudins." *Fukuoka Igaku Zasshi* **99**(2), 25-31.
95. Islas, S., J. Vega, L. Ponce & L. Gonzalez-Mariscal (2002). "Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells." *Exp Cell Res* **274**(1), 138-148.
96. Jain, R., S. Prabhakar, M. Modi, R. Bhatia & R. Sehgal (2002). "*Naegleria* meningitis: a rare survival." *Neurol India* **50**(4), 470-472.
97. Jamerson, M., B. da Rocha-Azevedo, G. A. Cabral & F. Marciano-Cabral (2012). "Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins." *Microbiology* **158**(Pt 3), 791-803.
98. Janzer, R. C. & M. C. Raff (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." *Nature* **325**(6101), 253-257.
99. Jarolim, K. L., J. K. McCosh, M. J. Howard & D. T. John (2000). "A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central

- nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice." *J Parasitol* **86**(1), 50-55.
100. John, D. T., T. B. Cole, Jr. & R. A. John (1991). "Flagella number among *Naegleria* flagellates." *Folia Parasitol (Praha)* **38**(4), 289-295.
 101. Kamouchi, M., T. Ago & T. Kitazono (2011). "Brain pericytes: emerging concepts and functional roles in brain homeostasis." *Cell Mol Neurobiol* **31**(2), 175-193.
 102. Kang, S. Y., K. J. Song, S. R. Jeong, J. H. Kim, S. Park, K. Kim, M. H. Kwon & H. J. Shin (2005). "Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells." *Clin Diagn Lab Immunol* **12**(7), 873-876.
 103. Khan, N. A. & R. Siddiqui (2009). "*Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins." *Int J Parasitol* **39**(14), 1611-1616.
 104. Kim, S. K. (1995). "Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling." *Curr Opin Cell Biol* **7**(5), 641-649.
 105. Krause, G., L. Winkler, S. L. Mueller, R. F. Haseloff, J. Piontek & I. E. Blasig (2008). "Structure and function of claudins." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 631-645.
 106. Kyle, D. E. & G. P. Noblet (1985). "Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes." *J Protozool* **32**(1), 99-105.
 107. Lares-Villa, F. (2001). *Free-Living Amoebae Infections in Mexico*. IXth International meeting on the biology and pathogenicity of free-living amoebae proceedings, Paris, France, John Libbey Eurotext.
 108. Lares-Villa, F., J. F. De Jonckheere, H. De Moura, A. Rechi-Iruretagoyena, E. Ferreira-Guerrero, G. Fernandez-Quintanilla, C. Ruiz-Matus & G. S. Visvesvara (1993). "Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates." *J Clin Microbiol* **31**(3), 685-688.
 109. Lares-Villa, F. & C. Hernandez-Peña (2010). "Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008)." *Exp Parasitol* **126**(1), 33-36.
 110. Leroy, A., T. Lauwaet, M. Oliveira, G. De Bruyne, R. Bracha, S. Ankri, U. Katz, D. Mirelman & M. Mareel (2000). "Disturbance of tight junctions by *Entamoeba histolytica*: resistant vertebrate cell types and incompetent trophozoites." *Arch Med Res* **31**(4 Suppl), S218-220.
 111. Lesage, J., M. Suarez-Carmona, D. Neyrinck-Leglantier, S. Grelet, S. Blacher, W. Hunziker, P. Birembaut, A. Noel, B. Nawrocki-Raby, C. Gilles other authors (2017). "Zonula occludens-1/NF-kappaB/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis." *FASEB J* **31**(4), 1678-1688.
 112. Li, F., Y. Lan, Y. Wang, J. Wang, G. Yang, F. Meng, H. Han, A. Meng, Y. Wang & X. Yang (2011). "Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch." *Dev Cell* **20**(3), 291-302.
 113. Liebert, A., D. Milej, W. Weigl, A. Gerega, M. Kacprzak & R. Maniewski (2013). "Fluorescence-based method for assessment of blood-brain barrier disruption." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2013**, 3040-3042.
 114. Liebner, S., C. J. Czupalla & H. Wolburg (2011). "Current concepts of blood-brain barrier development." *Int J Dev Biol* **55**(4-5), 467-476.
 115. Liebner, S., A. Fischmann, G. Rascher, F. Duffner, E. H. Grote, H. Kalbacher & H. Wolburg (2000). "Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme." *Acta Neuropathol* **100**(3), 323-331.

116. Lienenluke, B., T. Germann, R. A. Kroczeck & M. Hecker (2000). "CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells." *Eur J Immunol* **30**(10), 2864-2870.
117. Liu, L. B., X. B. Liu, J. Ma, Y. H. Liu, Z. Q. Li, T. Ma, X. H. Zhao, Z. Xi & Y. X. Xue (2015). "Bradykinin increased the permeability of BTB via NOS/NO/ZONAB-mediated down-regulation of claudin-5 and occludin." *Biochem Biophys Res Commun* **464**(1), 118-125.
118. Liu, S. F. & A. B. Malik (2006). "NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(4), L622-L645.
119. Lopez-Corella, E., B. De Leon & J. F. de Jonckheere (1989). "[Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in an adolescent from Huetamo, Michoacán, México]." *Bol Med Hosp Infant Mex* **46**(9), 619-622.
120. Maclean, R. C., D. J. Richardson, R. LePardo & F. Marciano-Cabral (2004). "The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR." *Parasitol Res* **93**(3), 211-217.
121. Marciano-Cabral, F. (1988). "Biology of *Naegleria* spp." *Microbiol Rev* **52**(1), 114-133.
122. Marciano-Cabral, F. & G. A. Cabral (2007). "The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection." *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**(2), 243-259.
123. Marciano-Cabral, F. M. & D. E. Fulford (1986). "Cytopathology of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells." *Appl Environ Microbiol* **51**(5), 1133-1137.
124. Marin, V., F. A. Montero-Julian, S. Gres, V. Boulay, P. Bongrand, C. Farnarier & G. Kaplanski (2001). "The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin." *J Immunol* **167**(6), 3435-3442.
125. Martínez-Castillo, M., R. E. Cárdenas-Guerra, R. Arroyo, A. Debnath, M. A. Rodríguez, M. Sabanero, F. Flores-Sánchez, F. Navarro-García, J. Serrano-Luna & M. Shibayama (2017). "Nf-GH, a glycosidase secreted by *Naegleria fowleri*, causes mucin degradation: an in vitro and in vivo study." *Future Microbiol* **12**, 781-799.
126. Martínez-Castillo, M., R. Cárdenas-Zuñiga, D. Coronado-Velázquez, A. Debnath, J. Serrano-Luna & M. Shibayama (2016). "*Naegleria fowleri* after 50 Years: Is it a neglected pathogen?" *J Med Microbiol*.
127. Martinez, A. J., E. C. Nelson & R. J. Duma (1973a). "Animal model of human disease. Primary amebic meningoencephalitis, *Naegleria* meningoencephalitis, CNS protozoal infection." *Am J Pathol* **73**(2), 545-548.
128. Martinez, A. J., E. C. Nelson, M. M. Jones, R. J. Duma & W. I. Rosenblum (1971). "Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study." *Lab Invest* **25**(5), 465-475.
129. Martinez, A. J. & G. S. Visvesvara (1991). "Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*." *Clin Lab Med* **11**(4), 861-872.
130. Martinez, J., R. J. Duma, E. C. Nelson & F. L. Moretta (1973b). "Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study." *Lab Invest* **29**(2), 121-133.

131. **Matin, A., M. Stins, K. S. Kim & N. A. Khan (2006).** "Balamuthia mandrillaris exhibits metalloprotease activities." *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**(1), 83-91.
132. **Miller, L., E. W. Alley, W. J. Murphy, S. W. Russell & J. S. Hunt (1996).** "Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages." *J Leukoc Biol* **59**(3), 442-450.
133. **Minami, T., J. Okazaki, A. Kawabata, H. Kawaki, Y. Okazaki & Y. Tohno (1998).** "Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide." *Environ Toxicol Pharmacol* **5**(1), 35-41.
134. **Molino, Y., F. Jabes, E. Lacassagne, N. Gaudin & M. Khrestchatisky (2014).** "Setting-up an in vitro model of rat blood-brain barrier (BBB): a focus on BBB impermeability and receptor-mediated transport." *J Vis Exp*(88), e51278.
135. **Moncada, S., R. M. Palmer & E. A. Higgs (1991).** "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* **43**(2), 109-142.
136. **Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto & S. Tsukita (1999).** "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2), 511-516.
137. **Muller, W. A. (2011).** "Mechanisms of leukocyte transendothelial migration." *Annu Rev Pathol* **6**, 323-344.
138. **Nathan, C. F. & J. B. Hibbs, Jr. (1991).** "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity." *Curr Opin Immunol* **3**(1), 65-70.
139. **Ni, Y., T. Teng, R. Li, A. Simonyi, G. Y. Sun & J. C. Lee (2017).** "TNF- α alters occludin and cerebral endothelial permeability: Role of p38MAPK." *PLoS One* **12**(2), e0170346.
140. **Nicolas, M., J. F. De Jonckheere, P. Pernin, H. Bataille, V. Le Bris & C. Herrmann-Storck (2010).** "[Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies)]." *Bull Soc Pathol Exot* **103**(1), 14-18.
141. **Niessen, C. M. (2007).** "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." *J Invest Dermatol* **127**(11), 2525-2532.
142. **Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse & S. Tsukita (2003).** "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." *J Cell Biol* **161**(3), 653-660.
143. **O'Carroll, S. J., D. T. Kho, R. Wiltshire, V. Nelson, O. Rotimi, R. Johnson, C. E. Angel & E. S. Graham (2015).** "Pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells." *J Neuroinflammation* **12**, 131.
144. **Oberheim, N. A., T. Takano, X. Han, W. He, J. H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J. D. Wyatt, W. Pilcher, J. G. Ojemann other authors (2009).** "Uniquely hominid features of adult human astrocytes." *J Neurosci* **29**(10), 3276-3287.
145. **Obermeier, B., R. Daneman & R. M. Ransohoff (2013).** "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier." *Nat Med* **19**(12), 1584-1596.
146. **Oddo, B. D., A. S. Ciani & C. P. Vial (2006).** "[Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. First case diagnosed in Chile]." *Rev Chilena Infectol* **23**(3), 232-236.
147. **Oh, Y. H., S. R. Jeong, J. H. Kim, K. J. Song, K. Kim, S. Park, S. Sohn & H. J. Shin (2005).** "Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nfa1 antibody." *Parasite Immunol* **27**(12), 453-459.

148. Olefsky, J. M. & C. K. Glass (2010). "Macrophages, inflammation, and insulin resistance." *Annu Rev Physiol* **72**, 219-246.
149. Olmez, I. & H. Ozyurt (2012). "Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease." *Neurochem Int* **60**(2), 208-212.
150. Overgaard, C. E., B. L. Daugherty, L. A. Mitchell & M. Koval (2011). "Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress." *Antioxid Redox Signal* **15**(5), 1179-1193.
151. Palmer, R. M., A. G. Ferrige & S. Moncada (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* **327**(6122), 524-526.
152. Perez-Asensio, F. J., O. Hurtado, M. C. Burguete, M. A. Moro, J. B. Salom, I. Lizasoain, G. Torregrosa, J. C. Leza, E. Alborch, J. Castillo other authors (2005). "Inhibition of iNOS activity by 1400W decreases glutamate release and ameliorates stroke outcome after experimental ischemia." *Neurobiol Dis* **18**(2), 375-384.
153. Polfliet, M. M., P. J. Zwijnenburg, A. M. van Furth, T. van der Poll, E. A. Dopp, C. Renardel de Lavalette, E. M. van Kesteren-Hendriks, N. van Rooijen, C. D. Dijkstra & T. K. van den Berg (2001). "Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis." *J Immunol* **167**(8), 4644-4650.
154. Pun, P. B., J. Lu & S. Moochhala (2009). "Involvement of ROS in BBB dysfunction." *Free Radic Res* **43**(4), 348-364.
155. Qvarnstrom, Y., G. S. Visvesvara, R. Sriram & A. J. da Silva (2006). "Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*." *J Clin Microbiol* **44**(10), 3589-3595.
156. Rahman, A. & F. Fazal (2009). "Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration." *Antioxid Redox Signal* **11**(4), 823-839.
157. Reilly, M. F., F. Marciano-Cabral, D. W. Bradley & S. G. Bradley (1983). "Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum." *J Clin Microbiol* **17**(4), 576-581.
158. Reveiller, F. L., P. A. Cabanes & F. Marciano-Cabral (2002). "Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*." *Parasitol Res* **88**(5), 443-450.
159. Rocha-Azevedo, B., M. Jamerson, G. A. Cabral, F. C. Silva-Filho & F. Marciano-Cabral (2007). "The interaction between the amoeba *Balamuthia mandrillaris* and extracellular matrix glycoproteins in vitro." *Parasitology* **134**(Pt 1), 51-58.
160. Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). "Ecology of free-living amoebae." *Crit Rev Microbiol* **20**(3), 225-241.
161. Rojas-Hernández, S., A. Jarillo-Luna, M. Rodríguez-Monroy, L. Moreno-Fierros & R. Campos-Rodríguez (2004). "Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice." *Parasitol Res* **94**(1), 31-36.
162. Rosenthal, R., S. Milatz, S. M. Krug, B. Oelrich, J. D. Schulzke, S. Amasheh, D. Gunzel & M. Fromm (2010). "Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel." *J Cell Sci* **123**(Pt 11), 1913-1921.
163. Sa-Pereira, I., D. Brites & M. A. Brito (2012). "Neurovascular unit: a focus on pericytes." *Mol Neurobiol* **45**(2), 327-347.
164. Salazar, H. C., H. Moura, O. Fernandes & J. M. Peralta (1986). "Isolation of *Naegleria fowleri* from a lake in the city of Rio de Janeiro, Brazil." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **80**(2), 348-349.

165. Scaglia, M., S. Gatti, R. Brustia, G. Chichino & E. G. Rondanelli (1991). "Phagocytosis of human erythrocytes by *Naegleria* is not related to species pathogenicity. A phase-contrast cinemicrographic study." *Microbiologica* **14**(1), 45-53.
166. Schubert-Unkmeir, A., C. Konrad, H. Slanina, F. Czapek, S. Hebling & M. Frosch (2010). "*Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8." *PLoS Pathog* **6**(4), e1000874.
167. Schuhmann, M. K., S. Bittner, S. G. Meuth, C. Kleinschnitz & F. Fluri (2015). "Fingolimod (FTY720-P) Does Not Stabilize the Blood-Brain Barrier under Inflammatory Conditions in an *in vitro* Model." *Int J Mol Sci* **16**(12), 29454-29466.
168. Schuster, F. L. & G. Svihla (1968). "Ribonucleoprotein-containing vesicles in cysts of *Naegleria gruberi*." *J Protozool* **15**(4), 752-758.
169. Schuster, F. L. & G. S. Visvesvara (2004). "Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals." *Int J Parasitol* **34**(9), 1001-1027.
170. Serrano-Luna, J., I. Cervantes-Sandoval, V. Tsutsumi & M. Shibayama (2007). "A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*." *J Eukaryot Microbiol* **54**(5), 411-417.
171. Shakoor, S., M. A. Beg, S. F. Mahmood, R. Bandea, R. Sriram, F. Noman, F. Ali, G. S. Visvesvara & A. Zafar (2011). "Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan." *Emerg Infect Dis* **17**(2), 258-261.
172. Sharief, M. K., M. A. Noori, M. Ciardi, A. Cirelli & E. J. Thompson (1993). "Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage." *J Neuroimmunol* **43**(1-2), 15-21.
173. Shen, L., C. R. Weber, D. R. Raleigh, D. Yu & J. R. Turner (2011). "Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo." *Annu Rev Physiol* **73**, 283-309.
174. Shibayama, M., M. Martínez-Castillo, A. Silva-Olivares, S. Galindo-Gómez, F. Navarro-García, J. Escobar-Herrera, M. Sabanero, V. Tsutsumi & J. Serrano-Luna (2013). "Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*." *Microbiology* **159**(Pt 2), 392-401.
175. Shibayama, M., J. Serrano-Luna Jde, S. Rojas-Hernandez, R. Campos-Rodriguez & V. Tsutsumi (2003). "Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I." *Can J Microbiol* **49**(3), 164-170.
176. Shimizu, Y., W. Newman, T. V. Gopal, K. J. Horgan, N. Graber, L. D. Beall, G. A. van Seventer & S. Shaw (1991). "Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions." *J Cell Biol* **113**(5), 1203-1212.
177. Shukla, R., D. Nag & A. Chandra (1996). "Terfenadine induced coma mimicking structural brain disease." *J Assoc Physicians India* **44**(10), 745-746.
178. Siddiqui, R. & N. A. Khan (2014). "Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(8), e3017.
179. Silva, N. M., R. M. Manzan, W. P. Carneiro, C. M. Milanezi, J. S. Silva, E. A. Ferro & J. R. Mineo (2010). "*Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability." *Exp Parasitol* **126**(2), 167-177.

180. **Sissons, J., S. Alsam, S. Jayasekera, K. S. Kim, M. Stins & N. A. Khan (2004).** "Acanthamoeba induces cell-cycle arrest in host cells." *J Med Microbiol* **53**(Pt 8), 711-717.
181. **Song, K. J., K. H. Song, J. H. Kim, H. J. Sohn, Y. J. Lee, C. E. Park & H. J. Shin (2008).** "Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and in vitro cytotoxicity." *Parasitol Res* **103**(2), 313-317.
182. **Sood, A., S. Chauhan, L. Chandel & S. C. Jaryal (2014).** "Prompt diagnosis and extraordinary survival from *Naegleria fowleri* meningitis: a rare case report." *Indian J Med Microbiol* **32**(2), 193-196.
183. **Sorokin, L. (2010).** "The impact of the extracellular matrix on inflammation." *Nat Rev Immunol* **10**(10), 712-723.
184. **Sparagano, O. (1993).** "Differentiation of *Naegleria fowleri* and other *Naegleriae* by polymerase chain reaction and hybridization methods." *FEMS Microbiol Lett* **110**(3), 325-330.
185. **Steiner, O., C. Coisne, R. Cecchelli, R. Boscacci, U. Deutsch, B. Engelhardt & R. Lyck (2010).** "Differential roles for endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in shear-resistant T cell arrest, polarization, and directed crawling on blood-brain barrier endothelium." *J Immunol* **185**(8), 4846-4855.
186. **Stevens, A. R., J. De Jonckheere & E. Willaert (1980).** "*Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*." *Int J Parasitol* **10**(1), 51-64.
187. **Takano, T., G. F. Tian, W. Peng, N. Lou, W. Libionka, X. Han & M. Nedergaard (2006).** "Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow." *Nat Neurosci* **9**(2), 260-267.
188. **Thong, Y. H. & A. Ferrante (1986).** "Migration patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp." *Infect Immun* **51**(1), 177-180.
189. **Tilling, T., C. Engelbertz, S. Decker, D. Korte, S. Huwel & H. J. Galla (2002).** "Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures." *Cell Tissue Res* **310**(1), 19-29.
190. **Toney, D. M. & F. Marciano-Cabral (1994).** "Modulation of complement resistance and virulence of *Naegleria fowleri* amoebae by alterations in growth media." *J Eukaryot Microbiol* **41**(4), 337-343.
191. **Trabelsi, H., F. Dendana, A. Sellami, H. Sellami, F. Cheikhrouhou, S. Neji, F. Makni & A. Ayadi (2012).** "Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review." *Pathol Biol (Paris)*.
192. **Tsukada, N., K. Miyagi, M. Matsuda, N. Yanagisawa & K. Yone (1991).** "Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis." *J Neurol Sci* **104**(2), 230-234.
193. **Turner, G. D., H. Morrison, M. Jones, T. M. Davis, S. Loareesuwan, I. D. Buley, K. C. Gatter, C. I. Newbold, S. Pukritayakamee, B. Nagachinta other authors (1994).** "An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration." *Am J Pathol* **145**(5), 1057-1069.
194. **Ueno, M., B. Wu, T. Nakagawa, Y. Nagai, M. Onodera, C. L. Huang, T. Kusaka, K. Kanenishi & H. Sakamoto (2010).** "The expression of LDL receptor in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model." *Histochem Cell Biol* **133**(6), 669-676.

195. Valenzuela, G., E. Lopez-Corella & J. F. De Jonckheere (1984). "Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern México." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **78**(4), 558-559.
196. Van Itallie, C. M., M. S. Balda & J. M. Anderson (1995). "Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junction protein ZO-1 in A431 cells." *J Cell Sci* **108** (Pt 4), 1735-1742.
197. Van Itallie, C. M., T. M. Gambling, J. L. Carson & J. M. Anderson (2005). "Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization." *J Cell Sci* **118**(Pt 7), 1427-1436.
198. Van Teeffelen, J. W., J. Brands, E. S. Stroes & H. Vink (2007). "Endothelial glycocalyx: sweet shield of blood vessels." *Trends Cardiovasc Med* **17**(3), 101-105.
199. Vargas-Zepeda, J., A. V. Gomez-Alcala, J. A. Vasquez-Morales, L. Licea-Amaya, J. F. De Jonckheere & F. Lares-Villa (2005). "Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin." *Arch Med Res* **36**(1), 83-86.
200. Villalba-Magdaleno, J. D., G. Perez-Ishiwara, J. Serrano-Luna, V. Tsutsumi & M. Shibayama (2011). "In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess." *Microbiology* **157**(Pt 5), 1489-1499.
201. Visvesvara, G. S. (2013). "Infections with free-living amebae." *Handb Clin Neurol* **114**, 153-168.
202. Visvesvara, G. S., H. Moura & F. L. Schuster (2007). "Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*." *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**(1), 1-26.
203. Viswambharan, H., T. Seebeck & Z. Yang (2003). "Enhanced endothelial nitric oxide-synthase activity in mice infected with *Trypanosoma brucei*." *Int J Parasitol* **33**(10), 1099-1104.
204. Wang, A., R. Kay, W. S. Poon & H. K. Ng (1993). "Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong." *Clin Neurol Neurosurg* **95**(3), 249-252.
205. Westergaard, E. & M. W. Brightman (1973). "Transport of proteins across normal cerebral arterioles." *J Comp Neurol* **152**(1), 17-44.
206. Whiteman, L. Y. & F. Marciano-Cabral (1987). "Susceptibility of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. to complement-mediated lysis." *Infect Immun* **55**(10), 2442-2447.
207. Wilhelm, I., C. Fazakas & I. A. Krizbai (2011). "In vitro models of the blood-brain barrier." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **71**(1), 113-128.
208. Willaert, E., J. B. Jadin & D. Le Ray (1973). "Comparative antigenic analysis of *Naegleria* species." *Ann Soc Belg Med Trop* **53**(1), 59-61.
209. Williams, D. W., E. A. Eugenin, T. M. Calderon & J. W. Berman (2012). "Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis." *J Leukoc Biol* **91**(3), 401-415.
210. Wiwanitkit, V. (2004). "Review of clinical presentations in Thai patients with primary amoebic meningoencephalitis." *MedGenMed* **6**(1), 2.
211. Wu, Z. Y., J. Pan, Y. Yuan, A. L. Hui, Y. Yang & A. Zhou (2012). "Comparison of prediction models for blood brain barrier permeability and analysis of the molecular descriptors." *Pharmazie* **67**(7), 628-634.

