



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

**DEPARTAMENTO DE  
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Caracterización del proteosoma 20S en amibas  
del género *Naegleria*”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M. en C. PAULA GABRIELA GUZMÁN TÉLLEZ**

**Para obtener el grado de:**

**DOCTORA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y  
PATOGENESIS MOLECULAR**

**Directora de la Tesis:**

**Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas**

**Ciudad de México**

**OCTUBRE, 2020**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 10 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Este proyecto estuvo bajo la tutoría de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas y de la asesoría de la Dra. Abigail Betanzos Fernández, del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, del Dr. José Luis Rosales Encinas, del Dr. José de Jesús Serrano Luna, del Dr. Porfirio Nava Domínguez y de la Dra. Judith Pacheco Yépez.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de CVU/Becario 556818/298976) y con el apoyo del fondo SEP-CONACYT 237523.

## AGRADECIMIENTOS

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

Gracias a mis asesores, la Dra. Abigail Betanzos, la Dra. Judith Pacheco, el Dr. Jesús Serrano, el Dr. Fidel Hernández, el Dr. José Luis Rosales, el Dr. Porfirio Nava por su disponibilidad, apoyo y correcciones para el desarrollo de este proyecto. Además, agradezco a la Dra. Rosa María del Ángel y a la Dra. Lorena Gutiérrez por su invaluable apoyo para el desarrollo de este proyecto.

Gracias al departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN Zacatenco por el gran compañerismo que siempre encontré en cada una de las personas que lo integran. Agradezco especialmente a las Sras. Martha Aguilar, Marcela Guzmán, Irma Miranda y Anabel Sandoval por todas sus atenciones.

Gracias a todos los compañeros que formaron parte del laboratorio durante el tiempo de desarrollo del proyecto: Nadia Flores, Moisés Castillo, Roberto Cárdenas, Daniel Coronado, Diana Martínez, Dania Montes de Oca, Gabriela Rosales, Isaac Villegas, Cristina Xilita y Juan Unzueta, por todo el apoyo y amistad brindados.

Quiero hacer mención especial a la M. en C. Angélica Silva Olivares, al M. en C. Carlos Vázquez Calzada, a la Biol. Lizbeth Salazar- Villatoro, a la Biol. Leticia Cortés Martínez, al Biol. Fernando Median y al Sr. Víctor Hernández Pinales por su apoyo técnico en el desarrollo del presente proyecto.

A la M. en C. Angélica Silva Olivares por sus consejos, paciencia, cariño, pero sobre todo por su invaluable amistad.

Al Sr. Víctor Hernández Pinales, por todo su apoyo y las enseñanzas recibidas.

Gracias a mis queridos amigos: Nadia Flores, Verónica Aranda, Diana Martínez, Suilma Pineda, Alejandro Jonapa, Gabriela Rosales, Erika Aquino, Sael Casas y Juan Unzueta por todas las anécdotas vividas, por su cariño, por los consejos y por recordarme que todo siempre tiene un lado positivo.

Papá, mamá, Gina y Andy, no me cansaré de agradecer porque siempre han estado a mi lado, apoyándome y brindándome tanto amor y comprensión. Ustedes son parte fundamental de este logro y es por ustedes es que se pudo alcanzar la meta. Los amo infinitamente.

## **DEDICATORIA**

Quisiera dedicar este proyecto a toda mi familia (papás, hermanas, tíos, primos y sobrinos) gracias por estar conmigo siempre brindándome todo su amor, apoyando en cada momento y por enseñarme que si me esfuerzo puedo lograr la meta.