212. Xiong, Y., A. Mahmood, Y. Meng, Y. Zhang, Z. G. Zhang, D. C. Morris & M. Chopp (2012). "Neuroprotective and neurorestorative effects of thymosin beta4 treatment following experimental traumatic brain injury." *Ann N Y Acad Sci* **1270**, 51-58.
213. Yamada, N., S. Nakagawa, S. Horai, K. Tanaka, M. A. Deli, H. Yatsushashi & M. Niwa (2014). "Hepatocyte growth factor enhances the barrier function in primary cultures of rat brain microvascular endothelial cells." *Microvasc Res* **92**, 41-49.
214. Yoder, J. S., B. A. Eddy, G. S. Visvesvara, L. Capewell & M. J. Beach (2010). "The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008." *Epidemiol Infect* **138**(7), 968-975.
215. Yu, D. & J. R. Turner (2008). "Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 709-716.
216. Yu, H., W. Jiang, H. Du, Y. Xing, G. Bai, Y. Zhang, Y. Li, H. Jiang, Y. Zhang, J. Wang other authors (2014). "Involvement of the Akt/NF- κ B pathways in the HTNV-mediated increase of IL-6, CCL5, ICAM-1, and VCAM-1 in HUVECs." *PLoS One* **9**(4), e93810.
217. Zheng, G., Z. Zhang, P. R. Lockman, W. J. Geldenhuys, D. D. Allen, L. P. Dwoskin & P. A. Crooks (2010). "Bis-azaaromatic quaternary ammonium salts as ligands for the blood-brain barrier choline transporter." *Bioorg Med Chem Lett* **20**(11), 3208-3210.
218. Zonta, M., M. C. Angulo, S. Gobbo, B. Rosengarten, K. A. Hossmann, T. Pozzan & G. Carmignoto (2003). "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." *Nat Neurosci* **6**(1), 43-50.

17. ANEXOS

17.1. Artículos científicos aceptados

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@investav.mx

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

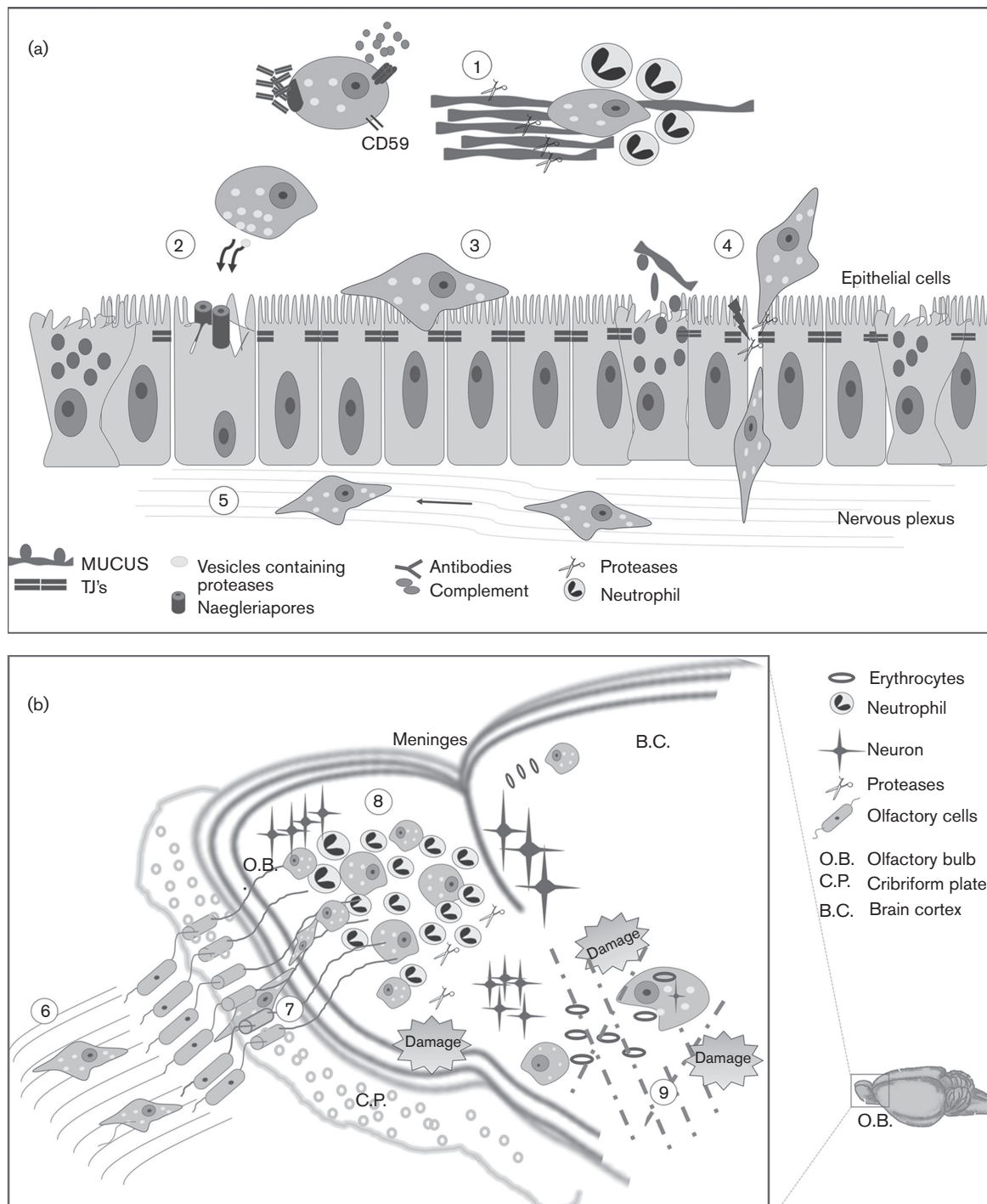


Fig. 1. Schematic representation of *N. fowleri* infection. (a) Initial stages of PAM. (1) Evasion of innate immune response, (2) independent-contact cytotoxicity (naegleriapores), (3) adhesion to epithelial cells, (4) invasion of the neuroepithelium, (5) migration to OBs. (b) Late stages of PAM. (6)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

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

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

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

Taxonomy

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

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

Ecology and morphology

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

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

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

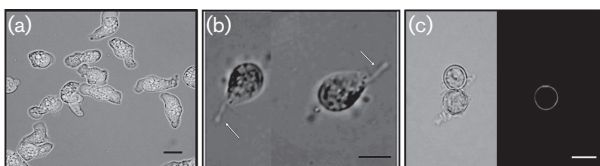


Fig. 2. Different cell stages of *N. fowleri*. (a) Typical morphology of *N. fowleri* trophozoites in axenic culture. (b) Flagellar form induced by isotonic saline solution for 2 h. The flagella (arrows) are evident. (c) Cyst induced by 1323 Page's amoeba saline solution. The cyst wall was stained with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

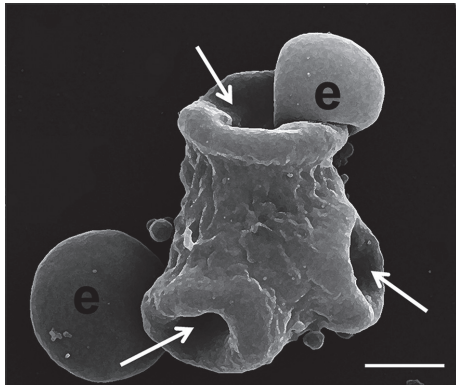


Fig. 3. Scanning electron microscopy of *N. fowleri* trophozoites interacted with erythrocytes. Three phagocytic mouths are seen (arrows), red blood cells (e). Jeol (JSM-6510LV) microscopy. Bar, 5 μ m.

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

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

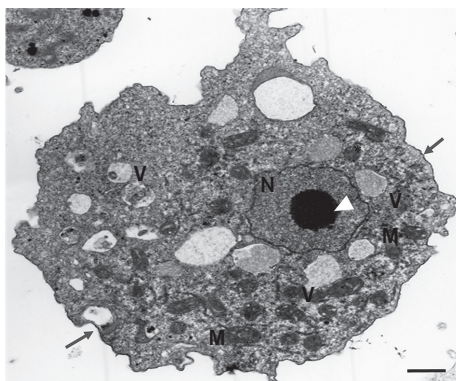


Fig. 4. Transmission electron microscopy. Ultrastructural morphology of *N. fowleri*. Trophozoite cultured in Bacto-casitone medium shows a normal nucleus (N) with a prominent nucleolus (arrowhead). The integrity of the cytoplasmic membrane (arrows) is also observed, and multiple normal mitochondria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

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

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

Epidemiology

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

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

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

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

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

Pathogenesis

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

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

Mechanisms of pathogenicity

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

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

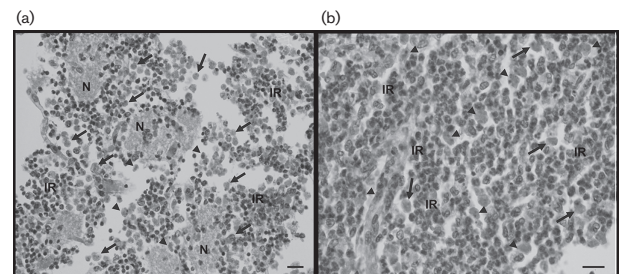


Fig. 5. Histopathology of the OBs infected with *N. fowleri* (mouse model). (a) Sections of OBs 6 days after instillation with the amoebae (arrows). Trophozoites appear to be ingested erythrocytes (arrowheads); lytic necrosis is also seen (N). Magnification, $\times 40$. (b) Important inflammatory reaction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

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

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

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

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

Clinical features

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

Diagnosis

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

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

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

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

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

Treatment

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

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

Table 1. Clinical reports of PAM associated with AmB treatment

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

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

Conclusion

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

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

Acknowledgements

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

References

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

- Belofsky, G., Carreno, R., Goswick, S. M. & John, D. T. (2006).** Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic amoeba *Naegleria fowleri*. *Planta Med* **72**, 383–386.
- Brajtburg, J. & Bolard, J. (1996).** Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol Rev* **9**, 512–531.
- Brown, R. L. (1991).** Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *Arch Intern Med* **151**, 1201–1202.
- Budge, P. J., Lazensky, B., Van Zile, K. W., Elliott, K. E., Dooyema, C. A., Visvesvara, G. S., Beach, M. J. & Yoder, J. S. (2013).** Primary amebic meningoencephalitis in Florida: a case report and epidemiological review of Florida cases. *J Environ Health* **75**, 26–31.
- Butt, C. G., Baro, C. & Knorr, R. W. (1968).** *Naegleria* (sp.) identified in amebic encephalitis. *Am J Clin Pathol* **50**, 568–574.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013).** Investigational drug available directly from CDC for the treatment of infections with free-living amoebae. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **62**, 666.
- Carrasco-Yepey, M., Campos-Rodriguez, R., Godinez-Victoria, M., Rodriguez-Monroy, M. A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., De Oca, A. C. & Rojas-Hernandez, S. (2013).** *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of alpha-D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitol Res* **112**, 3615–3625.
- Carter, R. F. (1969).** Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria* sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. *J Clin Pathol* **22**, 470–474.
- Carter, R. F. (1970).** Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol* **100**, 217–244.
- Carter, R. F., Cullity, G. J., Ojeda, V. J., Silberstein, P. & Willaert, E. (1981).** A fatal case of meningoencephalitis due to a free-living amoeba of uncertain identity – probably *Acanthamoeba* sp. *Pathology* **13**, 51–68.
- Cavalier-Smith, T., Fiore-Donno, A. M., Chao, E., Kudryavtsev, A., Berney, C., Snell, E. A. & Lewis, R. (2015).** Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Mol Phylogenet Evol* **83**, 293–304.
- Cerva, L. (1969).** Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science* **163**, 576.
- Cerva, L. & Novak, K. (1968).** Amoebic meningoencephalitis: 16 fatalities. *Science* **160**, 92.
- Cerva, L., Novak, K. & Culbertson, C. G. (1968).** An outbreak of acute, fatal amebic meningoencephalitis. *Am J Epidemiol* **88**, 436–444.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2008a).** Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol Int* **57**, 307–313.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2008b).** Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology* **154**, 3895–3904.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2010).** Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitol Res* **106**, 695–701.
- Chang, S. L. (1979).** Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba. *Folia Parasitol* **26**, 195–200.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., Castañón, G., Bonilla, P., González-Lázaro, M., Hernández-Martínez, D., Salazar-Villatoro, L., Esparza-García, A., Martínez-Palomo, A. & Ortega-Pierres, G. (2009).** Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *J Eukaryot Microbiol* **56**, 66–72.
- Chávez-Munguía, B., Segovia-Gamboa, N., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M. & Martínez-Palomo, A. (2011).** *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *J Eukaryot Microbiol* **58**, 463–468.
- Cogo, P. E., Scagli, M., Gatti, S., Rossetti, F., Alaggio, R., Laverda, A. M., Zhou, L., Xiao, L. & Visvesvara, G. S. (2004).** Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerg Infect Dis* **10**, 1835–1837.
- Cope, J. R., Conrad, D. A., Cohen, N., Cotilla, M., DaSilva, A., Jackson, J. & Visvesvara, G. S. (2016).** Use of the novel therapeutic agent miltefosine for the treatment of primary amoebic meningoencephalitis: report of 1 fatal and 1 surviving case. *Clin Infect Dis* **62**, 774–776.
- Cubero-Menéndez, O. & Cubero-Rego, D. (2004).** Primary amoebic meningoencephalitis: a case report. *Rev Neurol* **38**, 336–338.
- da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B. & Marciano-Cabral, F. (2009).** Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdis Perspect Infect Dis* **2009**, 1–14.
- De Jonckheere, J. F. (1982).** Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann Microbiol* **133**, 319–342.
- De Jonckheere, J. F. (2004).** Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist* **155**, 89–103.
- De Jonckheere, J. F. (2011).** Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* **11**, 1520–1528.
- De Jonckheere, J. F. (2012).** The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiol* **7**, 5–7.
- De Jonckheere, J. F. (2014).** What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp Parasitol* **145**, 1–8.
- Debnath, A., Tunac, J. B., Galindo-Gomez, S., Silva-Olivares, A., Shibayama, M. & McKerrow, J. H. (2012).** Corifungin, a new drug lead against *Naegleria*, identified from a high-throughput screen. *Antimicrobial Agen Chemother* **56**, 5450–5457.
- Diaz, J. H. & Boudreaux, J. P. (2013).** Emerging trends in free-living amebic infections of the brain: implications for organ transplantation. *J La State Med Soc* **165**, 314–318.
- Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H. & De Vries, P. J. (2012).** Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **67**, 2576–2597.
- Duma, R. J., Rosenblum, W. I., McGehee, R. F., Jones, M. M. & Nelson, E. C. (1971).** Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. *Ann Intern Med* **74**, 923–931.
- Dyková, I., Kyselová, I., Pecková, H., Oborník, M. & Lukes, J. (2001).** Identity of *Naegleria* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Dis Aquat Organ* **46**, 115–121.
- Feldman, M. R. (1977).** *Naegleria fowleri*: fine structural localization of acid phosphatase and heme proteins. *Exp Parasitol* **41**, 283–289.
- Ferrante, A. & Thong, Y. H. (1979).** Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* **9**, 599–601.
- Fowler, M. & Carter, R. F. (1965).** Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* **2**, 740–742.
- Fritz-Laylin, L. K. & Cande, W. Z. (2010).** Ancestral centriole and flagella proteins identified by analysis of *Naegleria* differentiation. *J Cell Sci* **123**, 4024–4031.
- Fritz-Laylin, L. K., Prochnik, S. E., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Carpenter, M. L., Field, M. C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J. & other authors (2010).** The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**, 631–642.
- Fritz-Laylin, L. K., Ginger, M. L., Walsh, C., Dawson, S. C. & Fulton, C. (2011).** The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends

- unique insights into core eukaryotic cell biology. *Res Microbiol* **162**, 607–618.
- Fulton, C. (1977).** Intracellular regulation of cell shape and motility in *Naegleria*. First insights and a working hypothesis. *J Supramol Struct* **6**, 13–43.
- Han, K. L., Lee, H. J., Shin, M. H., Shin, H. J., Im, K. I. & Park, S. J. (2004).** The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol Res* **94**, 53–60.
- Hannisch, W. & Hallagan, L. F. (1997).** Primary amoebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature. *Wild Environ Med* **8**, 211–213.
- Hara, T. & Fukuma, T. (2005).** Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Parasitol Int* **54**, 219–221.
- Heggie, T. W. (2010).** Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis* **8**, 201–206.
- Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F. & Leippe, M. (2002).** Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoan *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* **277**, 22353–22360.
- Hysmith, R. M. & Franson, R. C. (1982).** Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim Biophys Acta* **711**, 26–32.
- Jaffar-Bandjee, M. C., Alessandri, J. L., Molet, B., Clouzeau, J., Jacquemot, L., Sampéris, S. & Saly, J. C. (2005).** Primary amoebic meningoencephalitis: 1st case observed in Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* **98**, 11–13.
- Jain, R., Prabhakar, S., Modi, M., Bhatia, R. & Sehgal, R. (2002).** *Naegleria* meningitis: a rare survival. *Neurol India* **50**, 470–472.
- Jamerson, M., Da Rocha-Azevedo, B., Cabral, G. A. & Marciano-Cabral, F. (2012).** Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins. *Microbiology* **158**, 791–803.
- Jarolim, K. L., McCosh, J. K., Howard, M. J. & John, D. T. (2000).** A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amoebic meningoencephalitis in mice. *J Parasitol* **86**, 50–55.
- John, D. T. (1982).** Primary amoebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Ann Rev Microbiol* **36**, 101–123.
- Kaur, H., Seifert, K., Hawkes, G. E., Coumbarides, G. S., Alvar, J. & Croft, S. L. (2015).** Chemical and bioassay techniques to authenticate quality of the anti-leishmanial drug miltefosine. *Am J Trop Med Hyg* **92**, 31–38.
- Kidney, D. D. & Kim, S. H. (1998).** CNS infections with free-living amoebas: neuroimaging findings. *AJR Am J Roentgenol* **171**, 809–812.
- Kim, J. H., Jung, S. Y., Lee, Y. J., Song, K. J., Kwon, D., Kim, K., Park, S., Im, K. I. & Shin, H. J. (2008a).** Effect of therapeutic chemical agents *in vitro* and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agen Chemother* **52**, 4010–4016.
- Kim, J. H., Kim, D. & Shin, H. J. (2008b).** Contact-independent cell death of human microglial cells due to pathogenic *Naegleria fowleri* trophozoites. *Korean J Parasitol* **46**, 217–221.
- Kim, J. H., Lee, Y. J., Sohn, H. J., Song, K. J., Kwon, D., Kwon, M. H., Im, K. I. & Shin, H. J. (2008c).** Therapeutic effect of rokitamycin *in vitro* and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Int J Antimicrob Agen* **32**, 411–417.
- Klemba, M. & Goldberg, D. E. (2002).** Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* **71**, 275–305.
- Kyle, D. E. & Noblet, G. P. (1985).** Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J Protozool* **32**, 99–105.
- Kyle, D. E. & Noblet, G. P. (1987).** Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J Protozool* **34**, 10–15.
- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J. F., De Moura, H., Rechi-Irretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C. & Visvesvara, G. S. (1993).** Five cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *J Clin Microbiol* **31**, 685–688.
- Lares-Villa, F. (2001).** Free-living amoebae infections in Mexico. In *Proceedings IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae*. Paris, France: John Libbey Eurotext.
- Lares-Villa, F. & Hernández-Peña, C. (2010).** Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007–October 2008). *Exp Parasitol* **126**, 33–36.
- Lee, J., Kim, J. H., Sohn, H. J., Yang, H. J., Na, B. K., Chwae, Y. J., Park, S., Kim, K. & Shin, H. J. (2014).** Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitol Res* **113**, 2765–2776.
- Lee, Y. J., Kim, J. H., Jeong, S. R., Song, K. J., Kim, K., Park, S., Park, M. S. & Shin, H. J. (2007).** Production of Nfa1-specific monoclonal antibodies that influences the *in vitro* cytotoxicity of *Naegleria fowleri* trophozoites on microglial cells. *Parasitol Res* **101**, 1191–1196.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J. & other authors (1980).** A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**, 37–58.
- Linam, W. M., Ahmed, M., Cope, J. R., Chu, C., Visvesvara, G. S., Da Silva, A. J., Qvarnstrom, Y. & Green, J. (2015).** Successful treatment of an adolescent with *Naegleria fowleri* primary amoebic meningoencephalitis. *Pediatrics* **135**, e744–748.
- Loschiavo, F., Ventura-Spagnolo, T., Sessa, E. & Bramanti, P. (1993).** Acute primary meningoencephalitis from *Naegleria fowleri*: report of a clinical case with a favourable outcome. *Acta Neurol* **15**, 333–340.
- López-Corella, E., De León, B. & De Jonckheere, J. F. (1989).** Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in an adolescent from Huetamo, Michoacan, Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex* **46**, 619–622.
- Macleán, R. C., Richardson, D. J., LePardo, R. & Marciano-Cabral, F. (2004).** The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitol Res* **93**, 211–217.
- Madarová, L., Trnková, K., Feiková, S., Klement, C. & Obernauerová, M. (2010).** A real-time PCR diagnostic method for detection of *Naegleria fowleri*. *Exp Parasitol* **126**, 37–41.
- Marciano-Cabral, F. & John, D. T. (1983).** Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study. *Infect Immun* **40**, 1214–1217.
- Marciano-Cabral, F. (1988).** Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* **52**, 114–133.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. A. (2007).** The immune response to *Naegleria fowleri* amoebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**, 243–259.
- Martinez, A. J., Nelson, E. C., Jones, M. M., Duma, R. J. & Rosenblum, W. I. (1971).** Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study. *Lab Invest* **25**, 465–475.
- Martinez, A. J. & Visvesvara, G. S. (1991).** Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. *Clin Lab Med* **11**, 861–872.
- Martinez, A. J. & Visvesvara, G. S. (1997).** Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas. *Brain Pathol* **7**, 583–598.
- Martinez, J., Duma, R. J., Nelson, E. C. & Moretta, F. L. (1973).** Experimental naegleria meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study. *Lab Invest* **29**, 121–133.
- Martínez-Castillo, M., Ramírez-Rico, G., Serrano-Luna, J. & Shibayama, M. (2015).** Iron-binding protein degradation by cysteine proteases of *Naegleria fowleri*. *Biomed Res Int* **2015**, 416712–416718.