Especialmente quiero dedicar este trabajo a mi tía querida Maricela Noriega Azuara y a mi abuelita Conchita Hernández, sé que desde el cielo están orgullosas de esto. Sin todo su amor, consejos y palabras de apoyo nunca lo habría logrado. Las quiero con todo mi corazón.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
AMIBAS DE VIDA LIBRE.....	11
GÉNERO <i>Naegleria</i> .....	12
CICLO DE VIDA DE <i>Naegleria</i> spp. ....	12
<i>Naegleria gruberi</i> .....	14
<i>Naegleria fowleri</i> .....	15
MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE <i>Naegleria fowleri</i> .....	16
MENINGOENCEFALITIS AMIBIANA PRIMARIA (MAP) .....	20
SINTOMATOLOGÍA .....	21
PATOGENÉNESIS .....	21
DIAGNÓSTICO.....	23
TRATAMIENTO .....	24
UBIQUITINA Y SISTEMA DE UBIQUITINACIÓN.....	25
PROTEOSOMA .....	27
PROTEOSOMA 26S .....	28
PROTEOSOMA 19S .....	29
PROTEOSOMA 20S .....	31
INHIBIDORES DE PROTEOSOMA.....	33
ANTECEDENTES DIRECTOS .....	35
PROTEOSOMA EN PROTOZOARIOS.....	35
JUSTIFICACIÓN .....	43
HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVO GENERAL.....	45
OBJETIVOS PARTICULARES .....	45
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	46
ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LA SECUENCIA Y ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN AMIBAS DEL GÉNERO <i>Naegleria</i> spp. ....	46
CULTIVOS CELULARES Y AMIBIANOS.....	46
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES DE <i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i> y células HUH-7.....	47

ENSAYO DE WESTERN-BLOT PARA LA DETECCIÓN DE SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> Y <i>N. gruberi</i> .....	47
DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta$ 7 POR ENSAYOS DE DOT-BLOT EN EXTRACTOS TOTALES DE <i>Naegleria</i> spp. ....	48
ENSAYOS DE VIABILIDAD DE TROFOZOÍTOS DE <i>Naegleria</i> spp. CO-INCUBADOS CON INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA (LACTACISTINA Y MG-132).....	49
INMUNOLocalización DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ Y $\beta$ DEL PROTEOSOMA 20S EN <i>Naegleria</i> spp. ....	49
CARACTERIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLÍTIcas DEL PROTEOSOMA 20S EN <i>Naegleria</i> spp. ....	50
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE <i>Naegleria</i> spp. INCUBADOS CON INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA .....	52
ENSAYO DE ENQUISTAMIENTO DE <i>Naegleria</i> spp. EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA .....	53
RESULTADOS .....	54
LAS AMIBAS DEL GÉNERO <i>Naegleria</i> POSEEN UN PROTEOSOMA 20S CONSTITUIDO POR SUBUNIDADES ALFA Y BETA CON DOMINIOS CONSERVADOS CARACTERÍSTICOS .....	54
MODELAMIENTO TRIDIMENSIONAL DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ Y $\beta$ DEL PROTEOSOMA 20S EN AMIBAS DEL GÉNERO <i>Naegleria</i> .....	59
EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> Y <i>N. gruberi</i> .....	61
VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE <i>Naegleria</i> spp. INCUBADOS CON INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA .....	65
LOCALIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN LOS TROFOZOÍTOS DE <i>Naegleria</i> spp. ....	68
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DEL PROTEOSOMA 20S EN TROFOZOÍTOS DE <i>Naegleria</i> spp.....	74
EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL PROTEOSOMA 20S EN LA PROLIFERACIÓN DE LOS TROFOZOÍTOS DE <i>Naegleria</i> spp. ....	78