- Mat Amin, N. (2004).** Proteinases in *Naegleria fowleri* (strain NF3), a pathogenic amoeba: a preliminary study. *Trop Biomed* **21**, 57–60.
- McKerrow, J. H., Rosenthal, P. J., Swenerton, R. & Doyle, P. (2008).** Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr Opin Infect Dis* **21**, 668–672.
- Mishra, B. B., Gundra, U. M. & Teale, J. M. (2009).** Toll-like receptors in CNS parasitic infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **336**, 83–104.
- Naqi, R. & Azeemuddin, M. (2013).** *Naegleria* infection of the central nervous system, CT scan findings: a case series. *J Pak Med Assoc* **63**, 399–402.
- Norton, R., Harris, P., Ryan, P. & Simpson, S. (2010).** Another killer of the Australian bush: a rapidly fatal meningoencephalitis in a child. *Clin Infect Dis* **50**, 1422–1424.
- Pantchev, N. & Tappe, D. (2011).** Pentastomiasis and other parasitic zoonoses from reptiles and amphibians. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **124**, 528–535.
- Patterson, M., Woodworth, T. W., Marciano-Cabral, F. & Bradley, S. G. (1981).** Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. *J Bacteriol* **147**, 217–226.
- Poungvarin, N. & Jariya, P. (1991).** The fifth nonlethal case of primary amoebic meningoencephalitis. *J Med Assoc Thai* **74**, 112–115.
- Pélandakis, M., Serre, S. & Pernin, P. (2000).** Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* **47**, 116–121.
- Qvarnstrom, Y., Da Silva, A. J., Schuster, F. L., Gelman, B. B. & Visvesvara, G. S. (2009).** Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* **199**, 1139–1142.
- Rice, C. A., Colon, B. L., Alp, M., Goker, H., Boykin, D. W. & Kyle, D. E. (2015).** Bis-Benzimidazole hits against *Naegleria fowleri* discovered with new high-throughput screens. *Antimicrob Agen Chemother* **59**, 2037–2044.
- Rivera-Aguilar, V., Hernández-Martínez, D., Rojas-Hernández, S., Oliver-Aguillón, G., Tsutsumi, V., Herrera-González, N. & Campos-Rodríguez, R. (2000).** Immunoblot analysis of IgA antibodies to *Naegleria fowleri* in human saliva and serum. *Parasitol Res* **86**, 775–780.
- Robinson, B. S., Monis, P. T. & Dobson, P. J. (2006).** Rapid, sensitive, and discriminating identification of *Naegleria* spp. by real-time PCR and melting-curve analysis. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5857–5863.
- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994).** Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* **20**, 225–241.
- Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L. & Campos-Rodríguez, R. (2004).** Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res* **94**, 31–36.
- Réveiller, F. L., Cabanes, P. A. & Marciano-Cabral, F. (2002).** Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* **88**, 443–450.
- Sajid, M. & McKerrow, J. H. (2002).** Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* **120**, 1–21.
- Scaglia, M., Gatti, S., Brustia, R., Chichino, G. & Rondanelli, E. G. (1991).** Phagocytosis of human erythrocytes by *Naegleria* is not related to species pathogenicity. A phase-contrast cinemicrographic study. *Microbiologica* **14**, 45–53.
- Schuster, F. (1963).** An electron microscope study of the amoeba-flagellate, *Naegleria gruberi* (Schardinger). I. The amoeboid and flagellate stages. *J Protozool* **10**, 297–313.
- Schuster, F. L. & Rechthand, E. (1975).** *In vitro* effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboid flagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* **8**, 591–605.
- Schuster, F. L. & Visvesvara, G. S. (2004).** Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* **34**, 1001–1027.
- Serrano-Luna, J., Cervantes-Sandoval, I., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2007).** A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. *J Eukaryot Microbiol* **54**, 411–417.
- Shakoor, S., Beg, M. A., Mahmood, S. F., Bandea, R., Sriram, R., Noman, F., Ali, F., Visvesvara, G. S. & Zafar, A. (2011).** Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* **17**, 258–261.
- Sharma, A. & Guleria, S. (2015).** Successful treatment of a case of primary amoebic meningoencephalitis: how important is history taking. *Indian J Crit Care Med* **19**, 126–127.
- Shibayama, M., Serrano-Luna, J., Rojas-Hernández, S., Campos-Rodríguez, R. & Tsutsumi, V. (2003).** Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Can J Microbiol* **49**, 164–170.
- Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Navarro-García, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi, V. & Serrano-Luna, J. (2013).** Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology* **159**, 392–401.
- Siddiqui, R. & Khan, N. A. (2014).** Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3017.
- Sifuentes, L. Y., Choate, B. L., Gerba, C. P. & Bright, K. R. (2014).** The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. *J Environ Sci Health, Part A* **49**, 1322–1330.
- Simpson, A. G. (2003).** Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1759–1777.
- Sohn, H. J., Kim, J. H., Shin, M. H., Song, K. J. & Shin, H. J. (2010).** The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* **106**, 917–924.
- Song, K. J., Song, K. H., Na, B. K., Kim, J. H., Kwon, D., Park, S., Pak, J. H., Im, K. I. & Shin, H. J. (2007).** Molecular cloning and characterization of a cytosolic heat shock protein 70 from *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* **100**, 1083–1089.
- Song, K. J., Song, K. H., Kim, J. H., Sohn, H. J., Lee, Y. J., Park, C. E. & Shin, H. J. (2008).** Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and *in vitro* cytotoxicity. *Parasitol Res* **103**, 313–317.
- Sood, A., Chauhan, S., Chandel, L. & Jaryal, S. C. (2014).** Prompt diagnosis and extraordinary survival from *Naegleria fowleri* meningitis: a rare case report. *Indian J Med Microbiol* **32**, 193–196.
- Sugita, Y., Fujii, T., Hayashi, I., Aoki, T., Yokoyama, T., Morimatsu, M., Fukuma, T. & Takamiya, Y. (1999).** Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Pathol Int* **49**, 468–470.
- Tiewcharoen, S., Komalamisra, N. & Junnu, V. (2004).** Zymogram patterns of *Naegleria* spp isolated from natural water sources in Taling Chan district, Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* **35**, 275–280.
- Tiphine, M., Letscher-Bru, V. & Herbrecht, R. (1999).** Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis* **1**, 273–283.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. & Ayadi, A. (2012).** Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* **60**, 399–405.
- Tyndall, R. L. & Domingue, E. L. (1982).** Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* **44**, 954–959.

- Valenzuela, G., López-Corella, E. & De Jonckheere, J. F. (1984).** Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **78**, 558–559.
- Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A. V., Vásquez-Morales, J. A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J. F. & Lares-Villa, F. (2005).** Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch Med Res* **36**, 83–86.
- Visvesvara, G. S., Moura, H. & Schuster, F. L. (2007).** Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**, 1–26.
- Visvesvara, G. S. (2013).** Infections with free-living amoebae. *Handb Clin Neurol* **114**, 153–168.
- Wang, A., Kay, R., Poon, W. S. & Ng, H. K. (1993).** Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *Clin Neurol Neurosurg* **95**, 249–252.
- WHO (2009).** www.who.int/topics/epidemiology/en/.
- Yadav, D., Aneja, S., Dutta, R., Maheshwari, A. & Seth, A. (2013).** Youngest survivor of *Naegleria meningitis*. *Indian J Pediatr* **80**, 253–254.
- Yoder, J. S., Eddy, B. A., Visvesvara, G. S., Capewell, L. & Beach, M. J. (2010).** The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962–2008. *Epidemiol Infect* **138**, 968–975.
- Yoder, J. S., Straif-Bourgeois, S., Roy, S. L., Moore, T. A., Visvesvara, G. S., Ratard, R. C., Hill, V. R., Wilson, J. D., Linscott, A. J. & other authors (2012).** Primary amoebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clin Infect Dis* **55**, e79–85.
- Yousuf, F. A., Siddiqui, R., Subhani, F. & Khan, N. A. (2013).** Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. *J Water Health* **11**, 371–375.
- Zhang, L., Marciano-Cabral, F. & Bradley, S. G. (1988).** Effects of cyclophosphamide and a metabolite, acrolein, on *Naegleria fowleri* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 962–965.



Memoria del 44º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Papel de la inflamación en la meningoencefalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*

Role of inflammation in the primary amoebic meningoencephalitis produced by *Naegleria fowleri*

Coronado-Velázquez, Daniel¹ y Shibayama, Mineko^{1*}

1. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN.

*Correspondencia. CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México. CP 07360. Tel: +52(55)57473348, mineko@cinvestav.mx

Resumen

Las amibas de vida libre son microorganismos eucariotas ampliamente distribuidos en la naturaleza, caracterizados por ser organismos anfizóicos. Entre estos microorganismos se encuentra *Naegleria fowleri*, la cual puede ser patógena y causar en el humano la meningoencefalitis amibiana primaria. La infección puede ocurrir en individuos sanos que realizan actividades acuáticas en aguas donde se encuentre esta amiba. *N. fowleri* puede ingresar al ser humano por la vía nasal, atravesando el neuroepitelio olfatorio, migrando por los nervios olfatorios hasta llegar a los bulbos olfatorios en el sistema nervioso central. Este proceso de invasión se lleva a cabo debido a diversos mecanismos de patogenicidad que despliega la amiba en los tejidos del hospedero, presentes en la cavidad olfatoria, hasta llegar a los bulbos olfatorios. Una vez instalada en el cerebro, la amiba es capaz de producir una fuerte reacción inflamatoria que promueve la muerte del hospedero en un tiempo muy corto (7-10 días). Por estas razones se requiere conocer con más profundidad a este protozooario, para así contar con métodos de diagnóstico y tratamiento oportuno contra esta infección, ya que se trata de una enfermedad de progresión rápida y mortal.

Palabras clave: *Naegleria fowleri*, sistema nervioso central, neuroepitelio olfatorio, bulbos olfatorios, meningoencefalitis amibiana primaria, reacción inflamatoria.

Abstract

The free living amoebae are eukaryotic microorganisms with a cosmopolite distribution and characterized as amphizoic organisms. *Naegleria fowleri* belongs to this group, and it is the only pathogen for the human beings, causing the primary amoebic meningoencephalitis, that occurs in healthy patients with a recent history of swimming activities. *N. fowleri* enters by the nasal route through the olfactory neuroepithelium and migrating by the olfactory nerves until reach the olfactory bulbs in the central nervous system. This invasion process is carried out through several mechanisms that the amoeba displays in the host tissues, from the olfactory neuroepithelium to the brain. Once installed in the olfactory bulbs, *N. fowleri* is able to produce a strong inflammatory reaction that promotes the death of the host at 7 to 10 days after the infection. For these reasons, it is necessary to study with more detail this microorganism, in order to improve the diagnosis and treatment against the infection produced by this amoeba.

Keywords: *Naegleria fowleri*, central nervous system, olfactory neuroepithelium, olfactory bulbs, primary amoebic meningoencephalitis, inflammatory reaction.

Naegleria fowleri

Las amibas de vida libre (AVL) poseen una distribución cosmopolita, además se caracterizan por ser organismos anfibios teniendo la capacidad de completar su ciclo de vida sin la necesidad de invadir a un organismo hospedero [1]. Dentro de las AVL de importancia médica se encuentran *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* de las que se conoce que pueden causar patologías importantes en el sistema nervioso central (SNC) en los seres humanos [2]. Dentro del género *Naegleria* se conocen alrededor de 30 especies reportadas [3], siendo solo *N. fowleri* la única especie capaz de infectar al humano y producir la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) la cual es una enfermedad aguda y fulminante, común en niños y adultos jóvenes que presentan una historia reciente de natación [1,4,5]. Esta amiba ha sido aislada del suelo, lagos, de aguas termales y en general en cuerpos de agua dulce artificiales o naturales, siendo capaz de proliferar en temperaturas de 37 a 45°C y en ambientes con un amplio rango de pH (4.6-9.5) [4,6,7]. Los trofozoítos de *N. fowleri* pueden invadir al ser humano a través de la vía nasal (Figura 1a, b) [8,9]; una vez en la cavidad olfatoria se adhieren al neuroepitelio olfatorio (Figura 1c) [10-12] y migran entre las células sustentaculares tanto por la vía paracelular o transcelular hasta alcanzar la fila olfatoria que está compuesta por manojos de nervios amielínicos para continuar su migración atravesando la placa cribosa o hueso etmoides e instalarse en los bulbos olfatorios en el SNC (Figura 1d) [11-13]. Este protozoario posee la capacidad de producir daño sobre el tejido neuronal de los bulbos olfatorios a través de mecanismos de patogenicidad como son la adhesión, fagocitosis y la secreción de enzimas como fosfolipasas y cisteína proteasas [1,14-18], lo cual es potenciado por una fuerte reacción inflamatoria que se presenta en los bulbos olfatorios proveniente del torrente sanguíneo sugiriendo la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), provocando el rápido reclutamiento de células inflamatorias principalmente de macrófagos y neutrófilos en las zonas donde se encuentran las amibas, culminando en la lisis de las células inflamatorias

que conlleva a una necrosis muy importante en el cerebro y a lo que se le denomina como MAP, lo que provoca la muerte del hospedero en pocos días después de iniciada la infección [8,13]. Por lo tanto, es de suma importancia adquirir un mayor conocimiento acerca de los procesos de invasión y daño que ocasiona este protozoario para desarrollar nuevas estrategias para la prevención, diagnóstico y tratamiento contra la MAP producida por *N. fowleri*.

Ciclo de vida y morfología

Durante su ciclo de vida *N. fowleri* presenta tres formas o estadios: el trofozoíto, flagelado y el quiste; estos estadios se presentarán dependiendo del ambiente donde se encuentren las amibas. El trofozoíto (10-25 μm) es la forma móvil y la que es capaz de alimentarse y dividirse (Figura 2a). En estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET), los trofozoítos de *N. fowleri* presentan retículo endoplásmico liso y rugoso, contienen un gran número de mitocondrias en forma de campana, numerosas vacuolas, así como un núcleo con un nucléolo muy prominente [1,6,12]. En su vida libre, las amibas son capaces de alimentarse de bacterias o materia orgánica suspendida en la columna de agua donde la amiba habita [2,19]. El trofozoíto puede transformarse al estadio de flagelado (10-16 μm) debido a la carencia de nutrientes, este cambio de fase le proporciona la capacidad de desplazarse hacia ambientes más favorables (Figura 2b). Este estadio se caracteriza por tener una morfología piriforme y presentar de 2 a 4 flagelos [20]. Cuando el trofozoíto o el flagelado se encuentran en condiciones adversas tales como cambios de pH o desecación, pueden transformarse al estadio de quiste (8-12 μm), el cual es su forma de resistencia ante el estrés ambiental (Figura 2c) [21]. El quiste es de forma esférica con una doble pared compuesta principalmente por celulosa. La pared externa del quiste presenta poros llamados ostiolos, por donde es capaz de emerger el trofozoíto una vez que se encuentre en un ambiente favorable [22]. Por otro lado, aunque solo se reporta al trofozoíto como la forma infectiva no se descarta que tanto el quiste como el flagelado puedan infectar a un hospedero [6,12,23].

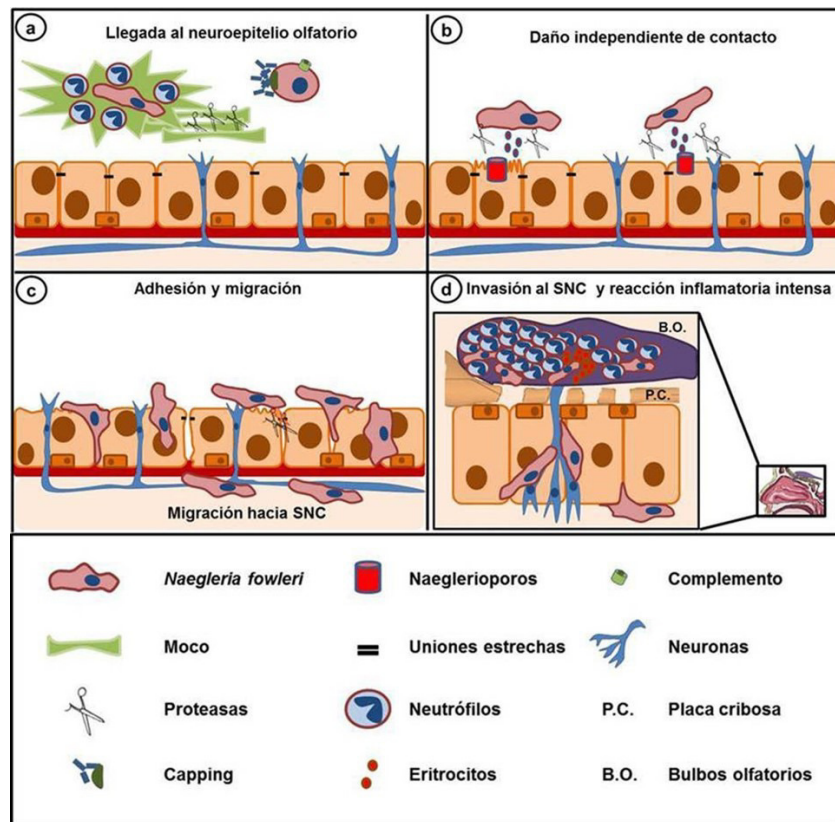


Figura 1. Proceso de invasión de *N. fowleri* al SNC. a) Llegada al neuroepitelio olfatorio. b) Daño independiente de contacto. c) Adhesión y migración. d) Invasión al SNC y presencia de reacción inflamatoria.

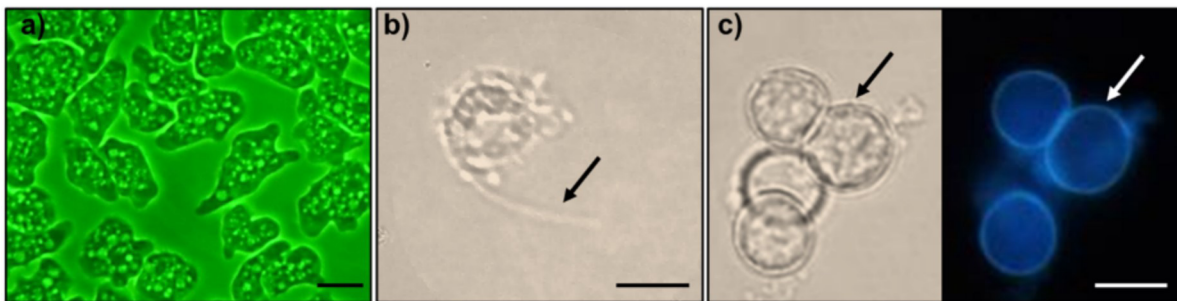


Figura 2. Ciclo de vida de *N. fowleri*. a) Morfología de los trofozoítos de *N. fowleri* en cultivo axénico. 40x. b) Forma flagelada inducida en solución salina isotónica durante 2 h, se observa la presencia del flagelo (flecha). c) Quistes inducidos en solución salina con blanco de calcofluor (flecha). Las imágenes fueron tomadas a través de un microscopio Nikon eclipse 80i. 60x. Barra = 10 μ m.

Patogénesis

Debido a que *N. fowleri* produce una encefalitis aguda, se estableció el modelo de la MAP experimental en el ratón, para tratar de comprender el proceso de la infección tal como ocurre en el humano [10,11,13,24]. En los años 70's, mediante MET se describieron las etapas tempranas de invasión de *N. fowleri* en el modelo murino, donde se observó que la amiba es capaz

de adherirse a las células del neuroepitelio olfatorio y migrar a través de sus uniones intercelulares para llegar a los plexos nerviosos conformados por neuronas olfatorias bipolares y así continuar su migración hacia el SNC [11,12]. En trabajos más recientes se observó que las amibas son capaces de adherirse y penetrar el neuroepitelio olfatorio desde la primera hora hasta las 12 horas post-infección (PI) [10,11], de igual manera se evaluaron en los tiempos de 30 min

hasta los 4 días PI, observándose que las amibas cruzan la placa cribosa ubicada en el hueso etmoides para instalarse en los bulbos olfatorios provocando una fuerte reacción inflamatoria de tipo agudo, constituida principalmente por neutrófilos [10,11,13]. Finalmente a los 5 días PI, se observaron extensas zonas de necrosis, hemorragia, amibas y gran cantidad de polimorfonucleares en los bulbos olfatorios, en estas etapas avanzadas de la infección (7 días) los animales murieron debido a la intensa respuesta inflamatoria y a la lisis de estas células en el SNC (Figura 3) [13].

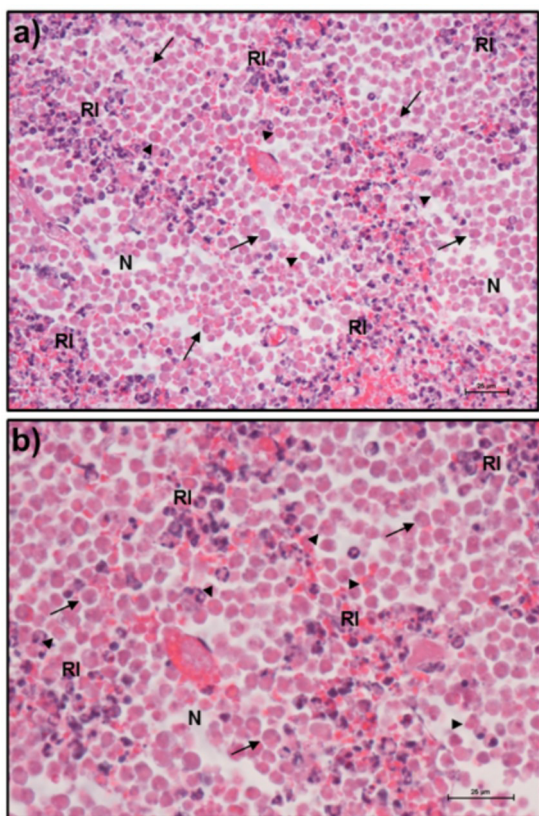


Figura 3. Histopatología de bulbos olfatorios de ratones infectados con *N. fowleri*. a) Corte de bulbos olfatorios 7 días post-institución con las amibas (flechas). Fagocitosis de eritrocitos (cabezas de flecha), se observan áreas de necrosis (N) y reacción inflamatoria (RI). 40x. b) Se observan con mayor detalle a las amibas (flechas), la eritrofagocitosis (cabezas de flecha) y áreas con reacción inflamatoria (RI). 60x. Barra = 25 μ m.

Cuadro clínico

Los síntomas de la MAP se presentan a partir de la primera semana de la infección, entre los síntomas se encuentran dolor de cabeza, náuseas, vómito en proyectil, fiebre y rinitis, así como otros signos de daño neurológico como rigidez del cuello y confusión hasta progresar rápidamente al

estado de coma, culminando con la muerte del paciente entre el séptimo o décimo día después del inicio de los primeros síntomas [5,25-27]. En muestras de cerebro post-mortem de pacientes con MAP, se observa microscópicamente que los bulbos olfatorios se encuentran desorganizados y hemorrágicos, así como zonas completamente invadidas por amibas [28]. Otra de las consecuencias relacionadas a la muerte del individuo, es el aumento en la presión intracraneal, la cual puede alcanzar hasta los 600 mm H₂O propiciando aún más el daño al tejido cerebral [4,5]. El cuadro clínico que presenta esta infección es muy similar a las meningoencefalitis producidas por hongos, bacterias y virus [8], pero diferente a la provocada por las amibas de vida libre *B. mandrillaris* y *Acanthamoeba* spp. las cuales provocan una encefalitis de tipo granulomatosa [20]. Por lo tanto, es muy importante implementar métodos de diagnóstico certeros que serán de gran importancia para identificar a *N. fowleri* como agente etiológico de esta patología lo cual permitirá iniciar un tratamiento eficaz y oportuno.

Epidemiología

Como se describió anteriormente esta infección es común en niños y jóvenes adultos sanos, que realizaron actividades acuáticas recreativas principalmente en los meses más cálidos del año. En la MAP producida por *N. fowleri* se reportan alrededor de 300 casos a nivel mundial [9,25] y 15 casos de recuperación hasta el año 2016 [26,29]. En el año de 1965 se registró el primer caso de MAP en Australia, donde el paciente murió con un diagnóstico de meningitis piógena de etiología desconocida [30]. La mayoría de los casos han sido reportados en Estados Unidos [31,32], Australia [30] y en la República Checa [33]. A la fecha en México se han reportado alrededor de 30 casos de MAP, ocurriendo el primer caso de MAP en Mexicali, Baja California [34] y posteriormente se reportaron más casos en la región central del territorio mexicano [35-37]. Desafortunadamente tanto en nuestro país como en el resto del mundo el registro epidemiológico de esta enfermedad no se encuentra bien documentado, lo cual requiere del conocimiento de esta enfermedad por parte de la comunidad médica para poder contar con datos epidemiológicos correctos y que sean reportados en el sistema de salud de nuestro país y en todo el mundo.

Diagnóstico

Dado que la MAP es una patología de rápido desarrollo, se requieren llevar a cabo técnicas de diagnóstico rápidas. La primera elección debe ser el análisis del sedimento del líquido cefalorraquídeo (LCR) obteniéndose mediante punción lumbar en el paciente, en caso de infección, el color del LCR puede observarse de color gris a amarillento debido a la presencia de leucocitos (300 células mm^{-3} hasta 26,000 células mm^{-3}), eritrocitos (250 células/ mm^{-3} hasta 24,600 células mm^{-3}) y al aumento en la concentración de proteínas (100 mg/100 mL hasta los 1000 mg/100 mL) [4,28]; posteriormente la muestra debe ser evaluada a través de microscopia de luz observando la presencia de trofozoitos móviles con emisión de pseudópodos, también puede utilizarse la tinción de Giemsa para visualizar mejor a las amibas [8,20]. Por otro lado, además de analizar el sedimento del LCR por microscopia de campo claro, es posible realizar la prueba de enflagelación. Esta prueba consiste en colocar el sedimento del LCR en solución salina estéril a temperatura ambiente por dos horas hasta observar la diferenciación al estadio de flagelado, esta prueba es muy rápida y específica para poder diferenciar con otros protozoarios que pueden producir meningoencefalitis como *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris* [26,38]. También se han desarrollado técnicas con mayor sensibilidad para evaluar la presencia de un solo trofozoito de *N. fowleri* en muestras ambientales y clínicas, tales como PCR tiempo real, multiplex y anidada. Estas técnicas están basadas en la amplificación de fragmentos de genes relacionados con la virulencia de *N. fowleri*, como es el caso del gen *Mp2Cl5* relacionado con una proteína de membrana que se encuentra sobre-expresado solo en la especie patógena del género *Naegleria*; otra manera de detección es mediante la amplificación de los espaciadores internos de transcripción (ITS) que se encuentran en la subunidad 18S del RNA ribosomal de estas amibas, los cuales han demostrado ser útiles para poder diferenciar entre las especies del género *Naegleria* [39-46]. Por otro lado, se han reportado casos de MAP donde las técnicas de imagen como la tomografía computarizada y de resonancia magnética, juegan un papel importante en el diagnóstico, ya que se logran observar lesiones multifocales y edema en el paciente [47]. Por todo esto, es de suma importancia que los médicos realicen una historia clínica detallada del paciente, ya que la mayoría de las confirmaciones de casos de MAP en los humanos han sido realizadas en

muestras de cerebros post-mortem realizando estudios histopatológicos utilizando la tinción de hematoxilina & eosina [30,48,49].

Tratamiento

Desde los primeros casos diagnosticados como MAP, la comunidad científica y médica enfocada en el estudio de *N. fowleri*, ha implementado el uso de diversos fármacos para tratar de combatir a este protozoario [50]. En 1969 Rodney Carter observó que la amfotericina B (AmB), fármaco que es utilizado contra infecciones por hongos, logró tener actividad amebicida en contra de *N. fowleri* siendo hasta el momento la droga de elección para el tratamiento de la MAP [49]. El mecanismo de acción de la AmB se basa en su interacción con los esteroides de membrana propiciando la lisis de las células blanco [51]; desafortunadamente esta droga puede presentar efectos adversos en el hospedero, principalmente a nivel de riñón. La AmB también ha sido utilizada como tratamiento en combinación con otros antibióticos como sulfadiazina, rifampicina, azitromicina y otros antifúngicos como ketoconazol, ordinazol y fluconazol, resultando en solo 15 casos de recuperación a nivel mundial de pacientes con MAP [29,52-65]. Cabe resaltar que no hay un fármaco específico contra *N. fowleri*. En la actualidad, también se desarrollan terapias no farmacológicas adicionales al uso de drogas, como disminuir la presión intracraneal mediante el drenaje de LCR, el uso de terapia hiperosmolar y la hipotermia controlada [65]. Por otro lado, el desarrollo de nuevas drogas como el Corifungin (análogo de la AmB) ha demostrado efecto amebicida y protector en el modelo experimental de la MAP sin presentar los efectos secundarios que presenta la AmB [66]. Como se mencionó anteriormente el tratamiento rápido y certero siempre deberá estar acompañado de una historia clínica completa del paciente para que su efectividad conlleve a la resolución rápida de esta infección mortal. Además, es necesario desarrollar nuevos fármacos con blancos más específicos contra este protozoario para tener un tratamiento eficaz para el ser humano.

Mecanismos de patogenicidad

Para que un microorganismo pueda invadir al organismo hospedero, debe desplegar una serie de mecanismos de daño sobre sus células y tejidos. Una vez que *N. fowleri* ha invadido al huésped es primordial que se adhiera al neuroepitelio olfatorio presente en la cavidad nasal. Las amibas

son capaces de adherirse mediante glicoconjugados presentes en la membrana, los cuales son ricos en residuos de manosa y fucosa [15]. También se ha estudiado una proteína de membrana tipo integrina de un peso de 60 kDa la cual presentó un efecto citotóxico sobre células de ovario de hámster chino (CHO) [14]. Una vez que la amiba ha logrado adherirse al neuroepitelio olfatorio, es capaz de producir daño sobre las células sustentaculares que lo conforman. Un fenómeno que también se ha reportado en *N. fowleri* es el proceso de fagocitosis mediante la formación de bocas fagocíticas (Figura 4) [67,68]; este proceso ha sido ampliamente estudiado tanto en fenómenos *in vitro* como *in vivo* [69-71]. Por otro lado, uno de los mecanismos independientes de contacto que también han sido reportados en *E. histolytica*, es la capacidad de secretar proteínas formadoras de poros, que en *N. fowleri* son llamados naeglerioporos, capaces de producir daño directo sobre las membranas de las células de neuroblastoma de rata, provocando su muerte por choque osmótico [72,73]. Así mismo, se han estudiado diversos productos de secreción como fosfolipasas que participan en la degradación de mielina y esfingomielina en el tejido nervioso [16]. Diversos reportes demuestran que *N. fowleri* posee la capacidad de secretar una gran cantidad de enzimas proteolíticas principalmente del tipo cisteína y en menor proporción de serina y metaloproteasas sugiriendo que estas proteasas pueden estar participando en la invasión y daño en los tejidos del hospedero [17,18]. En estudios más recientes, se demostró que *N. fowleri* es capaz de degradar a las proteínas Claudina-1 y ZO-1 las cuales forman parte de las uniones estrechas que participan en la formación de las uniones intercelulares. Los autores observaron que los trofozoítos de *N. fowleri* son capaces de degradar a estas proteínas a través de la acción de cisteín proteasas, resultado que se confirmó mediante el uso de inhibidores de proteasas como es el E-64; los autores concluyeron que la amiba es capaz de alterar a las uniones intercelulares abriéndose paso entre las células del neuroepitelio olfatorio [74].

Respuesta inmunológica

El proceso inflamatorio que presenta un organismo es un intento del mismo para enfrentar un estímulo dañino provocado por alguna sustancia extraña, células dañadas o por microorganismos patógenos [75]. En el caso de *N. fowleri*, su presencia en el SNC desencadena una intensa reacción inflamatoria relacionada con su capacidad de producir moléculas con actividad

citotóxica, resultando en el daño y necrosis del tejido nervioso propiciando la muerte del ser humano [13,17,74].

A finales de los años 60's, se comenzaban a utilizar modelos animales para comprender la enfermedad provocada por *N. fowleri*, debido a que los pacientes morían en un periodo de 7 a 10 días. Los trabajos de Carter en 1970, evaluaron la capacidad de producir daño por este patógeno infectando ratones de la cepa Swiss, en este trabajo se observó que la inflamación producida por las amibas participaba de manera importante en la mortalidad (90%) de los ratones a los 6 días posteriores a la inoculación intranasal [6]. Posteriormente en trabajos de Martínez y colaboradores (1971), se describió por primera vez y mediante histopatología las lesiones que se presentaban en las etapas tempranas y avanzadas de la infección; con estos estudios se pudo comparar el modelo murino de la MAP con las piezas post-mortem de humano [12,69].

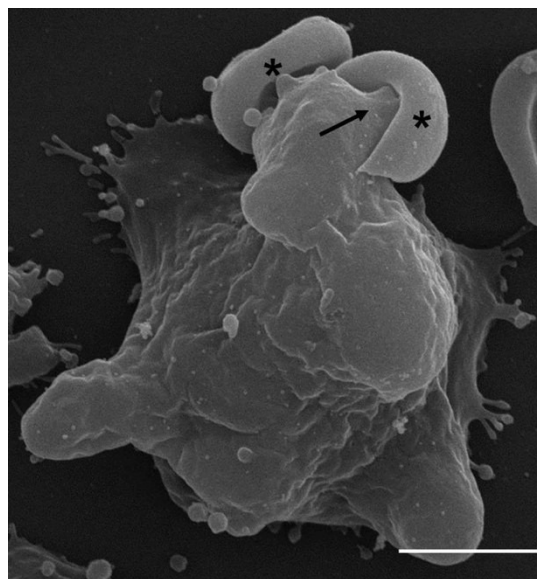


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de un trofozoíto de *N. fowleri* en interacción con eritrocitos humanos. Se muestra una boca fagocítica (flecha) fagocitando dos eritrocitos (asteriscos). Imágenes obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6510LV. Barra = 5 μ m.

Derivado de estos estudios, así como del aumento de los casos de MAP fueron el punto de partida para llamar la atención a la comunidad médica y científica de la importancia de estudiar a esta amiba de vida libre y tratar de comprender a nivel celular y molecular en estudios *in vitro* e *in vivo* la importancia del proceso inflamatorio, ya

que además del tratamiento con la droga antifúngica AmB es primordial no solo combatir la presencia de las amibas en el cerebro, sino también controlar la inflamación producida por este microorganismo administrando anti-inflamatorios como la dexametasona [65], lo cual repercute importantemente en salvar la vida del paciente. Por esto es de suma importancia desarrollar tratamientos más efectivos o blancos farmacológicos más específicos para tratar de impedir la evolución de la MAP y por lo tanto la muerte del paciente.

Estudios *in vitro*

Como se mencionó previamente, los modelos experimentales *in vitro* han sido ampliamente utilizados para tratar de comprender los mecanismos por los cuales *N. fowleri* desencadena un proceso inflamatorio en el SNC. En los trabajos clásicos de Julio Martínez y colaboradores, se observó que la amiba al tener contacto con las células sustentaculares que conforman al neuroepitelio olfatorio se producen cambios morfológicos así como un infiltrado inflamatorio conformado principalmente por neutrófilos; sugiriendo una posible activación de estas células al contacto con las amibas [12]. Para investigar con mayor profundidad sobre la respuesta inmunológica que se produce en el organismo en etapas tempranas de la invasión por *N. fowleri* donde se lleva a cabo el primer contacto con las células que componen al epitelio olfatorio, se han realizado diversos estudios sobre líneas celulares como es el caso de las células mucoepiteliales provenientes de células de cáncer de pulmón humano (NCI-H292) que son productoras de moco. En estos trabajos se evaluó la capacidad del moco para evitar la adhesión como una primera línea de defensa por parte de las células del hospedero (respuestas innatas); los autores demostraron que las amibas son capaces de evadir esta barrera formada por mucina de tipo MUC5AC mediante proteasas con actividad mucinolítica [76].

Posteriormente los mismos autores reportaron que además de la respuesta innata que conlleva a la producción de MUC5AC, los trofozoítos de *N. fowleri* también son capaces de inducir la producción de mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β e IL-8 en las células mucoepiteliales NCI-H292 a través de la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); esta producción de IL-8 explica la llegada de los

neutrófilos que se observan embebidos en el moco, previo a la invasión de las amibas en el neuroepitelio olfatorio y posteriormente a los bulbos olfatorios en el SNC [10,77].

En su migración hacia el SNC, este protozooario se encuentra directamente con las células inflamatorias compuestas por los neutrófilos y macrófagos. Existen estudios *in vitro* donde se utilizaron neutrófilos provenientes de humanos tratados con sobrenadantes de linfocitos incubados con la lectina fitohemaglutinina (PHA) para posteriormente ser interaccionados con trofozoítos de *N. fowleri* observándose la muerte de las amibas en comparación con los neutrófilos no tratados con los sobrenadantes. Con estos resultados los autores concluyeron que la capacidad citotóxica mostrada por los neutrófilos activados puede estar mediada por la producción de citocinas provenientes de los linfocitos. En años posteriores se demostró que se trataba del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), propiciando el efecto amebicida de los neutrófilos [78,79]. Años más tarde, los autores al ver que los neutrófilos poseían la capacidad de matar a las amibas al ser activados por los linfocitos, decidieron evaluar si el efecto amebicida estaba relacionado con la función de la mieloperoxidasa (MPO) presente en los neutrófilos, los autores encontraron que tanto la producción de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) más la producción del ion cloro (Cl⁻) potencian el efecto citotóxico sobre la amiba [80]. En años más recientes se describió un mecanismo que presentan los neutrófilos contra *N. fowleri*, mediante la producción de las llamadas trampas extracelulares de neutrófilos o por sus siglas en inglés NETs. En este estudio los autores observaron que los neutrófilos son capaces de producir estos NETs al entrar en contacto con amibas previamente opsonizadas con anticuerpos de la clase IgG de origen humano propiciando esta actividad citotóxica sobre las amibas [81]. Por otro lado, se realizaron estudios *in vitro* utilizando cultivos primarios así como líneas celulares de macrófagos provenientes de ratón para tratar de comprender este proceso. En estos estudios, se reportó que tanto los macrófagos de cultivo primario como los provenientes de la línea celular RAW264.7 los cuales fueron previamente activados con *Corynebacterium parvum*, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y lipopolisacárido (LPS) proveniente de *Escherichia coli*, se observó que poseían la capacidad de lisar a las amibas por un mecanismo dependiente de contacto, posteriormente se demostró que la molécula por la cual se produce la lisis de los trofozoítos de *N. fowleri* es el óxido nítrico (ON) [82-85].

Una vez que la amiba ha invadido el cerebro se enfrentará con la respuesta celular presente en este tejido, la cual está conformada por las células de la microglia [86]. Estos macrófagos residentes del SNC, se encargan tanto de mantener libre de patógenos en su estado activado, así como de producir moléculas anti-inflamatorias y factores neurotróficos en su estado inactivo que promueven el buen funcionamiento de los astrocitos y neuronas [87,88].

Para analizar el efecto de los trofozoítos de *N. fowleri* sobre las células de la microglia de rata diversos autores describieron mediante MET la formación de gran cantidad de proyecciones citoplasmáticas y de bocas fagocíticas en los trofozoítos de *Naegleria* al estar en contacto con las células de la microglia, culminando con su lisis de manera dependiente del tiempo [86,89,90]. Por otro lado, también se observó mediante ensayos de ELISA el aumento en la producción de las citocinas pro-inflamatorias, TNF- α , IL-1 β e IL-6 en los sobrenadantes de la interacción de la microglia con *N. fowleri*. Concluyendo que esta glía es capaz de activarse como respuesta a la invasión de las amibas al cerebro [86,91,92].

Otra de las células que integran a la glía presente en el SNC, y que están también en contacto directo con los trofozoítos de *N. fowleri* son los astrocitos. Estas células multifuncionales se encargan de la homeostasis cerebral, así como del mantenimiento óptimo de las neuronas [87]. Los astrocitos son capaces de producir ON y las citocinas pro-inflamatorias IL-8, IL-6 e IL-1 β , así como el de poder ser activados por las mismas citocinas cuando se presenta un estímulo, ya sea por la presencia de un organismo patógeno o por la microglia activada [93]. De igual manera se realizaron ensayos de interacción con cultivos primarios de astrocitos de rata con trofozoítos completos, extractos totales y con productos de secreción de *N. fowleri*, encontrándose mediante las técnicas de RT-PCR y ELISA que la amiba es capaz de activar a los astrocitos mediante la expresión y producción de IL-8, IL-6 e IL-1 β ; concluyendo que efectivamente los astrocitos juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria que se desarrolla en la evolución de la MAP [94,95]. Tomando en cuenta los estudios anteriores, el contacto de las amibas con las células de la glía, puede conllevar la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias, activando a células de la microglia cercanas al foco de la infección, así como a los astrocitos, sugiriendo la desestabilización de la BHE

permitiendo el paso libre de células del sistema inmunológico hacia las áreas afectadas por *N. fowleri* en los bulbos olfatorios en el SNC, aumentándose la reacción inflamatoria en este sitio, culminado con la muerte del paciente.

Estudios *in vivo*

Como se mencionó anteriormente para que se lleve a cabo la MAP, la amiba debe alcanzar la cavidad olfatoria del ser humano e interactuar con el moco que se encuentra presente sobre las células sustentaculares que componen al neuroepitelio olfatorio [10,11].

La respuesta inmunológica que se ha observado en la invasión de *N. fowleri* en modelos *in vivo* es de tipo innata; estas respuestas inespecíficas presentes en el organismo hospedero han sido ampliamente estudiadas en modelos murinos [10,13,67,83,92,96-98].

Se sabe que este protozoario es capaz de inducir la producción de moco en el modelo *in vivo* de la MAP experimental en la cepa de ratón BALB/c, observándose que las amibas quedan atrapadas en el moco para posteriormente interactuar con las células inflamatorias [10]. Desafortunadamente esta respuesta innata o inespecífica por parte del organismo es insuficiente y las amibas logran evadirla para continuar su migración a través del neuroepitelio olfatorio y alcanzar los bulbos olfatorios en el SNC [10,11,13].

Se ha observado que a las 96 horas PI, comienza el reclutamiento de células inflamatorias hacia las áreas de los bulbos olfatorios, observándose múltiples focos de reacción inflamatoria rodeando a las amibas, fenómeno que se mantiene hasta los 4 días PI. La inflamación se incrementa notablemente a los 5 días, es importante señalar que se observa una importante lisis de las células inflamatorias (principalmente neutrófilos) que conlleva a extensas áreas de necrosis con la producción *in situ* de citocinas pro-inflamatorias. Para corroborar que la respuesta inflamatoria participa de manera importante en el daño al cerebro, los autores utilizaron ratones C57BL/6J knockout a la molécula CD38^{-/-}, los cuales poseen deficiencias en la quimiotaxis de células inflamatorias, que al compararse con los ratones de la cepa parental (control), los animales deficientes a CD38 sobrevivieron más tiempo a la infección por *N. fowleri*; además observaron por histopatología que el proceso inflamatorio

disminuyó notablemente [13]. Tomando en cuenta todos estos resultados podemos concluir que *N. fowleri* es capaz de producir daño al tejido que invade, además de provocar una reacción inflamatoria intensa que participa importantemente en el daño al SNC y que en su conjunto conlleva a la muerte del hospedero.

Conclusiones

La infección producida por *N. fowleri* cobra cada vez más vidas humanas con el paso de los años, ya que desafortunadamente el diagnóstico de esta meningoencefalitis se lleva a cabo sin realizar una historia clínica completa y detallada del paciente, la falta de conocimiento de *N. fowleri* por la comunidad médica y del personal de laboratorio, además del diagnóstico tardío que se emite para comenzar un tratamiento adecuado y oportuno que se suma a la falta de un fármaco específico para el tratamiento de la MAP puede ser lo que decida la vida del paciente. Por otra

parte, el conocimiento en su conjunto de la interface hospedero-parásito nos permitirá conocer con mayor profundidad los mecanismos celulares y moleculares que despliega este patógeno para poder diseñar blancos más específicos para el desarrollo de nuevos fármacos con actividad anti-amibiana. El estudio de la respuesta inflamatoria que desarrolla el huésped también nos ayudará a comprender mejor la patogenia de la MAP la cual participa de manera importante en el desarrollo de esta enfermedad.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la M. en C. Angélica Silva Olivares por su ayuda en el procesamiento de las muestras para histopatología y microscopia electrónica de barrido. Este trabajo fue apoyado por el proyecto CONACyT número 237523.

Referencias

- Marciano-Cabral, F. (1988) *Microbiological reviews* **52**, 114-133.
- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994) *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 225-241.
- De Jonckheere, J. F. (2004) *Protist* **155**, 89-103.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., y Schuster, F. L. (2007) *FEMS immunology and medical microbiology* **50**, 1-26.
- Da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B., y Marciano-Cabral, F. (2009) *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* **2009**, 251406.
- Carter, R. F. (1970) *The Journal of pathology* **100**, 217-244.
- Laseke, I., Korte, J., Lamendella, R., Kaneshiro, E. S., Marciano-Cabral, F., y Oerther, D. B. (2010) *Journal of environmental quality* **39**, 147-153.
- Visvesvara, G. S. (2013) *Handbook of clinical neurology* **114**, 153-168.
- De Jonckheere, J. F. (2014) *Experimental parasitology* **145 Suppl.**, S2-9.
- Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L., y Campos-Rodríguez, R. (2004) *Parasitology research* **94**, 31-36.
- Jarolim, K. L., McCosh, J. K., Howard, M. J., y John, D. T. (2000) *The Journal of parasitology* **86**, 50-55.
- Martinez, J., Duma, R. J., Nelson, E. C., y Moretta, F. L. (1973) *Lab. Invest.* **29**, 121-133.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V., y Shibayama, M. (2008) *Parasitol. Int.* **57**, 307-313.
- Han, K. L., Lee, H. J., Shin, M. H., Shin, H. J., Im, K. I., y Park, S. J. (2004) *Parasitol. Res.* **94**, 53-60.
- Cervantes-Sandoval, I., Jesus Serrano-Luna, J., Pacheco-Yepez, J., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., y Shibayama, M. (2010) *Parasitology research* **106**, 695-701.
- Barbour, S. E., y Marciano-Cabral, F. (2001) *Biochimica et biophysica acta* **1530**, 123-133.
- Aldape, K., Huizinga, H., Bouvier, J., y McKerrow, J. (1994) *Experimental parasitology* **78**, 230-241.
- Serrano-Luna, J., Cervantes-Sandoval, I., Tsutsumi, V., y Shibayama, M. (2007) *The Journal of eukaryotic microbiology* **54**, 411-417.
- Duma, R. J. (1980) *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **91**, 65-72.
- Schuster, F. L., y Visvesvara, G. S. (2004) *International journal for parasitology* **34**, 1001-1027.
- Chang, S. L. (1979) *Folia parasitologica* **26**, 195-200.
- Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Castanon, G., Bonilla, P., Gonzalez-Lazaro, M., Hernandez-Martinez, D., Salazar-Villatoro, L., Esparza-Garcia, A., Martinez-Palomo, A., y Ortega-Pierres, G. (2009) *The Journal of eukaryotic microbiology* **56**, 66-72.
- Das, S. R. (1972) *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **66**, 663-664.
- Martinez, A. J., Nelson, E. C., y Duma, R. J. (1973) *The American journal of pathology* **73**, 545-548.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., y Ayadi, A. (2012) *Pathol. Biol. (Paris)*
- Martinez-Castillo, M., Cardenas-Zuniga, R., Coronado-Velazquez, D., Debnath, A., Serrano-Luna, J., y Shibayama, M. (2016) *Journal of medical microbiology*
- 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., Crager, R., Kozak, N. A., Sriram, R., Narayanan, J., Mull, B., Kahler, A. M., Schneeberger, C., da Silva, A. J., Poudel, M., Baumgarten, K. L., Xiao, L., y Beach, M. J. (2012) *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **55**, e79-85.
- Hannisch, W., y Hallagan, L. F. (1997) *Wilderness & environmental medicine* **8**, 211-213.
- Heggie, T. W., y Kupper, T. (2016) *Travel medicine and infectious disease*
- Fowler, M., y Carter, R. F. (1965) *Br. Med. J.* **2**, 740-742.
- Butt, C. G., Baro, C., y Knorr, R. W. (1968) *American journal of clinical pathology* **50**, 568-574.
- Yoder, J. S., Eddy, B. A., Visvesvara, G. S., Capewell, L., y Beach, M. J. (2010) *Epidemiol. Infect.* **138**, 968-975.
- Cerva, L., y Novak, K. (1968) *Science* **160**, 92.
- Valenzuela, G., Lopez-Corella, E., y De Jonckheere, J. F. (1984) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 558-559.