EFECTO DE LOS INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA 20S EN EL ENQUISTAMIENTO DE <i>Naegleria</i> spp. ....	81
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIONES .....	93
PERSPECTIVAS .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo de vida de <i>Naegleria</i> spp.....	14
Fig. 2. Mecanismos de patogenicidad de <i>N. fowleri</i> .....	20
Fig. 3. Sistema de conjugación de la ubiquitina y sistema ubiquitina-proteosoma.....	27
Fig. 4. Proteosoma 26S.....	29
Fig. 5. Conformación estructural del proteosoma 19S .....	30
Fig. 6. Proteosoma 20S.....	32
Fig. 7. Estructura química de inhibidores del proteosoma 20S .....	34
Fig. 8. Alineamientos múltiples para las subunidades $\alpha$ y $\beta$ del proteosoma 20S en <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	55
Fig. 9. Estructuras tridimensionales de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ del proteosoma 20S de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	60
Fig. 10. Identificación por ensayos de Western blot de subunidades estructurales y catalíticas del proteosoma 20S en trofozoítos de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	64
Fig. 11. Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de <i>N. gruberi</i> y <i>N. fowleri</i> incubados con concentraciones crecientes de inhibidores del proteosoma 20S .....	66
Fig. 12. Localización subcelular de las subunidades estructurales y catalíticas del proteosoma 20S en trofozoítos de <i>N. fowleri</i> .....	69
Fig. 13. Localización intracelular de las subunidades proteosomales estructurales y catalíticas en <i>N. gruberi</i> .....	70
Fig. 14. Localización intracelular de las subunidades proteosomales en células HUH-7.....	71
Fig. 15. Fluorescencia de las subunidades del proteosoma 20S en <i>Naegleria</i> spp. y células HUH-7 .....	73
Fig. 16. Curva estándar de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) libre .....	74
Fig. 17. Caracterización de las actividades catalíticas del proteosoma 20S en trofozoítos de <i>Naegleria</i> spp.....	76
Fig. 18. Actividad del proteosoma 20S en trofozoítos de <i>Naegleria</i> spp. en presencia de inhibidores de proteasas no relacionados .....	77
Fig. 19. Curva estándar de absorbancia de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> .....	78
Fig. 20. Curvas de crecimiento de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> en presencia de inhibidores del proteosoma 20S.....	79
Fig. 21. Efecto de los inhibidores del proteosoma 20S en la morfología de los quistes de <i>Naegleria</i> spp.....	82
Fig. 22. Porcentaje de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> inducidos a enquistamiento, en presencia de inhibidores del proteosoma .....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Substratos de la vía de ubiquitina- proteosoma. Tomado de Kisselev, et al. (2001). .....	28
Tabla 2. Porcentajes de identidad y similitud entre las subunidades del proteosoma 20S de <i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i> , en comparación con organismos modelo.....	58
Tabla 3. Porcentaje de identidad y similitud entre las subunidades $\alpha$ y $\beta$ del proteosoma 20S .....	59
Tabla 4. Porcentaje de identidad estructural de las subunidades del proteosoma 20S de especies del género <i>Naegleria</i> en comparación con <i>Homo sapiens</i> .....	61