35. Lopez-Corella, E., De Leon, B., y de Jonckheere, J. F. (1989) *Boletín médico del Hospital Infantil de México* **46**, 619-622.
36. Lares-Villa, F., De Jonckheere, J. F., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C., y Visvesvara, G. S. (1993) *J. Clin. Microbiol.* **31**, 685-688.
37. Lares-Villa, F., y Hernandez-Peña, C. (2010) *Experimental parasitology* **126**, 33-36.
38. Behets, J., Seghi, F., Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A., y Ollevier, F. (2003) *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* **47**, 117-122.
39. Maclean, R. C., Richardson, D. J., LePardo, R., y Marciano-Cabral, F. (2004) *Parasitology research* **93**, 211-217.
40. Marciano-Cabral, F., MacLean, R., Mensah, A., y LaPat-Polasko, L. (2003) *Applied and environmental microbiology* **69**, 5864-5869.
41. Visvesvara, G. S., De Jonckheere, J. F., Marciano-Cabral, F., y Schuster, F. L. (2005) *The Journal of eukaryotic microbiology* **52**, 523-531.
42. Reveiller, F. L., Cabanes, P. A., y Marciano-Cabral, F. (2002) *Parasitology research* **88**, 443-450.
43. Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G. S., Sriram, R., y da Silva, A. J. (2006) *Journal of clinical microbiology* **44**, 3589-3595.
44. Pelandakis, M., y Permin, P. (2002) *Applied and environmental microbiology* **68**, 2061-2065.
45. Hara, T., y Fukuma, T. (2005) *Parasitology international* **54**, 219-221.
46. Robinson, B. S., Monis, P. T., y Dobson, P. J. (2006) *Applied and environmental microbiology* **72**, 5857-5863.
47. Kidney, D. D., y Kim, S. H. (1998) *AJR. American journal of roentgenology* **171**, 809-812.
48. Martinez, A. J., y Visvesvara, G. S. (1991) *Clinics in laboratory medicine* **11**, 861-872.
49. Carter, R. F. (1969) *Journal of clinical pathology* **22**, 470-474.
50. Rice, C. A., Colon, B. L., Alp, M., Goker, H., Boykin, D. W., y Kyle, D. E. (2015) *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**, 2037-2044.
51. Brajtburg, J., y Bolard, J. (1996) *Clinical microbiology reviews* **9**, 512-531.
52. Duma, R. J., Rosenblum, W. I., McGehee, R. F., Jones, M. M., y Nelson, E. C. (1971) *Annals of internal medicine* **74**, 923-931.
53. Anderson, K., y Jamieson, A. (1972) *Pathology* **4**, 273-278.
54. Apley, J., Clarke, S. K., Roome, A. P., Sandry, S. A., Saygi, G., Silk, B., y Warhurst, D. C. (1970) *British medical journal* **1**, 596-599.
55. Brown, R. L. (1991) *Archives of internal medicine* **151**, 1201-1202.
56. Pongvarin, N., y Jariya, P. (1991) *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* **74**, 112-115.
57. Loschiavo, F., Ventura-Spagnolo, T., Sessa, E., y Bramanti, P. (1993) *Acta neurologica* **15**, 333-340.
58. Wang, A., Kay, R., Poon, W. S., y Ng, H. K. (1993) *Clinical neurology and neurosurgery* **95**, 249-252.
59. Jain, R., Prabhakar, S., Modi, M., Bhatia, R., y Sehgal, R. (2002) *Neurology India* **50**, 470-472.
60. Vargas-Zepeda, J., Gomez-Alcala, A. V., Vasquez-Morales, J. A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J. F., y Lares-Villa, F. (2005) *Archives of medical research* **36**, 83-86.
61. Yadav, D., Aneja, S., Dutta, R., Maheshwari, A., y Seth, A. (2013) *Indian journal of pediatrics* **80**, 253-254.
62. Sood, A., Chauhan, S., Chandel, L., y Jaryal, S. C. (2014) *Indian journal of medical microbiology* **32**, 193-196.
63. Sharma, A., y Guleria, S. (2015) *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine* **19**, 126-127.
64. Linam, W. M., Ahmed, M., Cope, J. R., Chu, C., Visvesvara, G. S., da Silva, A. J., Qvarnstrom, Y., y Green, J. (2015) *Pediatrics* **135**, e744-748.
65. Cope, J. R., Conrad, D. A., Cohen, N., Cotilla, M., DaSilva, A., Jackson, J., y Visvesvara, G. S. (2016) *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **62**, 774-776.
66. Debnath, A., Tunac, J. B., Galindo-Gomez, S., Silva-Olivares, A., Shibayama, M., y McKerrow, J. H. (2012) *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 5450-5457.
67. Marciano-Cabral, F. M., y Fulford, D. E. (1986) *Applied and environmental microbiology* **51**, 1133-1137.
68. Kang, S. Y., Song, K. J., Jeong, S. R., Kim, J. H., Park, S., Kim, K., Kwon, M. H., y Shin, H. J. (2005) *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **12**, 873-876.
69. Martinez, A. J., Nelson, E. C., Jones, M. M., Duma, R. J., y Rosenblum, W. I. (1971) *Lab. Invest.* **25**, 465-475.
70. Kim, J. H., Kim, D., y Shin, H. J. (2008) *The Korean journal of parasitology* **46**, 217-221.
71. Marciano-Cabral, F., Zoghby, K. L., y Bradley, S. G. (1990) *The Journal of protozoology* **37**, 138-144.
72. Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., y Leippe, M. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**, 22353-22360.
73. Herbst, R., Marciano-Cabral, F., y Leippe, M. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**, 25955-25958.
74. Shibayama, M., Martinez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gomez, S., Navarro-Garcia, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi, V., y Serrano-Luna, J. (2013) *Microbiology* **159**, 392-401.
75. van der Meer, J. W., Vogels, M. T., Netea, M. G., y Kullberg, B. J. (1998) *Annals of the New York Academy of Sciences* **856**, 243-251.
76. Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V., y Shibayama, M. (2008) *Microbiology* **154**, 3895-3904.
77. Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna Jde, J., Meza-Cervantez, P., Arroyo, R., Tsutsumi, V., y Shibayama, M. (2009) *Microbiology* **155**, 3739-3747.
78. Ferrante, A., y Mocatta, T. J. (1984) *Clinical and experimental immunology* **56**, 559-566.
79. Ferrante, A. (1989) *Infection and immunity* **57**, 3110-3115.
80. Ferrante, A., Hill, N. L., Abell, T. J., y Pruul, H. (1987) *Infection and immunity* **55**, 1047-1050.
81. Contis-Montes de Oca, A., Carrasco-Yepeze, M., Campos-Rodriguez, R., Pacheco-Yepeze, J., Bonilla-Lemus, P., Perez-Lopez, J., y Rojas-Hernandez, S. (2016) *Parasite immunology* **38**, 481-495.
82. Fischer-Stenger, K., y Marciano-Cabral, F. (1992) *Infection and immunity* **60**, 5126-5131.
83. Clearly, S. F., y Marciano-Cabral, F. (1986) *Cellular immunology* **98**, 125-136.
84. Clearly, S. F., y Marciano-Cabral, F. (1986) *Cellular Immunology* **101**, 62-71.
85. Fischer-Stenger, K., Cabral, A., G., y Marciano-Cabral, F. (1990) *J. Protozool.* **37**(3), 168-173.
86. Oh, Y. H., Jeong, S. R., Kim, J. H., Song, K. J., Kim, K., Park, S., Sohn, S., y Shin, H. J. (2005) *Parasite immunology* **27**, 453-459.
87. Sochocka, M., Diniz, B. S., y Leszek, J. (2016) *Molecular neurobiology*
88. Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., y Marunouchi, T. (1993) *J Immunol* **151**, 2150-2158.
89. Fulford, D. E., Bradley, S. G., y Marciano-Cabral, F. (1985) *The Journal of protozoology* **32**, 176-180.

90. Marciano-Cabral, F. M., y Bradley, S. G. (1982) *Infection and immunity* **35**, 1139-1141.
91. Lee, J., Kang, J. M., Kim, T. I., Kim, J. H., Sohn, H. J., Na, B. K., y Shin, H. J. (2016) *The Journal of eukaryotic microbiology*
92. Lee, Y. J., Park, C. E., Kim, J. H., Sohn, H. J., Lee, J., Jung, S. Y., y Shin, H. J. (2011) *The Korean journal of parasitology* **49**, 285-290.
93. Efremova, L., Chovancova, P., Adam, M., Gutbier, S., Schildknecht, S., y Leist, M. (2016) *Arch Toxicol*
94. Kim, J. H., Song, A. R., Sohn, H. J., Lee, J., Yoo, J. K., Kwon, D., y Shin, H. J. (2013) *Parasite immunology* **35**, 120-128.
95. Kim, J. H., Sohn, H. J., Lee, S. H., Kwon, D., y Shin, H. J. (2012) *Parasitology research* **111**, 587-592.
96. Shibayama, M., Serrano-Luna Jde, J., Rojas-Hernandez, S., Campos-Rodriguez, R., y Tsutsumi, V. (2003) *Canadian journal of microbiology* **49**, 164-170.
97. Holbrook, T. W., Boackle, R. J., Parker, B. W., y Vesely, J. (1980) *Infection and immunity* **30**, 58-61.
98. Toney, D. M., y Marciano-Cabral, F. (1994) *The Journal of eukaryotic microbiology* **41**, 337-343.



DRA. MINEKO SHIBAYAMA

Estudió Químico Bacteriólogo y Parasitólogo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y obtuvo su licenciatura en el año 1985. Estudió la Maestría y Doctorado en Patología Experimental en el CINVESTAV-IPN en aspectos relacionados a la biología de *Entamoeba histolytica* y su relación hospedero-parásito. En el año 1998 se incorporó como investigador titular del Departamento de Patología Experimental ahora como Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN, Unidad Zacatenco. El principal interés en investigación en su laboratorio, ha estado relacionado con el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de *Entamoeba histolytica*,

enfocándose en el estudio de la respuesta inmune humoral y celular y en los cambios celulares que ocurren durante las interacciones huésped-parásito tanto a nivel intestinal como hepático, utilizando modelos animales susceptibles y resistentes. Otra de sus líneas de investigación es el estudio de las amibas de vida libre: *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* spp. En su laboratorio estableció modelos *in vivo* que permiten evaluar la patogenia de la queratitis amibiana (QA) y la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) producidas por estas amibas; también es de su interés conocer los aspectos celulares y moleculares que participan en estas infecciones producidas por protozoarios de interés médico. En enfermedades crónicas degenerativas como son la cirrosis y el cáncer hepático ha participado como colaboradora. La Dra. Shibayama ha publicado más de 100 artículos en revistas indizadas con factor de impacto las cuales han recibido más de 1200 citas; así como 24 capítulos en extenso en libros especializados y 7 artículos en revistas de divulgación científica. Durante su carrera como investigadora ha formado 9 Licenciados, 17 Maestros en Ciencias y 7 Doctores en Ciencias. Es miembro titular de la Academia Mexicana de Ciencias (AMC), de las sociedades Mexicanas de Parasitología y de Microscopía; Actualmente es investigadora CINVESTAV 3C y Nivel III en el Sistema Nacional de Investigadores.

ORIGINAL ARTICLE

An In Vitro Model of the Blood–Brain Barrier: *Naegleria fowleri* Affects the Tight Junction Proteins and Activates the Microvascular Endothelial CellsDaniel Coronado-Velázquez^a, Abigail Betanzos^a, Jesús Serrano-Luna^b & Mineko Shibayama^a 

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

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

Keywords

Adhesion molecules; cytokines; intercellular junctions; nitric oxide; primary amoebic meningoencephalitis; rat brain endothelial cells.

Correspondence

M. Shibayama, Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Av. IPN 2508, Mexico City 07360, Mexico
Telephone number: +52 (55) 5747-3398;
e-mail: mineko@cinvestav.mx

Received: 20 December 2017; revised 5 March 2018; accepted March 28, 2018.

doi:10.1111/jeu.12522

ABSTRACT

Naegleria fowleri causes a fatal disease known as primary amoebic meningoencephalitis. This condition is characterized by an acute inflammation that originates from the free passage of peripheral blood cells to the central nervous system through the alteration of the blood–brain barrier. In this work, we established models of the infection in rats and in a primary culture of endothelial cells from rat brains with the aim of evaluating the activation and the alterations of these cells by *N. fowleri*. We proved that the rat develops the infection similar to the mouse model. We also found that amoebic cysteine proteases produced by the trophozoites and the conditioned medium induced cytopathic effect in the endothelial cells. In addition, *N. fowleri* can decrease the transendothelial electrical resistance by triggering the destabilization of the tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 in a time-dependent manner. Furthermore, *N. fowleri* induced the expression of VCAM-1 and ICAM-1 and the production of IL-8, IL-1 β , TNF- α , and IL-6 as well as nitric oxide. We conclude that *N. fowleri* damaged the blood–brain barrier model by disrupting the intercellular junctions and induced the presence of inflammatory mediators by allowing the access of inflammatory cells to the olfactory bulbs.

NAEGLERIA fowleri is a free-living amoeba (FLA) and the only species of its genus that is pathogenic for humans (Rodríguez-Zaragoza 1994). This amoeba has been implicated in the deaths of humans who swim in waters contaminated with this microorganism, which causes primary amoebic meningoencephalitis (PAM) (Schuster and Visvesvara 2004). In experimental PAM, the amoebae reach the olfactory bulbs in the central nervous system (CNS) (Jarolim et al. 2000; Martínez et al. 1973; Rojas-Hernández et al. 2004), and these amoebae are observed near or inside the capillary vessels, which suggests the participation of the blood–brain barrier (BBB) (Cogo et al. 2004; Fowler and Carter 1965; Martínez et al. 1971). The protozoans could damage the BBB, which promotes the recruitment of the inflammatory cells to the brain parenchyma, as previously described in the mouse model and in human postmortem cases (Cervantes-Sandoval et al. 2008;

Hannisch and Hallagan 1997). In addition, a rat model has been used to reproduce the later stages of the PAM with the aim of establishing an *ex vivo* model using rat brain slices. The authors have employed this model to avoid the use of living animals and to permit better control of the experimental conditions (Gianinazzi et al. 2005). The disadvantages of this model are the loss of the physiological conditions that are present in a living animal and the absence of a functional BBB.

Moreover, until now, there have been no studies on the development of PAM from early until later stages of infection in the rat. The BBB refers to specific properties of the blood vessels in the CNS that regulate the passage of ions and molecules from the blood stream to the brain (Dane-man and Prat 2015). The primary role of the BBB is to create a restrictive barrier between the CNS and the rest of the body that blocks the entry of unwanted blood-borne

factors. The BBB microvessels are made up of endothelial cells that are linked by tight junctions (TJ), but neighbouring glial cells such as astrocytes and microglia are also critical to the BBB function (Price et al. 2016; Westergaard and Brightman 1973).

The TJ constitute a specialized membrane complex, mainly in mammals, that display unique properties of a barrier or a fence in the epithelium or endothelium (Shen et al. 2011; Torres-Flores and Arias 2015). The most studied proteins associated with the TJ are the claudins and occludin. These proteins contain four transmembrane domains with two extracellular loops that bind to other claudins and occludins in neighbouring cells (Furuse 2010; González-Mariscal et al. 2014; Kubota et al. 1999; McCarthy et al. 1996). The types of claudins present in the BBB include claudin-3, -5, and -12, of which claudin-5 is the protein that confers the barrier functions to the BBB (Daneman and Prat 2015; Díaz-Coránguez et al. 2013). The peripheral proteins ZO-1, -2, and -3 bind to the integral membrane proteins with the actin cytoskeleton. These interactions are important for the functionality and stability of the TJ complex (Fischer et al. 2002; Furuse et al. 1994; Shen et al. 2011).

Moreover, it is known that bacteria and some protozoans can cross the BBB through the TJ proteins. In one specific case, the bacterium *Neisseria meningitidis* can degrade the occludin protein in a primary culture of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC), promoting the alteration of the BBB (Schubert-Unkmeier et al. 2010). The only significant study on the interaction of endothelial cells with free-living amoebae was performed in *Acanthamoeba castellanii*. The authors showed the degradation of the TJ proteins (ZO-1 and occludin) through the Rho pathway (Khan and Siddiqui 2009). Another mechanism for the disruption of the BBB and the resulting increase in the cellular permeability is the induction of inflammatory mediators such as cytokines, adhesion molecules, and nitric oxide (NO) (Daneman and Prat 2015).

It is well-known that protozoans that can infect the CNS migrate by the paracellular route using ICAM-1 and VCAM-1 (Deckert-Schluter et al. 1994; Gillrie et al. 2007; Turner et al. 1994). The interaction of endothelial cells with pathogens can promote the production of cytokines, which disrupt the BBB by altering the TJ proteins and by inducing the expression of ICAM-1 and VCAM-1 (Benedetto et al. 2003). Furthermore, the production of NO through the activation of the endothelium by the pathogens can also damage the BBB (Kim et al. 2011; Lachenmaier et al. 2011). In this work, we established a rat model with the aim of evaluating the early and later stages of the infection produced by *N. fowleri* and to determine the effect of the interaction with a primary culture of rat brain microvascular endothelial cells (RBMEC) to simulate the BBB. We also investigated the destabilization of the TJ proteins and the activation of the endothelial cells by the amoebae, which resulted in the expression of proadhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and the production of inflammatory cytokines and NO.

MATERIALS AND METHODS

Amoebic cultures

A pathogenic strain of *N. fowleri* (ATCC 30808) was used in all the experiments. The trophozoites were cultured at 37 °C in 2% (w/v) Bactocasitone medium (BD Biosciences, San Jose, CA) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) (Microlab, México City, México). The amoebae were harvested in the logarithmic growth phase (48 h).

Experimental PAM in the rat model

Two-week-old Wistar male rats were used to produce PAM. The rats were lightly anesthetized in an ether chamber and instilled with 5×10^5 trophozoites in 20 μ l of medium without FBS. The control animals were instilled with 20 μ l of free-serum 2% Bactocasitone. The animals were killed at various postinoculation (PI) times (3, 12, 24, 48, and 72 h and 7 days). After removal of the skin, the heads were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS pH 7.2 for 24 h. The samples were then washed with tap water and decalcified with a mixture of sodium citrate (JT Baker, Phillipsburg, NJ) and formic acid (JT Baker), which was changed every 24 h until 72 h. The samples were washed for 8 h, processed for embedding in paraffin, and stained with haematoxylin & eosin (H&E). All the animals were handled in accordance with Mexican federal regulations for animal experimentation and care (NOM-062-ZOO-1999), and the study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC-Cinvestav). Rats were killed by an overdose of sodium pentobarbital (Pet's Pharma de México S.A. de C.V., Nezahuacoyotl, México) and handled according to the guidelines of the 2000 AVMA Panel on Euthanasia.

Brain microvascular endothelial cells and astrocyte primary cultures

The primary cultures of rat brain microvascular endothelial cells (RBMEC) were established from 2-wk-old male Wistar rats as previously described by Molino and co-workers (Molino et al. 2014). The brains were obtained, and the meninges were removed. The brain cortices were dissociated in a glass dounce homogenizer with 10 ml of ice-cold Dulbecco's Modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12, Gibco, Boston, MA), the resulting suspension was transferred to a 50-ml tube and centrifuged at 1,000 *g* for 5 min. The pellet was obtained, and the supernatant was discarded. The pellet was re-suspended in 20 ml of 30% percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in DMEM/F12. The myelin and other neuronal components were separated by density gradient centrifugation at 3,600 *g* for 30 min to obtain the brain capillaries. The capillaries were digested in an enzymatic mix containing collagenase/dispase (60 μ g/ml) (Merck-Millipore, Burlington, MA), desoxyribonuclease 1 (DNase type 1) (35 μ g/ml) (Sigma-Aldrich), and penicillin/streptomycin (10,000 U/10,000 μ g/ml)

(Gibco) in a shaker for 45 min at 37 °C, washed twice in DMEM/F12, and then plated on a 25 cm² culture flask precoated with a mix of collagen type IV (Sigma-Aldrich) and fibronectin (Sigma-Aldrich), each protein at 1 µg/cm². The RBMEC cultures were maintained in DMEM/F12 supplemented with 20% plasma-derived serum (PDS, Animal Technologies Inc., MD), GlutaMAX (2 mM) (Gibco), basic fibroblast growth factor (10 ng/ml) (bFGF) (PreproTech, NJ, USA), heparin (100 µg/ml) (PiSA Farmacéutica, Jalisco, México), HEPES (2.5 mM) (Sigma-Aldrich), penicillin/streptomycin (10,000 U/10,000 µg/ml) (Gibco), and fungizone (2.5 µg/ml) (Gibco), and finally puromycin was added (4 µg/ml) (Sigma-Aldrich) for the first 24 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ to eliminate the nonendothelial cells. On the third day, the medium was changed to fresh medium containing all of the previously mentioned components except puromycin. The astrocytes were obtained from the brains of 2-wk-old Wistar male rats. Briefly, the meninges were removed, and the tissue was dissociated in a glass dounce homogenizer with 15 ml of 0.05% trypsin/0.02% EDTA (Gibco; J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) for 15 min at 37 °C. To stop the enzymatic digestion, we added DMEM/F12 supplemented with 10% FBS (Microlab), GlutaMAX (2 mM) (Gibco) and penicillin/streptomycin (10,000 U/10,000 µg/ml) (Gibco), and the mixture was centrifuged at 300 g for 5 min. The pellet was resuspended in 10 ml of DMEM/F12 with 10% FBS (Microlab) and penicillin/streptomycin (10,000 U/10,000 µg/ml) (Gibco) and cultured in a 75 cm² culture flask (Corning Inc., New York, NY). The medium was replaced after 24 h to remove the cell debris: this procedure was repeated after 3 days of culture. After 1 wk of cellular proliferation, the mix of glial cells was shaken for 24 h at 37 °C in medium containing FBS. Thereafter, the cells were washed twice with sterile PBS pH 7.23. The culture medium for the RBMEC cells was supplemented with the supernatant of the culture medium from the astrocytes to enhance the growth of the primary culture.

Cytopathic effect assays with *Naegleria fowleri* trophozoites and their conditioned medium over RBMEC cultures

To examine the interactions of *N. fowleri* with the RBMEC cultures, we used 90% confluent monolayers of RBMEC. Trophozoites were obtained by chilling the culture flask in an ice bath for 30 min and centrifuging at 828 g for 5 min. The trophozoites were adjusted to a 3:1 ratio (1 × 10⁶ RBMEC: 3 × 10⁵ trophozoites) in 1 ml of PDS-free DMEM/F12 and added to the monolayers of RBMEC. Co-cultures with *N. fowleri* were incubated at 37 °C for 1, 3, 6, or 10 h. The conditioned medium (CM) was obtained from 5 × 10⁶ trophozoites incubated in 3 ml of fresh Bactocasitone medium without FBS during 24 h. Thereafter, CM was collected in sterile conditions and centrifuged at 828 g for 5 min to separate the pellet. The cell viability was determined by trypan blue exclusion assay (99% viability, data not shown). The supernatants containing the CM were passed through a 0.22 µm pore filter

(Merck-Millipore) to eliminate cell debris. The procedure was performed at 4 °C to avoid protein degradation and stored at –20 °C until use (Betanzos et al. 2014; Serrano-Luna et al. 2007). The CM was adjusted to 5 × 10⁴ trophozoites that correspond to 3:1 ratio and mixed with DMEM/F12 without PDS and co-incubated with RBMEC at 37 °C for 1, 3, 6, and 10 h. Control RBMEC cultures were co-incubated without trophozoites and with fixed amoebae (control). The cytopathic effect was evaluated by staining the monolayer with methylene blue, and the recovered dye was quantified by spectrophotometry (660 nm). The absorbance data were plotted with the GraphPad Prism software (La Jolla, CA). The data represent the means ± SD of at least three independent experiments. The *p* values were calculated using two-way ANOVA.

Endothelial cell damage due to *Naegleria fowleri* proteases

To analyse the effect of *N. fowleri* proteases, trophozoites and CM were incubated with 10 µM of the cysteine protease inhibitor *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) or the serine protease inhibitor Aprotinin (6 µM) (Roche, Basel, Switzerland) for 45 min at room temperature. The samples (trophozoites and CM) previously incubated with the inhibitors were coincubated with the RBMEC monolayers at a 3:1 ratio for 10 h. As controls, the RBMEC monolayers were incubated with trophozoites, CM or without amoebae in the absence of the inhibitors for 10 h. After the incubations, the monolayers were fixed with 2% paraformaldehyde and observed under a light microscope (Nikon TMS, Nikon, Japan) (data not shown). Briefly, the fixed monolayers were washed with PBS pH 7.23 and the cytopathic effect was quantified by staining the RBMEC with 1% methylene blue (Sigma-Aldrich) during 10 min, the dye captured by the monolayer was extracted with 0.1 N HCl, and the recovered dye was quantified by spectrophotometry (660 nm) (Ocadiz et al. 2005; Pais-Morales et al. 2016). The absorbance data were plotted with the GraphPad Prism software. The data represent the means ± SD of at least three independent experiments. The *p* values were calculated using two-way ANOVA.