## ABREVIATURAS

AVL: amibas de vida libre

*N. fowleri*: *Naegleria fowleri*

*N. gruberi*: *Naegleria gruberi*

MAP: meningoencefalitis amibiana primaria

ITS: espaciadores transcripcionales internos

MEC: matriz extracelular

HSP70: proteína de choque térmico

AMC: 7-amino—4-metilcumarina

CPs: cisteína proteasas

LCR: líquido cefalorraquídeo

AmB: amfotericina B

SNC: sistema nervioso central

Ub: ubiquitina

MET: microscopía electrónica de transmisión

MHC-I: complejo principal de histocompatibilidad I

UPS: sistema ubiquitina-proteosoma

AAA: ATPasas asociadas con varias actividades celulares

Ntn: hidrolasas nucleófilo N-terminal

KO: base de datos KEGG Orthology

PHMB: ácido *p*-hidroxi-mercuri benzoico

NEM: N-etilmaleimida

E64: trans-epoxisuccinil-L-leucilamida-(4-guanidino) butano

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

MG-132: carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal

MTT: (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio

HUH-7: células de hepatocarcinoma humano

*E. aerogenes*: *Enterobacter aerogenes*

## RESUMEN

Las amibas de vida libre del género *Naegleria* comprenden un grupo de protozoarios ubicuos y anfitoicos que se distinguen por tener en su ciclo de vida tres fases: trofozoíto, flagelado y quiste. Hasta el momento se han descrito alrededor de 47 especies, siendo *Naegleria gruberi* y *Naegleria fowleri* las más estudiadas, la primera como modelo de diferenciación celular (amiba no patógena) y la segunda como el agente etiológico de la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP); una enfermedad fulminante y con elevada tasa de mortalidad, para la cual no se cuenta con un tratamiento específico. El proteosoma 20S es un complejo enzimático multicatalítico y proteolítico, considerado como la principal ruta de recambio y degradación no lisosomal de proteínas intracelulares. Este participa en la regulación de procesos celulares fundamentales tales como la proliferación, respuesta estrés, control de calidad y eliminación de proteínas, diferenciación, inflamación, transducción de señales, ciclo celular y respuesta inmune, entre otras, contribuyendo a la homeostasis celular. Además, su presencia y función se ha reportado en múltiples protozoarios patógenos. Sin embargo, se desconocía si este complejo está presente en el género *Naegleria*. El objetivo del presente proyecto fue identificar y caracterizar al proteosoma 20S en los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*. Para esto, se realizaron ensayos de análisis bioinformático, que permitieron establecer la presencia y características específicas de las subunidades del complejo y su homología con las proteínas del proteosoma de otros organismos modelo. Además, se realizaron ensayos de Western y dot blot para detectar la presencia de algunas de las subunidades estructurales y catalíticas, y a través de estudios de microscopía confocal, se estableció su localización subcelular a nivel del citoplasma y en regiones periféricas al núcleo. Asimismo, utilizando ensayos de degradación de sustratos e inhibidores específicos para el proteosoma, se pudo identificar a la actividad catalítica de tipo quimiotripsina como la más importante en estas amibas. Finalmente, se realizaron ensayos de proliferación y enquistamiento, que permitieron determinar la intervención del proteosoma 20S en estos procesos celulares.

Considerando los resultados obtenidos, se concluyó que las amibas del género *Naegleria* presentan el proteosoma 20S conformado de manera típica, localizado en el citoplasma y con actividad catalítica principalmente de tipo quimiotripsina; el cual participa en la proliferación y diferenciación de estas amibas.

## ABSTRACT

The free-living amoebae of the *Naegleria* genus comprise a group of ubiquitous and amphizoic protozoa that are distinguished by having three phases in their life cycle: trophozoite, flagellate and cyst. At least 47 species have been described, being *Naegleria gruberi* (non-pathogenic) and *Naegleria fowleri* (pathogenic) the most studied amoebae. The first as a model of cell differentiation and the second as the etiologic agent of primary amebic meningoencephalitis (PAM), a fulminant disease with a high mortality rate, for which there is no available specific treatment. The 20S proteasome is a multicatalytic and proteolytic enzyme complex, considered the main route of non-lysosomal replacement and degradation of intracellular proteins. It participates in the regulation of fundamental processes such as cell proliferation, stress response, protein quality control and replacement, differentiation, inflammation, signal transduction, cell cycle and immune response, among others, contributing to cellular homeostasis. In addition, its presence and function have been reported in multiple pathogenic protozoa. However, there was no information of the proteasome 20S in the *Naegleria* genus. The main objective of the study was to identify and characterize the 20S proteasome in the *N. fowleri* and *N. gruberi* trophozoites. For this purpose, bioinformatic analysis were performed, these allowed to establish the presence and specific characteristics of subunits of the complex and their homology with the proteasome proteins of other studied organism models. Besides, Western and dot blot assays were developed to detect the presence of structural and catalytic subunits and by confocal microscopy, it was found that is localized in the cytoplasm and in peripheral regions to the nucleus. Using degradation of specific substrate assays and inhibitors, it was demonstrated that chymotrypsin- like activity was the most important proteasomal protease in these amoebae. Finally, proliferation and encystment assays were performed to determine the participation of the 20S proteasome in these cellular processes.

Taking together all these results, it was concluded that both amoebae present a typical 20S proteasome, located at the cytoplasm and with a catalytic activity mainly of the chymotrypsin- like type; which participates in the proliferation and differentiation of these amoebae.

## INTRODUCCIÓN

### AMIBAS DE VIDA LIBRE

Se denomina amibas de vida libre (AVL) a un grupo de protozoarios aeróbicos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Dichos microorganismos son anfizoicos (tienen la dualidad tanto de vivir libremente en la naturaleza, como la capacidad de inducir enfermedades en el ser humano y en los animales) con pobre adaptación al parasitismo y no necesitan de un hospedero para completar su ciclo biológico [1, 2].

Las AVL han sido clasificadas en cuatro clados dentro de los eucariontes, como parte de los supergrupos Amoebozoa y Excavata, así como dentro de los supergrupos Rhizaria y Opisthokonta [3]. En la naturaleza se han descrito múltiples géneros y especies pero de estos solo *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Sappinia pedata* son considerados como agentes etiológicos de importancia clínica para el humano y/o veterinaria [4]. De acuerdo con la secuenciación de la subunidad 16S del rRNA, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* son géneros de AVL que se encuentran estrechamente relacionados entre sí filogenéticamente, a diferencia de los géneros *Naegleria* y *Sappinia*, que no muestran esta relación [2].