Transendothelial electrical resistance (TEER) in RBMEC cultures

For these experiments, the RBMEC cells were seeded on Millicell inserts with 8 µm pore filters (Merck-Millipore) and plated into 12-well culture plates (Corning-Costar, Corning, NY). The TEER values of the cultures were measured using an epithelial volt/ohm metre (EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, FL). When the RBMEC resistance values were stable (approximately 260 Ω/cm²), the cells were co-incubated with *N. fowleri* trophozoites at a ratio of 3:1. The CM was obtained as described for the cytopathic effect assays. To evaluate the participation of proteases in the decreases in the TEER, we co-incubated the RBMEC with live trophozoites or CM that had

previously been incubated with 10 mM of the cysteine proteases inhibitor E-64 (Roche). As controls, we measured the TEER in monolayers incubated without amoebae, fixed amoebae, 25 mM NaOH (JT Baker), and with 10 mM E-64. The TEER values were measured at 0, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 90, 95, 120, 125, 150, 155, 180, 360, and 600 min. The resistance data were obtained from three independent experiments and analysed with the GraphPad Prism Software. The data represent the means \pm SD of at least three independent experiments. The *p* values were calculated using two-way ANOVA.

Localization of TJ proteins in RBMEC in the presence of *Naegleria fowleri*

The primary cultures of RBMEC were grown on coverslips covered with a mix of collagen type IV and fibronectin and co-incubated with *N. fowleri* at a 3:1 ratio for 5, 15, 30, or 60 min. After these incubation times, the RBMEC were fixed with 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS for 20 min at room temperature, and permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) at room temperature. The coverslips were blocked with 1% albumin (Equitech-Bio, Inc., Kerrville, TX) for 1 h at 37 °C, washed three times with PBS and incubated for 2 h with the following primary antibodies: polyclonal rabbit antioccludin-5 (1:25) (Invitrogen, Carlsbad, CA), polyclonal rabbit anti-ZO-1 (1:25) (Invitrogen), polyclonal mouse antioccludin (1:25), or polyclonal mouse antibody against *N. fowleri* (1:25) at 37 °C. The samples were washed three times and incubated with the following secondary antibodies: FITC-goat-antirabbit (1:50) (Invitrogen), FITC-goat-antimouse (Invitrogen) or CY5-goat-antimouse (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) at 37 °C for 1 h. Finally, the nuclei were stained with propidium iodide 0.001% (Sigma-Aldrich). The actin cytoskeleton was stained with rhodamine phalloidin (1:150) (Sigma-Aldrich), and the cell nuclei were stained with DAPI (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich). Finally, the coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and images were obtained using a LEICA confocal microscope TCS SP8 (Leica Microsystems, Glatbrugg, Switzerland).

Analysis of the degradation of the tight junction proteins by *Naegleria fowleri* trophozoites by western blotting

To evaluate the degradation of the TJ proteins in RBMEC that interacted with *N. fowleri* (3:1), we performed western blot assays. Briefly, the amoebae were detached from the monolayers with cold PBS, and the cell extracts were obtained using lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100 and Trizma 50 mM pH 8.4) (Sigma-Aldrich) with a protease inhibitor cocktail. Cysteine proteases were inhibited with 10 mM *p*-hydroximercuribenzoic acid (PHMB), 5 mM *N*-ethylmaleimide (NEM) (Sigma-Aldrich), and 10 μ M *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) (Roche). Serine proteases were inhibited with 5 mM phenyl-methylsulphonyl fluoride (PMSF) and 6 μ M Aprotinin

(Sigma-Aldrich). Metalloproteases were inhibited with 2 mM ethylenediamine-tetracetic acid (EDTA) (JT Baker). The protein extracts of RBMEC (5×10^6) were co-incubated with or without amoebae and were quantified by the Bradford method (Bradford 1976); the total protein concentration was adjusted at 40 μ g for each experimental condition. The samples were resolved using 7.5%, 10%, 12%, or 15% SDS-PAGE according the evaluated protein at 4 °C at 100 V for 3 h; the proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck-Millipore) at 4 °C for 90 min at 400 mA. The membranes were blocked overnight at 4 °C with 10% skim milk in PBS. For detection of the TJ proteins, the membranes were incubated with a polyclonal mouse antioccludin (1:500), polyclonal rabbit antioccludin-5 (1:500), polyclonal rabbit anti-ZO-1 (1:500), or polyclonal mouse antiactin (1:500) (Invitrogen) for 2 h at 37 °C. The secondary antibodies were peroxidase-conjugated goat anti-mouse-IgG, 1:1,000 for actin and occludin and peroxidase-conjugated goat antirabbit-IgG, 1:1,000 for claudin-5 and ZO-1 (Invitrogen). The membranes were washed six times with 0.05% PBS-Tween 20, and the signal was detected using a luminol kit reagent (Santa Cruz Biotechnology). The densitometric analysis was performed using the ImageJ program (<https://imagej.nih.gov/nih-image/>), and the results were expressed as relative optical density (ROD) and plotted with GraphPad Prism software. The data represent the means \pm SD of at least three independent experiments. The *p* values were calculated using two-way ANOVA.

Expression of VCAM-1 and ICAM-1 by RBMEC in the presence of *Naegleria fowleri*

RBMEC were grown on coverslips and co-incubated with the amoebae at a ratio of 3:1. As controls, RBMEC monolayers were incubated without amoebae (negative control) and with 20 μ g/ml of lipopolysaccharide (LPS) (positive control) (Sigma-Aldrich). The samples were incubated for 5, 15, 30, 60, or 180 min. After these incubation times, the RBMEC were fixed with paraformaldehyde 2% (Sigma-Aldrich) in PBS for 20 min at room temperature. The samples were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS. The coverslips were blocked with 1% albumin (Equitech-Bio, Inc.) for 1 h at 37 °C, washed three times and incubated 2 h with a polyclonal rabbit anti-VCAM-1 (1:50) (Invitrogen), polyclonal rabbit anti-ICAM-1 (1:50) (Invitrogen) and finally with a polyclonal mouse against *N. fowleri* (1:25) at 37 °C. The coverslips were washed three times and incubated with a secondary antibody FITC-goat-antirabbit (1:100) (Invitrogen) and CY5-goat-antimouse (1:50) (Santa Cruz Biotechnology) at 37 °C for 1 h. The nuclei were stained with 0.001% propidium iodide (Sigma-Aldrich). Finally, the coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories), and images were obtained using a LEICA confocal microscope TCS SP8 (Leica Microsystems). The fluorescence was quantified and reported as the corrected total cell fluorescence (CTCF). Briefly, an outline was drawn around each cell;

the area and mean fluorescence was measured with ImageJ software. The corrected total cell fluorescence (CTCF) was calculated using the following formula: $CTCF = \text{Integrated density} - (\text{area of selected cell} \times \text{mean fluorescence of background readings})$ (McCloy et al. 2014). The quantification was obtained using the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/nih-image>) and plotted with the GraphPad Prism software. The data represent the means \pm SD of at least three independent experiments. The *p* values were calculated using two-way ANOVA.

Naegleria fowleri induces cytokine production by the RBMEC

The cytokine production that was induced by the interaction of RBMEC with *N. fowleri* was assessed. The supernatants were recovered following the interaction of the cells with the trophozoites at the previously defined ratio after 30 min and 1, 3, 6, 12, and 24 h. As controls, we used the supernatants of RBMEC co-incubated with LPS (20 $\mu\text{g/ml}$) and without the amoebae. The production of cytokines was quantified using a cytometric bead array (CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, BD Biosciences). The set of capture-beads from the kit includes six cytokines: human IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70, IL-6, and IL-10. The samples were analysed in a BD FACSCelesta™ flow cytometer (BD Biosciences), and the data were processed in the Kaluza™ Software (Beckman-Coulter, Life Sciences, Indianapolis, IN). The data were plotted with GraphPad Prism software. The bars indicate the means \pm SD of three independent assays and *p* values were calculated using two-way ANOVA.

Naegleria fowleri induces nitric oxide production in RBMEC

The nitric oxide (NO) production was quantified following the interaction of the RBMEC with *N. fowleri* at the same ratio previously described. The supernatants were recovered after 15 and 30 min and 1, 3, 6, 12, and 24 h. As controls, we used supernatants from RBMEC without amoebae and incubated with LPS at 20 $\mu\text{g/ml}$. The quantification of NO was measured as nitrites using the Nitric Oxide Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK). The absorbance data were obtained with a spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT) at 540 nm. The data were plotted using the GraphPad Prism software. The bars indicate the means \pm SD of three independent assays and the *p* values were calculated using two-way ANOVA.

RESULTS

Primary amoebic meningoencephalitis in the rat model

Representative samples were processed using conventional paraffin technique and stained with H&E. In the control group of rats, our results showed a normal columnar pseudostratified epithelium, the lamina propria, which

consists of fibroblast and basal cells, was observed below the epithelium as well as a normal morphology of the nervous plexus at the submucosa (Fig. 1A). In the lamina propria, the Bowman glands could be observed and below of this structure the turbinate bones were seen next to the nervous plexus (Fig. 1A).

The rats in the infected group were instilled with 5×10^5 trophozoites and killed at 3 h PI; areas with ulceration were observed in the epithelial cells and at the same time there was cellular detachment of the sustentacular cells. The amoebae completely displaced the cells from the neuroepithelium (Fig. 1B). The morphology of the lamina propria was changed: hyperplasia of the Bowman glands and the presence of an inflammatory infiltrate were observed (Fig. 1B).

At 12 h PI, *N. fowleri* trophozoites were seen in the olfactory bulbs surrounded by inflammatory reaction (Fig. 1C). At 24 h PI, the presence of the amoebae was more evident and the damage to the brain tissue was present (Fig. 1D). At 48 h PI, the inflammatory cells increased in number, and the trophozoites were observed close to the inflammatory focus (Fig. 1E). The cell types were mainly macrophages and some neutrophils. In some areas, amoebae were seen near to the blood vessels (Fig. 1E).

At 72 h PI, several amoebae were observed in the olfactory bulbs, and necrotic areas were evident at this time (Fig. 1F). Macrophages and polymorphonuclear cells were observed surrounding the amoebae (Fig. 1F). At 72 h PI, erythrocytes, inflammatory cells and trophozoites were observed in the subarachnoid space (Fig. 1G). This space is located between the meningeal arachnoid and the skull (Fig. 1G). At 7 days PI, the inflammatory reaction increased notably, and haemorrhage, abundant trophozoites, and important areas of lytic necrosis were observed in the olfactory bulbs (Fig. 1H). These results allow us to recommend the use of the rat to produce PAM similar to that described in the mouse model and in the human cases.

Cytopathic effect on RBMEC produced by Naegleria fowleri

To determine the damage to the RBMEC, we performed experiments to evaluate the cytopathic effect using methylene blue stain, which was quantified spectrophotometrically. Our results showed that the *N. fowleri* trophozoites began to induce damage in the endothelial monolayer from 1 to 10 h of co-incubation in a time-dependent manner (Fig. 2A).

In addition, we also evaluated the effect of the CM from *N. fowleri* on the RBMEC. The monolayers were co-incubated with the CM for 1 to 10 h. The results showed that the damage to the RBMEC began within 1 h of co-incubation. This effect was statistically stronger than the cytopathic effect produced by the live trophozoites; $*p < 0.05$. After 3, 6, and 10 h the cell damage was increased (Fig. 2A). As controls, we used RBMEC without amoebae and those co-incubated with fixed trophozoites (Fig. 2A).

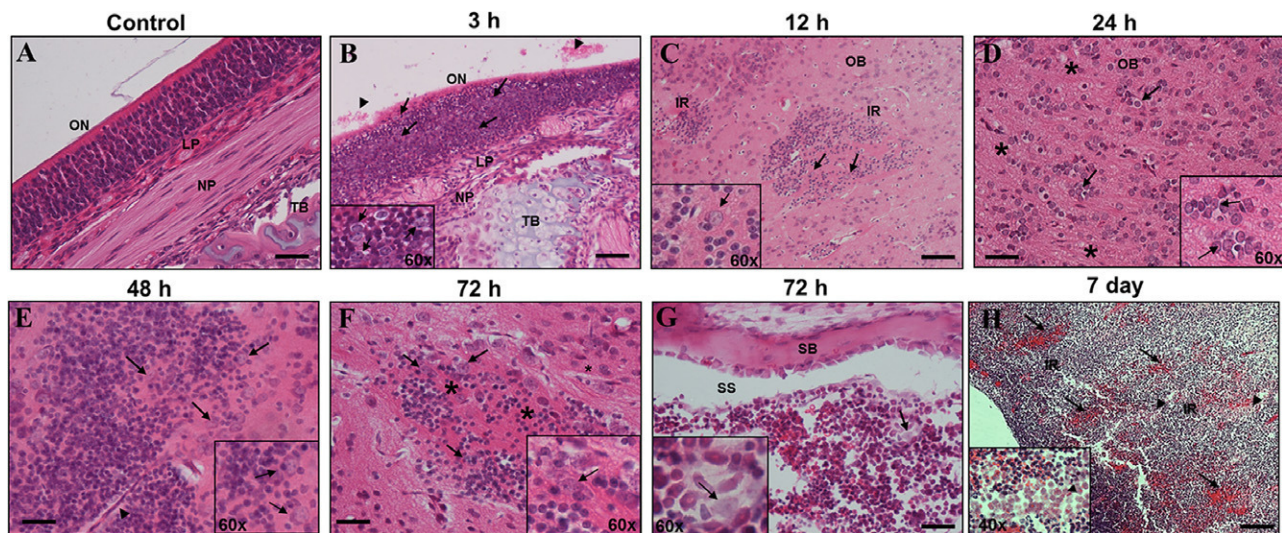


Figure 1 Primary amoebic meningoencephalitis (PAM) in the rat. Representative samples of rat olfactory bulbs were stained with H&E. **(A)** Control without amoebae, the olfactory neuroepithelium showed a normal and continuous layer of sustentacular cells (ON); we observed the integrity of the lamina propria (LP), nervous plexus (NP) and turbinate bones (TB). **(B)** At 3 h of instillation (PI) we observed a numerous amoebae (arrows), observing damage in the cells (arrowhead). **(C)** At 12 h PI, the trophozoites (arrows) were observed surrounded by an important inflammatory reaction (IR) in the olfactory bulbs (OB). **(D)** At 24 h, amoebae (arrows) and small areas of necrosis were seen in the OB (asterisks). **(E)** At 48 h the inflammatory cells increased and the trophozoites (arrows) were observed near to the capillary vessels (arrowhead). **(F, G)** At 72 h, the necrotic areas (asterisks) and the inflammation increased importantly (arrows). The subarachnoid space (SS) was observed below the skull bone (SB); an important number of inflammatory cells, erythrocytes and trophozoites were observed (arrow). **(H)** After 7 days PI, the OB exhibited an important inflammation (IR) with haemorrhagic areas (arrows), the number of trophozoites were increased substantially (arrowheads) and the lytic areas were evident. Bar = 50 μ m.

The results showed that the monolayers maintained their integrity in both of these control conditions over the time. With these results, we can conclude that live trophozoites and their CM can produce damage to the endothelial cells; (**p* < 0.05).

Cysteine proteases from *Naegleria fowleri* causes damage of RBMEC and decreases the TEER values

To evaluate the role of cysteine proteases from *N. fowleri* in the damage to the RBMEC cells, live trophozoites and their CM were incubated with the monolayers for the maximal time assayed. Both live trophozoites (Fig. 2B) and the CM (Fig. 2C) produced considerable damage to the cells at 10 h of co-incubation. To determine the type of proteases that could be participating in the damage of the RBMEC, we used the inhibitors E-64 and Aprotinin. The results showed that the cysteine protease inhibitor E-64 protected the monolayers that were incubated with the trophozoites and with the CM (Fig. 2B,C). However, the serine protease inhibitor Aprotinin did not prevent the cellular damage (Fig. 2B,C). These results confirmed that the *N. fowleri*-induced damage to the RBMEC is mainly caused by cysteine proteases; (**p* < 0.05).

To analyse the functionality of the intercellular junctions of the RBMEC that were co-incubated with *N. fowleri* trophozoites, we performed TEER measurements over the period of 0 to 600 min (Fig. 2D). As controls, RBMEC without amoebae were used. The control monolayers showed consistent TEER values of 260 Ω /cm² at all of the

incubation times; the same values were observed for the control RBMEC co-incubated with fixed amoebae. The positive control of RBMEC incubated with 25 mM of NaOH showed a decrease of 23% in the TEER at 5 min and a decrease of 99% after 40 min of incubation.

The control of RBMEC co-incubated with 10 mM of E-64 showed consistent TEER value of 260 Ω /cm² at all of the incubation times. The results for the cultures co-incubated with *N. fowleri* showed a decrease of 4% after 5 min compared with the control (without amoebae) and a decrease of 92% at 600 min. The CM produced a decrease of 13% at 5 min compared with the control and a decrease of 98% at 600 min. Pre-incubation of both live trophozoites and CM with E-64 prior to the cell exposures resulted in no decrease of TEER at all incubation times. These results showed that *N. fowleri* trophozoites and their CM were able to decrease the TEER through the effect of cysteine proteases; (**p* < 0.05).

Localization of TJ proteins in RBMEC co-incubated with *Naegleria fowleri*

We evaluated the localization of the TJ proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of RBMEC co-incubated with *N. fowleri* trophozoites using confocal microscopy. The cells without trophozoites showed that claudin-5 and ZO-1 had a membrane and nuclear distribution. However, the label of occludin was mainly in the membrane. The XZ stack confirmed the distribution of these proteins (Fig. 3A,F,K).

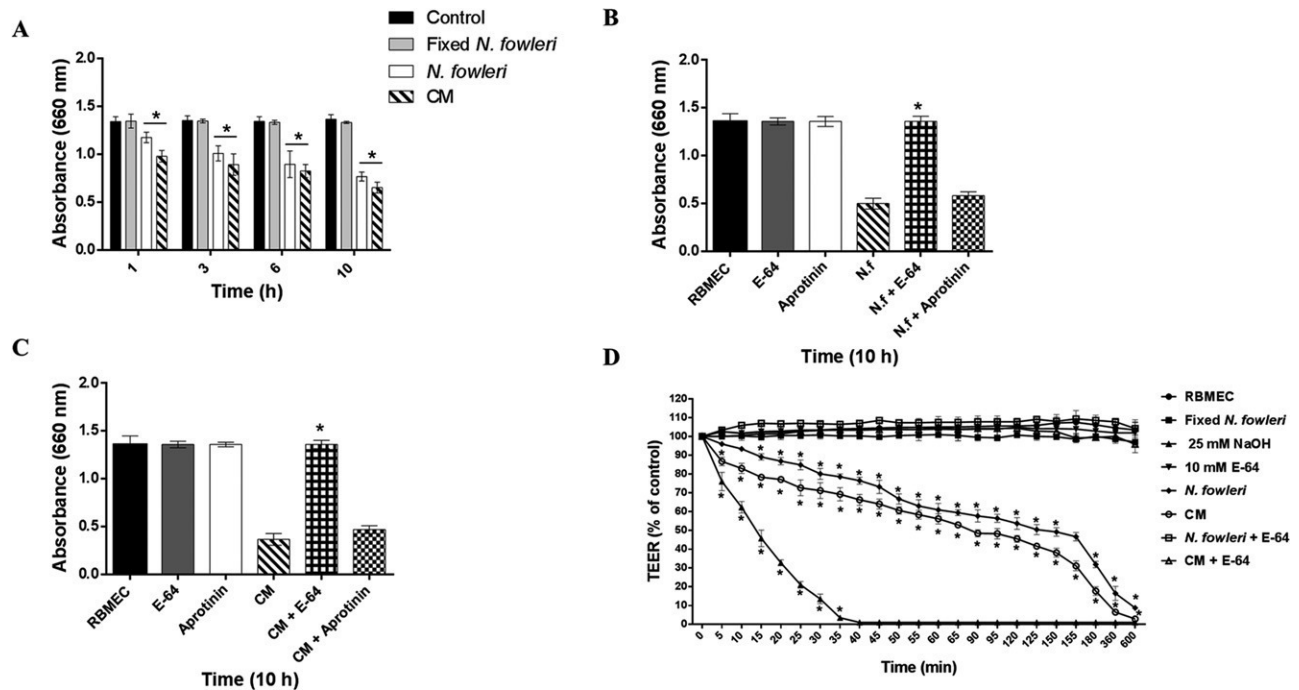


Figure 2 *Naegleria fowleri* produces damage on RBMEC. **(A)** Cytopathic effect on RBMEC produced by *N. fowleri*. RBMEC without amoebae (control; black bars), fixed amoebae (gray bars), live *N. fowleri* trophozoites (white bars), and CM (strip bars). **(B)** Role of proteases of live trophozoites in the damage of RBMEC. RBMEC without amoebae (black bar), RBMEC incubated with E-64 (gray bar), RBMEC incubated with Aprotinin (white bar), RBMEC co-incubated with *N. fowleri* (strip bar), *N. fowleri* preincubated with E-64 (square bar) and *N. fowleri* preincubated with Aprotinin (dot bar). **(C)** *N. fowleri* CM induced the damage of RBMEC. RBMEC without CM (black bar), RBMEC incubated with E-64 (gray bar), RBMEC incubated with Aprotinin (white bar), RBMEC co-incubated with CM (strip bar), CM pretreated with E-64 (square bar), and CM pretreated with Aprotinin (dot bar). **(D)** TEER of RBMEC modified by *N. fowleri*. Monolayer of RBMEC without amoebae (●), showed a constant TEER values (260 Ω/cm²) until 600 min. Fixed *N. fowleri* trophozoites (■) were co-incubated with the RBMEC, did not show a TEER decrease in all the assayed times. RBMEC incubated with NaOH (25 mM) (▲), showed the decrease in TEER since 5 min and reached a 99% at 40 min that continued to the 600 min. The RBMEC co-incubated with E-64 (10 mM) (▼), did not show decrease of TEER in all the incubation times. The monolayers co-incubated with *N. fowleri* trophozoites (◆) and CM (○), showed the decrease of TEER from 5 to 600 min. The endothelial cells co-incubated with trophozoites (□) and CM (△) pre-incubated with E-64, did not show decrease of TEER in all the assayed times. The percentage of TEER was compared with RBMEC control values (260 Ω/cm²). The data represent the means ± SD of three independent experiments. The *p* values were calculated using two-way ANOVA test (**p* < 0.05).

The amoebae co-incubated with the cells were seen close to the intercellular junctions (Fig. 3D,I,N). Moreover, we observed the delocalization of claudin-5 (Fig. 3B–E), occludin (Fig. 3G–J) and ZO-1 (Fig. 3L–O) from 5 to 30 min of interaction; the label presented a diffuse dotted pattern in the cytoplasm and in the nucleus. The TJ pattern decreased importantly at 60 min of co-incubation. The XZ stack confirmed the distribution of each TJ protein in all the times assayed.

It is known that the TJ proteins can interact with the actin cytoskeleton. Therefore, we evaluated F-actin distribution in the RBMEC co-incubated with *N. fowleri* trophozoites. After 5 min of co-incubation, actin stress fibres were observed in the cells (Fig. 3Q). The disorganization of actin as well as separation between the cells was evident from 15 to 60 min (Fig. 3R–T). In the control (without amoebae), the actin cytoskeleton showed a normal pattern and organization that was confirmed in the XZ stack (Fig. 3P). We conclude that *N. fowleri* is able to disrupt

and delocalized the TJ proteins and also alter actin cytoskeleton of the RBMEC primary culture.

Degradation of TJ proteins of RBMEC co-incubated with *Naegleria fowleri*

To evaluate the RBMEC TJ degradation induced by *N. fowleri*, we performed western blot assays. The controls showed that claudin-5 was present as a band with a molecular weight of 25 kDa, which was unchanged between 5 and 60 min of incubation (Fig. 4A).

In the RBMEC co-incubated with trophozoites, the 25 kDa band decreased in a time-dependent manner (Fig. 4A). In addition, the blot for ZO-1 in the control cultures of RBMEC showed a band with a molecular weight of 220 kDa that was maintained through all times assayed. The RBMEC co-incubated with *N. fowleri* showed that the degradation of ZO-1 occurred in a time-dependent manner (15 min to 1 h) (Fig. 4B).

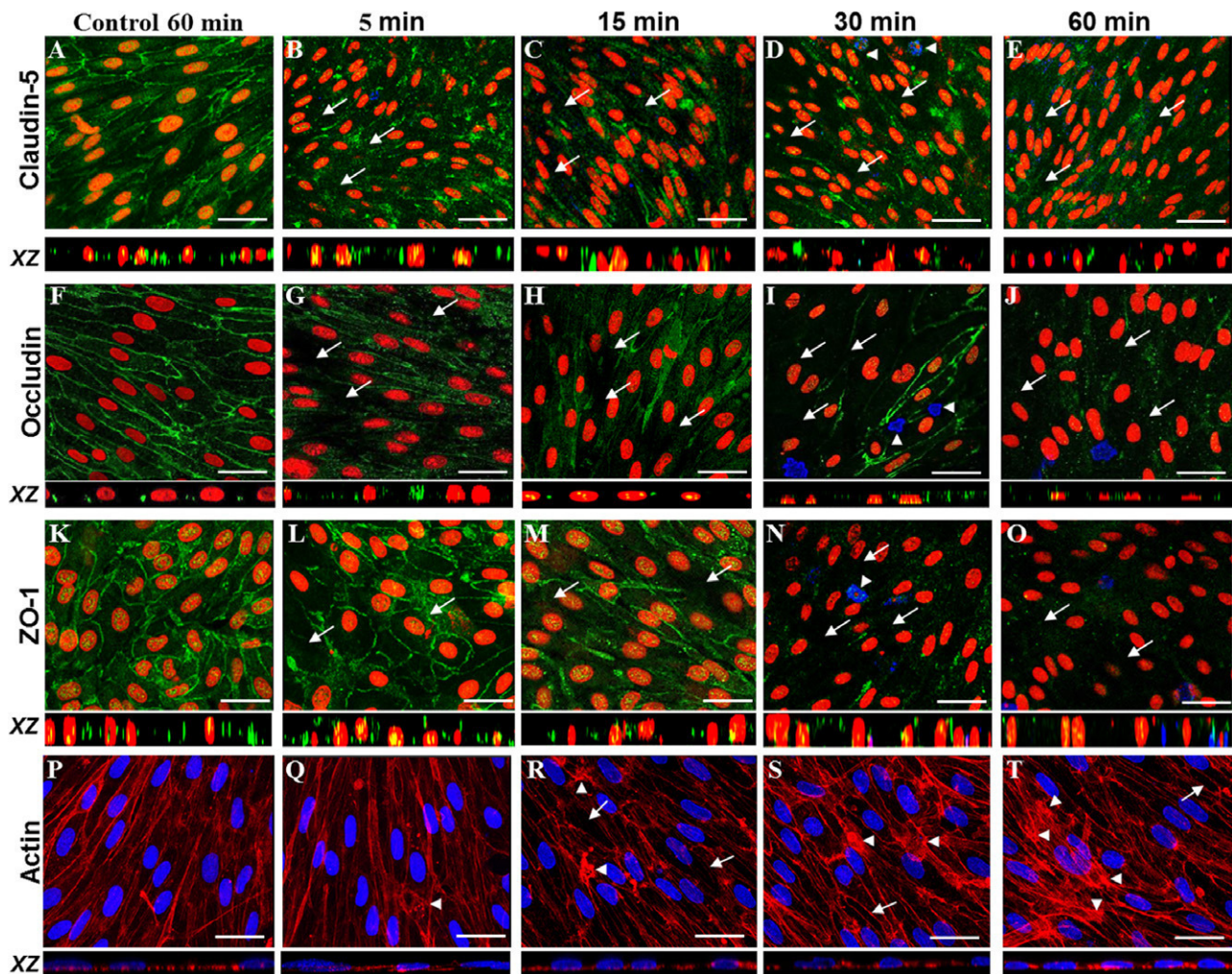


Figure 3 Localization of TJ proteins in RBMEC co-incubated with *Naegleria fowleri*. Amoebae were co-cultured with RBMEC and the TJ proteins claudin-5 (A–E), occludin (F–J), and ZO-1 (K–O) were analysed at 5, 15, 30, and 60 min. Claudin-5, occludin and ZO-1 were immunolabelled with FITC, cell nuclei were labelled with propidium iodide, and the trophozoites were labelled with a secondary antibody coupled with CY5 (arrow-heads). The immunolabelling for the TJ proteins appeared delocalized from 15 to 60 min (arrows). The XZ stacks represented the nuclear localization of these proteins. (P–T) Cytoskeleton rearrangement. The F-actin was stained with rhodamine phalloidin and the cell nuclei with DAPI. Stress fibres were observed from 5 to 60 min (arrowheads) and the cell junctions appeared separated (arrows) from 15 to 60 min. Bar = 30 μ m.

However, another band at 50 kDa was also observed in the control as well as in the RBMEC that had interacted with the trophozoites. In the RBMEC, the protein occludin was present as a band of 65 kDa (control). In the RBMEC that had been co-incubated with the amoebae, the degradation of occludin began at 30 min and was increased after 60 min of co-incubation (Fig. 4C).

Actin was used as loading control, and no degradation was observed in the RBMEC with or without amoebae (Fig. 4A–C). The degradation of the proteins was expressed as a relative optical density (ROD) for the results of the western blot assays (Fig. 4D). These results showed that *N. fowleri* degrades the claudin-5 and ZO-1 proteins in the primary culture of endothelial cells; (* $p < 0.05$).

VCAM-1 and ICAM-1 are induced by *Naegleria fowleri* in RBMEC

We also decided to study the expression of the main adhesion molecules from the brain endothelial cells as a marker of cell activation as a consequence of interaction of the amoebae with RBMEC primary culture, since these events can occur simultaneously and trigger the rupture of the BBB. The expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 that was induced by *N. fowleri* trophozoites in the RBMEC cells was evaluated by confocal microscopy.

The RBMEC control (180 min) showed a basal fluorescence for both VCAM-1 and ICAM-1 molecules (Fig. 5F,L). The positive control of RBMEC incubated with LPS (20 μ g/ml) for 180 min showed a substantial signal for

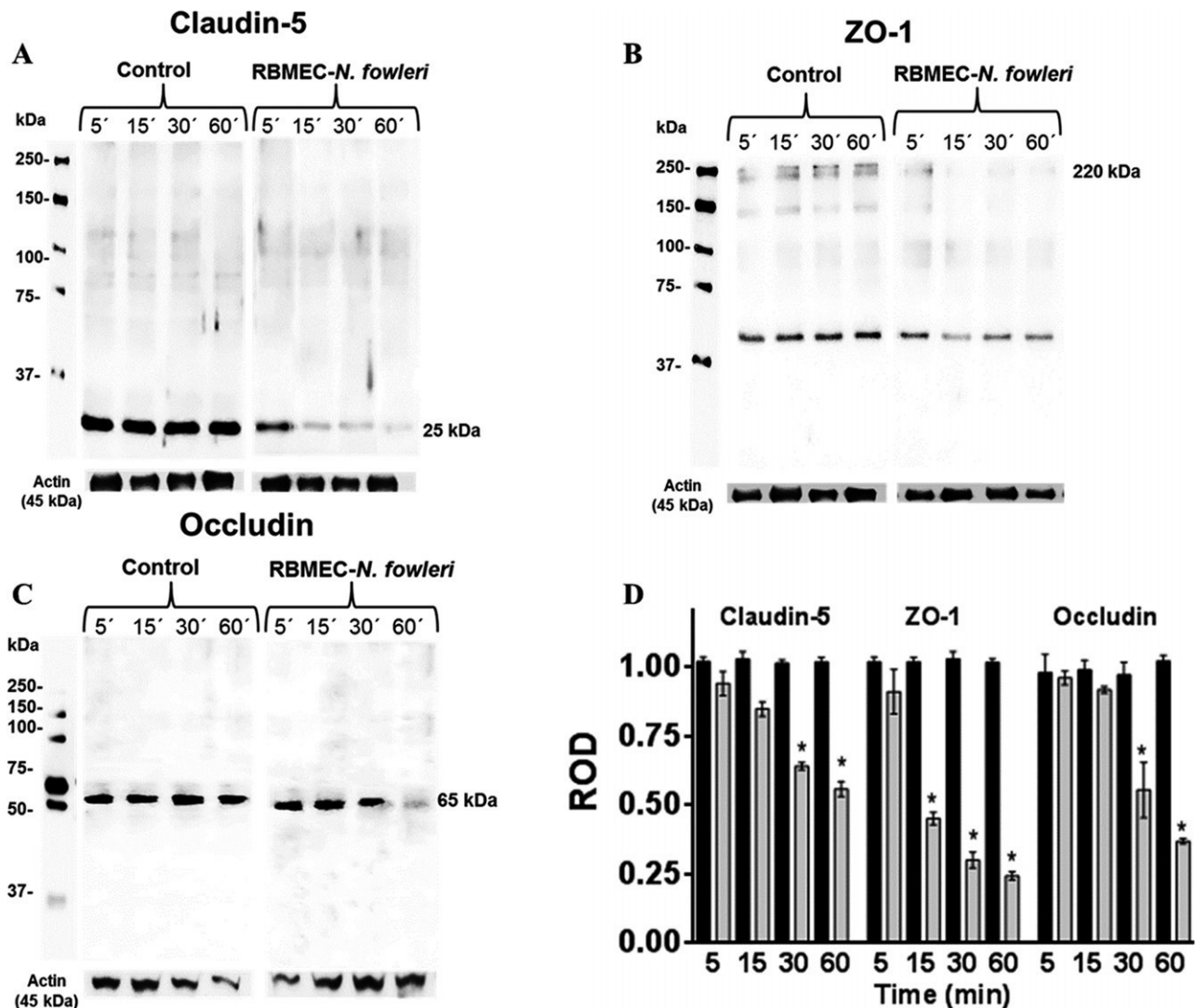


Figure 4 Western blot of the RBMEC TJ proteins co-incubated with *Naegleria fowleri*. **(A)** Bands of 25 kDa that correspond to claudin-5, showed the degradation of the protein produced by the amoebae from 5 to 60 min, compared with the control without amoebae. **(B)** Bands of 220 kDa that correspond to ZO-1 showed that trophozoites induced the degradation of the protein from 5 to 60 min of co-incubation compared with the control. In addition, bands of 50 kDa were observed in the controls and in interacted RBMEC. **(C)** Bands of 65 kDa that correspond to occludin showed the degradation of the protein from 30 to 60 min induced by the trophozoites compared with the controls without amoebae. Actin protein (45 kDa) was used as load control, and no degradation of the protein was observed in all the assayed times. **(D)** Densitometric analysis. The relative optic density (ROD) were made for the TJ proteins (grey bars), and normalized with actin load control. The interactions were compared with the controls without amoebae (black bars). The data represented the means \pm SD of three independent assays. The *p* values were calculated using two-way ANOVA ($*p < 0.05$).

both proteins (Fig. 5E,K). The cells co-incubated with trophozoites for 15 min showed a basal signal for the vascular cell adhesion protein VCAM-1 (Fig. 5A). After 30 min, the label increased slightly compared with the initial time (Fig. 5B). In the RBMEC co-incubated for 60 min, the label for VCAM-1 increased and exhibited a diffuse cytoplasmic signal (Fig. 5C). After 180 min, the label for VCAM-1 was similar to that of the RBMEC that had been stimulated with LPS (Fig. 5D).

Another adhesion protein that is expressed by the brain endothelial cells and is implicated in the leucocyte transmigration during an inflammatory process is the intercellular

adhesion protein ICAM-1. Our results showed that after 15 min of co-incubation, a basal signal for the protein was observed (Fig. 5G). After 30 min, the label was distributed in the cell (Fig. 5H). Similar to the results for the VCAM-1 protein, the fluorescence for ICAM-1 increased from 60 to 180 min to reach a maximum signal within this period (Fig. 5I,J).

To quantify the fluorescence signal for both proteins, the fluorescence intensities were measured, and the corrected total cell fluorescence (CTCF) was determined using ImageJ software (Fig. 5M). The CTCF showed an increase in the label through this period that was

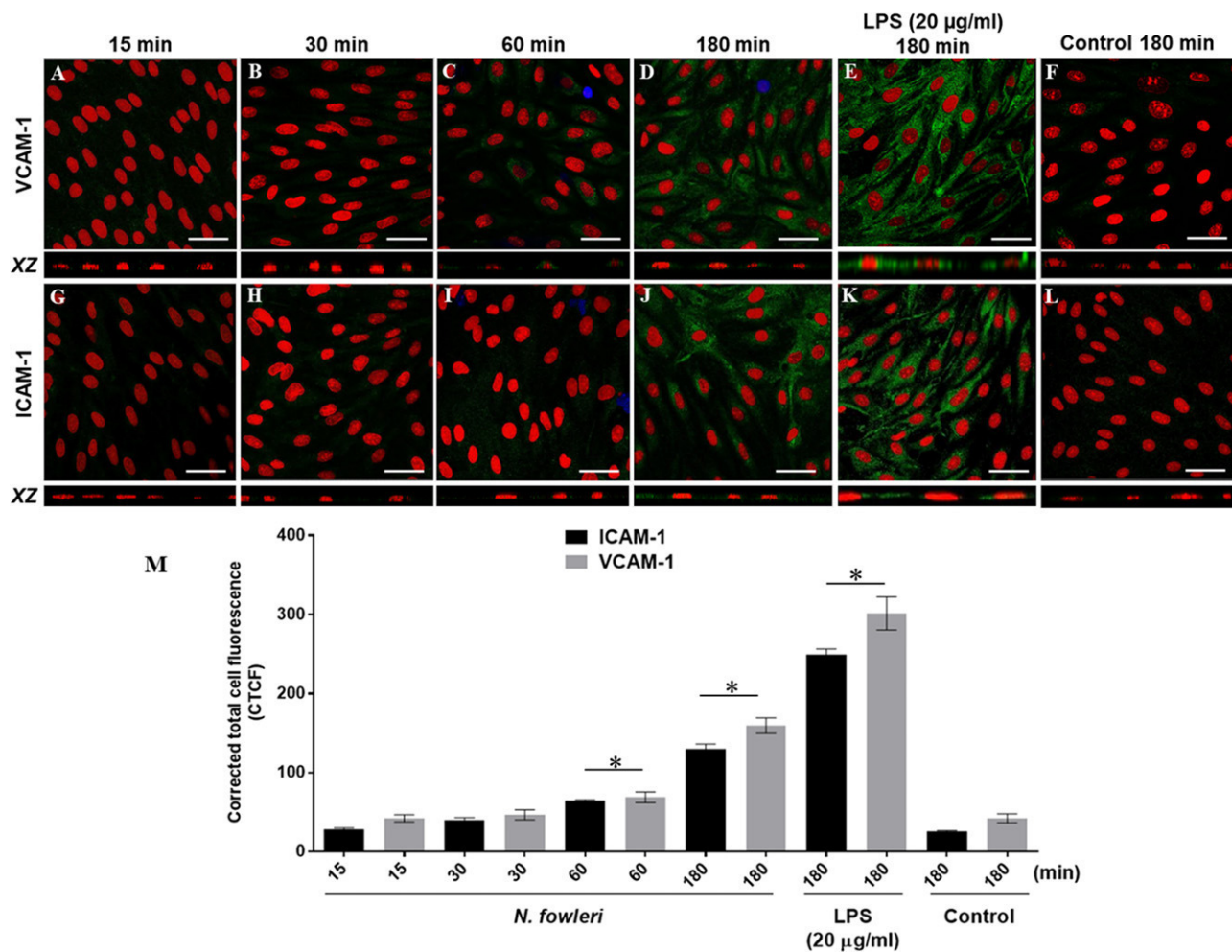


Figure 5 VCAM-1 and ICAM-1 adhesion proteins induced by *Naegleria fowleri*. Trophozoites induced the expression of VCAM-1 (A–D) and ICAM-1 (G–J) in RBMEC from 30 to 180 min. (E–K) Expression of VCAM-1 and ICAM-1 in RBMEC co-incubated with LPS (20 µg/ml) for 180 min (positive control). (F–L) Basal expression of VCAM-1 and ICAM-1 of RBMEC without amoebae (negative control) for 180 min. VCAM-1 and ICAM-1 were labelled with FITC, trophozoites were labelled with a secondary antibody coupled with CY5, and the cell nuclei were stained with propidium iodide. Bar = 20 µm. (M) The fluorescence signal was represented as the corrected total cell fluorescence (CTCF). ICAM-1 (black bars) and VCAM-1 (grey bars). The data represented the means ± SD of three independent assays. The *p* values were calculated using two-way ANOVA (**p* < 0.05).

significant for both proteins by 60 min of co-incubation (Fig. 5M). The intensity of the fluorescence was more evident for VCAM-1. These results demonstrated that *N. fowleri* induced the expression of both adhesion proteins in the RBMEC cultures; (**p* < 0.05).

Cytokine production induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in RBMEC

Cytokine production is a response of the activated brain endothelial cells that could be implicated in the damage of the TJ proteins. We used FACS to investigate the production of several cytokines in the RBMEC primary cultures that were co-incubated with amoebae.

The results showed that the RBMEC secreted basal levels of IL-1β and IL-12p70 at 24 h in the absence of the amoebae (Fig. 6A) but did not produce IL-8, TNF-α, IL-6,

and IL-10 under these conditions (Fig. 6A,B). The results for the RBMEC that were co-incubated with the LPS, which was used as a positive control, showed a significant production of the cytokines IL-8, IL-1β, TNF-α, IL-12p70, and IL-6 compared with the control (Fig. 6C,D). The production of IL-10 was not observed at any time assayed (Fig. 6D). However, our results showed that the RBMEC that were co-incubated with the trophozoites produced significant amounts of the pro-inflammatory cytokines IL-8, IL-1β, TNF-α, and IL-6 at 24 h (Fig. 6E,F) compared with the controls without amoebae (Fig. 6A).

The RBMEC co-incubated with amoebae also did not produce detectable IL-10 (Fig. 6F) compared with the controls without amoebae (Fig. 6B). We conclude that *N. fowleri* induced the production of selected pro-inflammatory cytokines by the RBMEC primary cultures; (**p* < 0.05).

***Naegleria fowleri* induces nitric oxide production by RBMEC**

To analyse the production of NO during the interaction of *N. fowleri* with RBMEC monolayers, we used a detection kit to quantify the nitrites present in the supernatants of the RBMEC co-incubated with the amoebae.

The control RBMEC cultures showed a basal production of nitrites from 1.6 to 2.2 nM/ml at 24 h (Fig. 7). The RBMEC that were incubated with LPS (20 µg/ml), which was used as a positive control of NO production, showed an increase in the concentration of nitrites from 1.6 to 9.6 nM/ml in a time-dependent manner (Fig. 7). The

RBMEC co-incubated with the amoebae displayed an increase in the nitrite concentration from 1.6 to 8.9 nM/ml: values that were very similar to those of the cells co-incubated with LPS (Fig. 7). These results demonstrated that *N. fowleri* can induce the production of NO by the RBMEC cultures in a time-dependent manner; (**p* < 0.05).

DISCUSSION

Naegleria fowleri is the causative agent of the PAM, which is usually a fulminant disease in humans (Schuster and Visvesvara 2004). PAM development has been evaluated in the mouse model. It is important to mention that

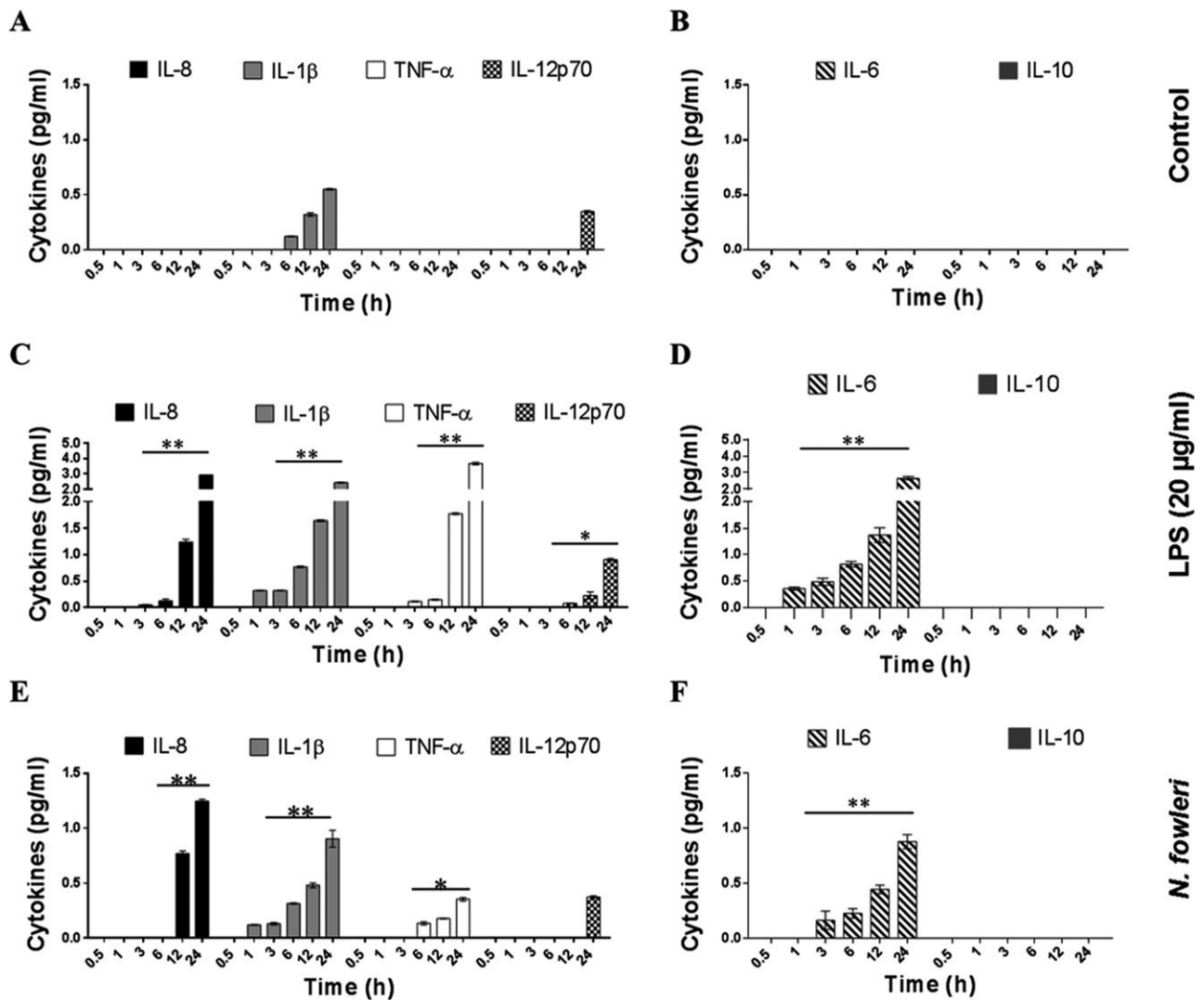


Figure 6 Cytokine production induced by *Naegleria fowleri* in the RBMEC. The concentration of IL-8 (black bars), IL-1β (grey bars), TNF-α (white bars), IL-12p70 (dot bars), IL-6 (strip bars), and IL-10 (dark grey) was measured by FACS. (A, B) Basal production of pro- (IL-8, IL-1β, TNF-α, IL-12p70, and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines by RBMEC during 0.5, 1, 3, 6, 12, and 24 h. (C, D) Cytokine production in RBMEC co-incubated with LPS (20 µg/ml) (positive control) increased significantly compared with the basal conditions. The production of IL-10 was not detected. (E, F) The concentration of IL-8, IL-1β, TNF-α, and IL-6 was induced significantly by the amoebae in all the times evaluated compared with the control without amoebae. The production of IL-10 was absent in all the assayed times. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA. The bars indicate the means ± SD of three independent assays (**p* < 0.05; ***p* < 0.001).

in this animal the amoebae were observed near or inside the capillary vessels, which suggests the participation of the BBB during the invasion process (Jarolim et al. 2000; Martinez et al. 1973). Furthermore, the arrival of inflammatory cells in the brain during PAM may be due to impairment in the immunological privilege of the CNS that is provided by the BBB. Until now, the interaction between the amoebae and this barrier was unknown. Therefore, we decided to establish an in vitro BBB model from rat brain microvascular endothelial cells with the aim of evaluating the effect of *N. fowleri* on the endothelial cells.