En la actualidad, solo se ha descrito el genoma completo de dos AVL de importancia médica: *A. castellanii*, agente etiológico que produce queratitis amibiana y afecciones cutáneas en pacientes inmunocompetentes, y encefalitis amibiana granulomatosa en personas inmunocomprometidas, y de *N. fowleri*, la cual es el agente etiológico de una enfermedad fulminante denominada meningoencefalitis amibiana primaria (MAP). Sin embargo, ya existe información preliminar del genoma de *Balamuthia*, la cual también causa encefalitis amibiana granulomatosa y afecciones a nivel del tracto respiratorio y cutáneas [5-8]. Asimismo, recientemente se describieron los genomas completos de las especies no patógenas del género *Naegleria*: *N. gruberi* y *N. lovaniensis*. *N. gruberi* es considerada un microorganismo modelo para el estudio de la diferenciación celular y el ensamblaje flagelar, debido a su capacidad de transformarse a una fase de flagelado que forma parte de su ciclo de vida. Por su parte, *N. lovaniensis* es otra especie perteneciente a este género, la cual a través de estudios de análisis filogenético de ADN ribosomal (5.8S) y de las secuencias de espaciadores transcripcionales internos (ITS), es considerada la especie no- patógena más cercana a *N. fowleri* pues es probable que hayan evolucionado a partir de un ancestro común, por lo que el estudio de su genoma es considerado básico para dilucidar molecularmente factores de

patogenicidad y mecanismos celulares diferenciales, que permitan establecer estrategias terapéuticas eficientes en contra de la MAP [9, 10].

En la naturaleza, las AVL se encuentran en contacto directo con biopelículas en donde se alimentan de bacterias, hongos y algas, sirviendo como reservorios de algunas de ellas. Especialmente se ha estudiado esta relación con bacterias altamente patógenas para el humano como *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium avium* [11].

### **GÉNERO *Naegleria***

Las AVL del género *Naegleria* son un grupo de protozoarios que tienen un ciclo de vida de tres fases: trofozoito, quiste, y adicionalmente el flagelado [12]. Franz Schardinger realizó la primera descripción de este género en 1899, pero no es sino hasta 1912 que Alexandre Alexeieff, describió detalladamente la morfología de los tres estadios del ciclo de vida de estas amibas (quiste, trofozoito y flagelado), algunos aspectos de su proceso de división celular y sugiere el nombre de *Naegleria* para este género. Alexeieff las describió como amibas pequeñas, que se desplazan por medio de pseudópodos, que cuentan con una vacuola contráctil y un cariosoma prominente [13-15]. Mediante técnicas moleculares que involucran la secuenciación y comparación de las ITS, así como de la subunidad 5.8S del ADNr, se han descrito hasta 47 especies diferentes del género *Naegleria* [14].

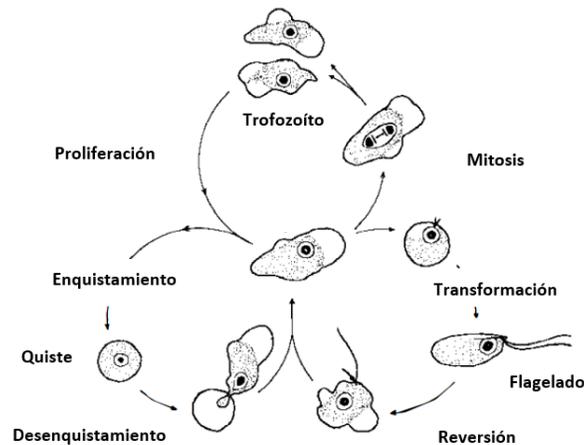
Las amibas del género *Naegleria* son consideradas microorganismos ubicuos y han sido aisladas de cuerpos de agua dulce naturales (lagos, lagunas, ríos), albercas, aguas termales, suministros domésticos, aguas residuales, suelo, aire, sistemas de humidificación, soluciones de lavado nasal y de aislados humanos de garganta y cavidad nasal [12]. Algunas de sus especies son consideradas termofílicas (por ejemplo, *N. fowleri* y *N. lovaniensis*), y metabólicamente son consideradas microorganismos aeróbicos, aunque han sido aisladas de sedimentos anaeróbicos; cuentan con mitocondrias y su mecanismo de respiración es similar al de eucariontes superiores, incluyendo la fosforilación oxidativa y ciclo de Krebs intacto. Su proceso de división celular se da a través de fisión binaria en la cual el núcleo celular se divide por criptomitosis [12, 14, 16-18].