Recently, an in vitro BBB model has been reported which possesses similar physiological conditions to an in vivo model; this model is constituted by a primary culture of endothelial cells and a primary culture of astrocytes obtained from rat brains (Molino et al. 2014; Schuhmann et al. 2015). The rat model was used to reproduce the final stages of PAM with the aim of establishing an *ex vivo* model using rat brain slices (Gianinazzi et al. 2005). However, the histopathological events of the invasion process of *N. fowleri* from early to the later stages of PAM in the rat were not previously evaluated. Our results support the conclusion that the rat, similar to the mouse, is an animal that is susceptible to infection with *N. fowleri* and that there are similarities between the mouse and post-mortem human brain biopsies (Carter 1970; Cervantes-Sandoval et al. 2008; Hannisch and Hallagan 1997). The rat model can provide more accurate information about the possible dissemination routes of *N. fowleri* to the CNS, anatomic and histological features such as the size of subarachnoid space that allows analysing the

presence of amoebae in this space. Moreover, the age of the rats correlates with the age of the human cases that correspond to children and young people.

After confirming that the rat is susceptible to develop PAM, we analysed the effect of *N. fowleri* trophozoites over the established in vitro BBB model. The results showed that the trophozoites and their CM produced a substantial cytopathic effect and an important decrease of TEER in the RBMEC culture. Previous reports showed that the cytopathic damage produced by *A. castellanii*, *E. histolytica*, *Toxoplasma gondii*, and *Giardia duodenalis* in HBMEC and MDCK cells, was the result of the action of their proteases (Betanzos et al. 2013; Briceno et al. 2016; Cuellar et al. 2017; Halliez et al. 2016; Khan and Siddiqui 2009; Shibayama et al. 2013). To evaluate the damage produced by the amoebic proteases, we preincubated the trophozoites and their CM with E-64 or Aprotinin and observed that the cysteine proteases inhibitor but not the serine proteases exerted a protective effect on the endothelial monolayer. These data indicate that cysteine proteases from *N. fowleri* could participate in the damage to the intercellular junctions with the consequence of promoting a decrease in TEER.

Moreover, the decrease of TEER by *N. fowleri* was previously associated with the damage to the tight junction proteins claudin-1, occludin and ZO-1 (Shibayama et al. 2013). The confocal microscopy and western blot results correlated to the observations described in MDCK cells, showing the delocalization and the degradation of the TJ proteins claudin-5 (the main type of claudin in the endothelial cells of the BBB), occludin, and ZO-1 in the RBMEC culture. Particularly, in *Plasmodium falciparum* it has been reported that this protozoan can promote the delocalization of claudin-5, occludin, and ZO-1 (Gillrie et al. 2007). Moreover, it is known that occludin in HBMEC cultures can be degraded by *A. castellanii* via the Rho pathway, which was activated by the amoebic adhesion molecules and proteases inducing the contraction of the actin cytoskeleton that promotes the barrier permeability (Khan and Siddiqui 2009). Regarding to the nuclear rearrangement of claudin-5 and ZO-1, it has been reported that the nuclear localization of claudin-2 can form a complex with ZO-1 and ZONAB that is translocated to the nucleus where it interacts with cyclin D1 to promote the proliferation of human lung adenocarcinoma cells (Beard et al. 2012; French et al. 2009; Lesage et al. 2017).

Here, it was also observed that *N. fowleri* can modify the actin cytoskeleton of RBMEC and induce the formation of stress fibres. Furthermore, the degradation of TJ and the actin alterations could also participate in the free passage of the inflammatory cells from the peripheral blood circulation through the endothelial tube that constitutes the BBB (Hannisch and Hallagan 1997; Martinez et al. 1973). Therefore, we conclude that *N. fowleri* is able to damage the endothelial cells by altering the cellular junctions; however, these results do not exclude the possibility that the transcellular pathway is impacted due to other virulence mechanisms of the amoebae such as adhesion molecules and phagocytosis.

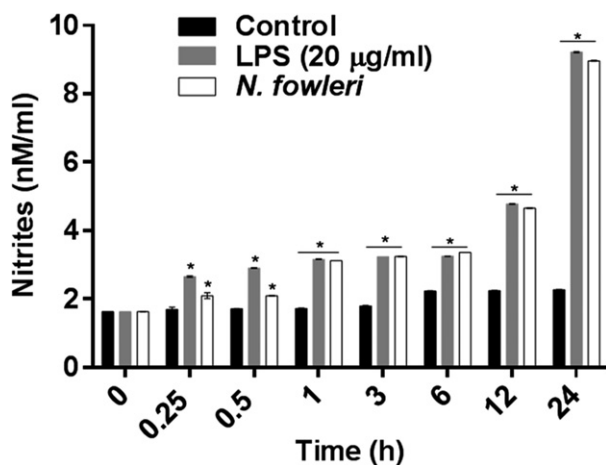


Figure 7 *Naegleria fowleri* induces NO production by the RBMEC. The nitrites basal concentration produced by the RBMEC was of 1.6 nM/ml, with a maximum of 2.2 nM/ml at 24 h (black bars). The nitrites production of the RBMEC incubated with LPS (20 µg/ml) (grey bars), reached a maximum concentration of 9.6 nM/ml at 24 h (positive control). The co-incubation of the trophozoites with the RBMEC increased the nitrites concentration (from 1.6 to 8.9 nM/ml) during all the assayed times, reaching the maximum concentration at 24 h (white bars). The data represented the means ± SD of three independent experiments. The *p* values were calculated using two-way ANOVA (**p* < 0.05).

To demonstrate the role of the endothelial cells in the recruitment of inflammatory cells to the CNS, the production of pro-adhesion and cytokine molecules in the RBMEC primary culture was evaluated. It is known that pathogens promote endothelial activation through Toll-like receptors and/or protease-associated receptors, which result in the production of cytokines and endothelial adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1 (Clark et al. 2007; Frigerio et al. 1998; Liu and Malik 2006; Marin et al. 2001). These proteins are involved in leucocyte adhesion and promote transendothelial migration (diapedesis) through the blood vessels to the brain (Muller 2011; Rahman and Fazal 2009; Shimizu et al. 1991). In this work, we observed that the amoebae induced the expression of both adhesion proteins in a time-dependent manner. Similar results have been described for *P. falciparum*; this parasite induces endothelial proteins that facilitate its migration through endothelial cells by the paracellular route as a mechanism for the invasion of the brain (Deckert-Schluter et al. 1994; Turner et al. 1994). The overexpression of VCAM-1 and ICAM-1 by *N. fowleri* could be associated with the arrival of a high number of inflammatory cells as reported in experimental PAM and in human cases, which increases the damage in the CNS (Clark et al. 2007; Gordeeva 1970).

It is known that in brain injury (ischaemia, multiple sclerosis and by diverse microorganisms), cytokines production are involved in the alteration of the BBB and promote the increase in the barrier permeability (O’Carroll et al. 2015; Sharief et al. 1993; Tsukada et al. 1991). *N. fowleri* can induce an important production of IL-8, IL-1 β , TNF- α , and IL-

6 in the endothelial cells. The IL-8 production could be associated with the recruitment of leucocytes to the site of infection as was previously described in experimental PAM (Cervantes-Sandoval et al. 2008). Furthermore, has been reported that the IL-1 β , TNF- α , and IL-12p70 production is involved in the down-regulation of claudin-5 and promotes the increase of adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) during injury to the endothelial cells (Benedetto et al. 2003; Lienenluke et al. 2000). Moreover, TNF- α and IL-1 β are known to activate the p38/ERK1/2 pathway in human brain endothelial cells and promote the up-regulation of myosin light chain kinase (MLCK). The consequences of this response include an increase in the paracellular flux and promotion of the degradation of occludin, which induces an alteration in the permeability of the cells (Ni et al. 2017). In a similar manner it is known that the production of IL-6 by HBMEC that were exposed to HIV-1, Tat.B and TAt.AG proteins induces the production of this cytokine and the down-regulation of claudin-5 and ZO-1, and this effect could alter the BBB and consequently the brain injury in the viral neuropathogenesis (Bhargavan and Kanmogne 2017). Finally, IL-10 was also evaluated in the RBMEC co-incubated with *N. fowleri*. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that acts as a master regulator and it is required for optimal clearance of an infection (Couper et al. 2008). As expected, we did not observe any of this interleukin in RBMEC supernatants. These results are in accordance with the absence of IL-10 using HBMEC stimulated with LPS (Frigerio et al. 1998).

Another important molecule produced by the brain endothelial cells is NO which participates in the regulation of the vascular tone, permeability control, and in killing

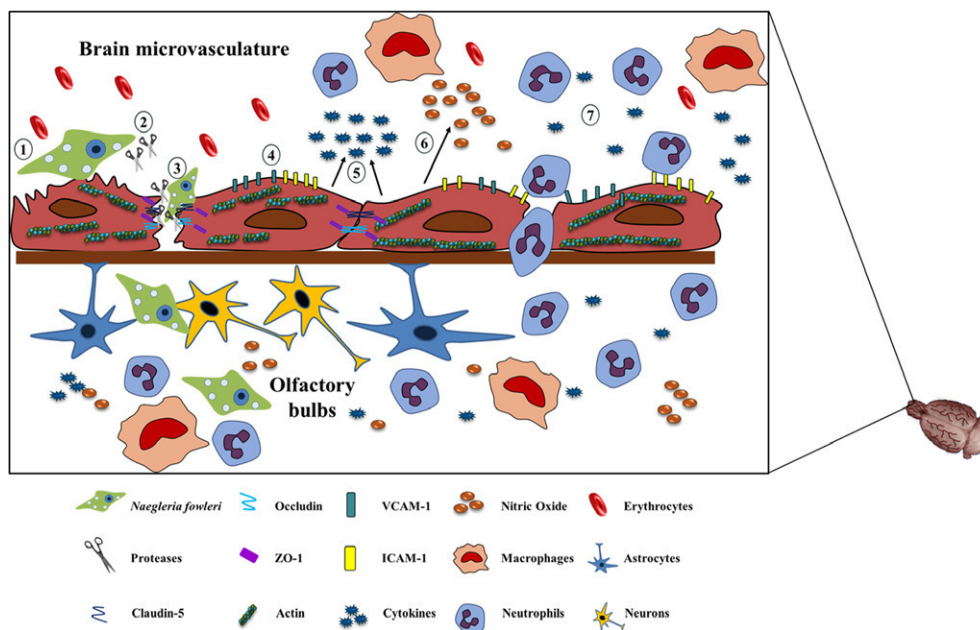


Figure 8 Schematic representation of *Naegleria fowleri* interaction with the BBB. (1) interaction and damage of endothelial cells, (2) secretion of cysteine proteases, (3) disruption of the TJ proteins and actin cytoskeleton, invasion of amoebae, (4) overexpression of endothelial adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1), (5, 6) pro-inflammatory cytokines and NO production by the endothelial cells, (7) leucocyte recruitment and diapedesis through the endothelial cells to the olfactory bulbs.

microorganisms (Marin et al. 2001; Minami et al. 1998; Shukla et al. 1996; Villalba-Magdaleno et al. 2011). The production of NO in the cerebrovascular endothelium can be induced by the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) through TLR4 and cytokine receptors (IL-6R and TNF- α R) during bacterial or protozoan infections (Ehrchen et al. 2009; Miller et al. 1996; Olefsky and Glass 2010; Shimizu et al. 1991; Viswambharan et al. 2003). Furthermore, it is known that NO can damage the junctional complex present in the endothelial cells of the CNS. The down-regulation of claudin-5 and occludin in the BBB promotes the translocation of ZONAB to the nucleus, allowing its interaction with the promoters for the TJ proteins and inhibits their production, which results in an increase in the barrier permeability (Liu et al. 2015). It is possible that in PAM, the production of NO induced by the presence of amoebae could alter the permeability of the BBB and facilitates the migration of the leucocytes during the infection. It is necessary to perform further studies directed towards evaluating the participation of the p38-MAPK and ERK1/2 pathways that are involved in the increase in the endothelial permeability and the production of pro-inflammatory mediators.

In summary, our findings demonstrated that *N. fowleri* trophozoites and their CM can damage the endothelial cells through cysteine proteases in an in vitro system that resembles the physiological conditions of the BBB. The damage includes the delocalization and degradation of the TJ proteins and the reorganization of actin cytoskeleton that in consequence alter the fence properties of the BBB. It is therefore possible that this inflammatory microenvironment allows leucocyte transmigration and cell recruitment that exacerbates the inflammatory reaction in the olfactory bulbs (Fig. 8). Our results provide important insights regarding the participation of the BBB endothelial cells in the development of PAM.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge MSc Angélica Silva-Olivares for her assistance in the amoeba culture and MSc Jaime Escobar-Herrera for his technical assistance in the confocal microscopy. This work was supported by the CONA-CyT grant number 237523.

LITERATURE CITED

Beard Jr, R. S., Reynolds, J. J. & Bearden, S. E. 2012. Metabotropic glutamate receptor 5 mediates phosphorylation of vascular endothelial cadherin and nuclear localization of β -catenin in response to homocysteine. *Vascul. Pharmacol.*, 56:159–167.

Benedetto, N., Rossano, F., Gorga, F., Folgore, A., Rao, M. & Romano Carratelli, C. 2003. Defense mechanisms of IFN-gamma and LPS-primed murine microglia against *Acanthamoeba castellanii* infection. *Int. Immunopharmacol.*, 3:825–834.

Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., González-Mariscal, L., Schnoor, M. & Orozco, E. 2013. The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with

tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS ONE*, 8:e65100.

Betanzos, A., Schnoor, M., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Pais-Morales, J. & Orozco, E. 2014. Analysis of the epithelial damage produced by *Entamoeba histolytica* infection. *J. Vis. Exp.*, 88:1–10.

Bhargavan, B. & Kanmogne, G. D. 2017. Differential mechanisms of inflammation and endothelial dysfunction by HIV-1 subtype-B and recombinant CRF02_AG tat proteins on human brain microvascular endothelial cells: implications for viral neuropathogenesis. *Mol. Neurobiol.*, 2017:1–12.

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.

Briceno, M. P., Nascimento, L. A., Nogueira, N. P., Barenco, P. V., Ferro, E. A., Rezende-Oliveira, K., Goulart, L. R., Alves, P. T., Barbosa Bde, F., Lima, W. R. & Silva, N. M. 2016. *Toxoplasma gondii* infection promotes epithelial barrier dysfunction of caco-2 cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 64:459–469.

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.

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., García-Latorre, E., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. 2008. Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol. Int.*, 57:307–313.

Clark, P. R., Manes, T. D., Pober, J. S. & Kluger, M. S. 2007. Increased ICAM-1 expression causes endothelial cell leakiness, cytoskeletal reorganization and junctional alterations. *J. Invest. Dermatol.*, 127:762–774.

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.

Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, 180:5771–5777.

Cuellar, P., Hernández-Nava, E., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Betanzos, A. & Orozco, E. 2017. *Entamoeba histolytica* EhCP112 dislocates and degrades Claudin-1 and Claudin-2 at tight junctions of the intestinal epithelium. *Front Cell. Infect. Microbiol.*, 7:372.

Daneman, R. & Prat, A. 2015. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 7:a020412.

Deckert-Schluter, M., Schluter, D., Hof, H., Wiestler, O. D. & Lassmann, H. 1994. Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 53:457–468.

Díaz-Coránguez, M., Segovia, J., López-Ornelas, A., Puerta-Guardo, H., Ludert, J., Chávez, B., Meraz-Cruz, N. & González-Mariscal, L. 2013. Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLoS ONE*, 8: e60655.

Ehrchen, J. M., Sunderkotter, C., Foell, D., Vogl, T. & Roth, J. 2009. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 86:557–566.

Fischer, S., Wobben, M., Marti, H. H., Renz, D. & Schaper, W. 2002. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc. Res.*, 63:70–80.

- Fowler, M. & Carter, R. F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br. Med. J.*, 2:740–742.
- French, A. D., Fiori, J. L., Camilli, T. C., Leotlela, P. D., O’Connell, M. P., Frank, B. P., Subaran, S., Indig, F. E., Taub, D. D. & Weeraratna, A. T. 2009. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int. J. Med. Sci.*, 6:93–101.
- Frigerio, S., Gelati, M., Ciusani, E., Corsini, E., Dufour, A., Massa, G. & Salmaggi, A. 1998. Immunocompetence of human microvascular brain endothelial cells: cytokine regulation of IL-1 β , MCP-1, IL-10, sICAM-1 and sVCAM-1. *J. Neurol.*, 245:727–730.
- Furuse, M. 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2:a002907.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.*, 127:1617–1626.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Muller, N., Leib, S. L., Simon, F., Nunez, S., Joss, P. & Gottstein, B. 2005. Organotypic slice cultures from rat brain tissue: a new approach for *Naegleria fowleri* CNS infection *in vitro*. *Parasitology*, 131:797–804.
- Gillrie, M. R., Krishnegowda, G., Lee, K., Buret, A. G., Robbins, S. M., Looareesuwan, S., Gowda, D. C. & Ho, M. 2007. Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins. *Blood*, 110:3426–3435.
- González-Mariscal, L., Domínguez-Calderon, A., Raya-Sandino, A., Ortega-Olvera, J. M., Vargas-Sierra, O. & Martínez-Revollar, G. 2014. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 36:213–223.
- Gordeeva, L. M. 1970. Primary amoebic meningoencephalitis caused by free-living amoebae of the genus *Hartmannella*, *Acanthamoeba* and *Naegleria* (a review of literature). *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 39:227–237.
- Halliez, M. C., Motta, J. P., Feener, T. D., Guerin, G., LeGoff, L., Francois, A., Colasse, E., Favennec, L., Gargala, G., Lapointe, T. K., Altier, C. & Buret, A. G. 2016. *Giardia duodenalis* induces paracellular bacterial translocation and causes postinfectious visceral hypersensitivity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 310:G574–G585.
- Hannisch, W. & Hallagan, L. F. 1997. Primary amoebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature. *Wilderness Environ. Med.*, 8:211–213.
- 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.
- Khan, N. A. & Siddiqui, R. 2009. *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *Int. J. Parasitol.*, 39:1611–1616.
- Kim, D. W., Moon, Y., Gee Noh, H., Choi, J. W. & Oh, J. 2011. Blood-brain barrier disruption is involved in seizure and hemianopsia in nonketotic hyperglycemia. *Neurologist*, 17:164–166.
- Kubota, K., Furuse, M., Sasaki, H., Sonoda, N., Fujita, K., Nagafuchi, A. & Tsukita, S. 1999. Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr. Biol.*, 9:1035–1038.
- Lachenmaier, S. M., Deli, M. A., Meissner, M. & Liesenfeld, O. 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.*, 232:119–130.
- Lesage, J., Suarez-Carmona, M., Neyrinck-Leglantier, D., Grelet, S., Blacher, S., Hunziker, W., Birembaut, P., Noel, A., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C. & Polette, M. 2017. Zonula occludens-1/NF-kappaB/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis. *FASEB J.*, 31:1678–1688.
- Lienenluke, B., Germann, T., Kroczyk, R. A. & Hecker, M. 2000. CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.*, 30:2864–2870.
- Liu, L. B., Liu, X. B., Ma, J., Liu, Y. H., Li, Z. Q., Ma, T., Zhao, X. H., Xi, Z. & Xue, Y. X. 2015. Bradykinin increased the permeability of BTB via NOS/NO/ZONAB-mediated down-regulation of claudin-5 and occludin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464:118–125.
- Liu, S. F. & Malik, A. B. 2006. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 290:L622–L645.
- Marin, V., Montero-Julian, F. A., Gres, S., Boulay, V., Bongrand, P., Farnarier, C. & Kaplanski, G. 2001. The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J. Immunol.*, 167:3435–3442.
- 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, 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.
- McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., Lynch, R. D. & Schneeberger, E. E. 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.*, 109:2287–2298.
- McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A. & Burgess, A. 2014. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*, 13:1400–1412.
- Miller, L., Alley, E. W., Murphy, W. J., Russell, S. W. & Hunt, J. S. 1996. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 59:442–450.
- Minami, T., Okazaki, J., Kawabata, A., Kawaki, H., Okazaki, Y. & Tohno, Y. 1998. Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 5:35–41.
- Molino, Y., Jabes, F., Lacassagne, E., Gaudin, N. & Khrestchatsky, M. 2014. Setting-up an *in vitro* model of rat blood-brain barrier (BBB): a focus on BBB impermeability and receptor-mediated transport. *J. Vis. Exp.*, 88:1–17.
- Muller, W. A. 2011. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu. Rev. Pathol.*, 6:323–344.
- Ni, Y., Teng, T., Li, R., Simonyi, A., Sun, G. Y. & Lee, J. C. 2017. TNF- α alters occludin and cerebral endothelial permeability: role of p38MAPK. *PLoS ONE*, 12:e0170346.
- Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L. I., Ortega-López, J., García-Pérez, R. M., Sánchez, T., Castillo-Juárez, B. A., García-Rivera, G. & Rodríguez, M. A. 2005. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell. Microbiol.*, 7:221–232.
- O’Carroll, S. J., Kho, D. T., Wiltshire, R., Nelson, V., Rotimi, O., Johnson, R., Angel, C. E. & Graham, E. S. 2015. Pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β differentially regulate the inflammatory

- phenotype of brain microvascular endothelial cells. *J. Neuroinflammation*, 12:131.
- Olefsky, J. M. & Glass, C. K. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.*, 72:219–246.
- Pais-Morales, J., Betanzos, A., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Shibayama, M. & Orozco, E. 2016. Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents *In Vitro* and *In Vivo* Virulence of *Entamoeba histolytica*. *PLoS ONE*, 11: e0146287.
- Price, L., Wilson, C. & Grant, G. 2016. Blood-brain barrier pathophysiology following traumatic brain injury. In: Laskowitz, D. & Grant, G. (ed.), *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL. p. 1–31.
- Rahman, A. & Fazal, F. 2009. Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid. Redox Signal.*, 11:823–839.
- 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.
- Schubert-Unkmeir, A., Konrad, C., Slanina, H., Czapek, F., Hebling, S. & Frosch, M. 2010. *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathog.*, 6: e1000874.
- Schuhmann, M. K., Bittner, S., Meuth, S. G., Kleinschnitz, C. & Fluri, F. 2015. Fingolimod (FTY720-P) does not stabilize the blood-brain barrier under inflammatory conditions in an *in vitro* model. *Int. J. Mol. Sci.*, 16:29454–29466.
- 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.
- Sharief, M. K., Noori, M. A., Ciardi, M., Cirelli, A. & Thompson, E. J. 1993. Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage. *J. Neuroimmunol.*, 43:15–21.
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D. & Turner, J. R. 2011. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu. Rev. Physiol.*, 73:283–309.
- 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.
- Shimizu, Y., Newman, W., Gopal, T. V., Horgan, K. J., Graber, N., Beall, L. D., van Seventer, G. A. & Shaw, S. 1991. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J. Cell Biol.*, 113:1203–1212.
- Shukla, R., Nag, D. & Chandra, A. 1996. Terfenadine induced coma mimicking structural brain disease. *J. Assoc. Physicians India*, 44:745–746.
- Torres-Flores, J. M. & Arias, C. F. 2015. Tight junctions go viral!. *Viruses*, 7:5145–5154.
- Tsukada, N., Miyagi, K., Matsuda, M., Yanagisawa, N. & Yone, K. 1991. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 104:230–234.
- Turner, G. D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T. M., Looareesuwan, S., Buley, I. D., Gatter, K. C., Newbold, C. I., Pukritayakamee, S., Nagachinta, B. & White, N. J. 1994. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am. J. Pathol.*, 145:1057–1069.
- Villalba-Magdaleno, J. D., Perez-Ishiwara, G., Serrano-Luna, J., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. 2011. *In vivo* programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess. *Microbiology*, 157:1489–1499.
- Viswambharan, H., Seebeck, T. & Yang, Z. 2003. Enhanced endothelial nitric oxide-synthase activity in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Parasitol.*, 33:1099–1104.
- Westergaard, E. & Brightman, M. W. 1973. Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J. Comp. Neurol.*, 152:17–44.