### **CICLO DE VIDA DE *Naegleria* spp.**

Las amibas del género *Naegleria* tienen un ciclo de vida de tres fases completamente dependientes de las condiciones ambientales y nutricionales [19].

- **Trofozoíto:** considerado el estadio vegetativo de la amiba y el único que se alimenta y prolifera. Tiene un tamaño de 15 a 25  $\mu\text{m}$ , cuenta con una membrana celular de aproximadamente 10 nm de espesor, ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso, un citoesqueleto formado por actina y miosina, un aparato de Golgi primitivo, mitocondrias características en forma de campana o copa, así como un núcleo y nucléolo prominentes [12, 20].
- **Flagelado:** Este estadio es inducido al incubar alrededor de 60 minutos a la amiba en soluciones carentes de nutrientes (salinas); es identificable por los cambios morfológicos que se presentan, pues el flagelado tiene forma de pera, con un tamaño de alrededor de 10-16  $\mu\text{m}$  y la presencia de un aparato flagelar completo con un arreglo típico 9+2 de alrededor de 12  $\mu\text{m}$ . En esta fase, pueden observarse de 2 a más flagelos por amiba [12, 19, 21, 22].
- **Quiste:** Esta fase es considerada de resistencia, y aparece cuando la amiba es sometida a condiciones de restricción de nutrientes, desecación, acumulación de desechos, exposición a productos de metabolismo bacteriano, falta de oxígeno, cambios de pH, altas concentraciones de sal y alta densidad poblacional. El quiste es esférico con un diámetro de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , liso y con doble pared. Existen diversos reportes que describen ultraestructuralmente a los diferentes componentes del quiste de las amibas *Naegleria* spp., así se sabe que la pared del quiste cuenta con un espesor de 10-20 nm y está conformada por dos partes: una capa interna medianamente gruesa (endoquiste, de aproximadamente 125 nm de espesor) y una externa de soporte (exoquiste, de aproximadamente 160 nm de espesor); las cuales se unen en una región conocida como opérculo. Este es un componente mucoide que sella los 2 o 3 poros u ostiolas que se presentan, dependiendo de la especie de *Naegleria* de la que se trate y que tiene un espesor de 200-250 nm en su componente externo y de 100-150 nm en el interno. Entre los componentes de la pared del quiste se ha descrito la enolasa, así como alto contenido lipídico y  $\beta$ -1-4-polisacáridos, probablemente celulosa. Dentro del quiste se ha descrito la clara presencia del núcleo con su nucléolo, así como una serie de vacuolas citoplasmáticas electrondensas que probablemente contienen restos de nutrientes obtenidos previamente al enquistamiento, o bien se trata de vacuolas autofágicas; además de una serie de gránulos densos de aproximadamente 100 nm de diámetro, localizados en la periferia del citoplasma, cercanos a la membrana. También se ha descrito que se pueden observar a las mitocondrias alargadas y las cisternas del retículo endoplásmico rugoso ligeramente hinchadas. Es importante mencionar, que las diferencias que se conocen entre los quistes de las especies de *Naegleria* spp., han sido ampliamente utilizadas para la identificación entre especies patógenas y no patógenas. Así, el

quiste de *N. gruberi* presenta poros en la pared que no se han encontrado en *N. fowleri*, o que son muy raramente encontrados [12, 23-26].



**Fig. 1. Ciclo de vida de *Naegleria* spp.** Las amibas de este género tienen 3 fases: trofozoito, flagelado y quiste. Estas dependen de las condiciones ambientales y todas convergen en el trofozoito, el cual es el único con la capacidad de alimentación y proliferación. Modificado de Fulton (1977).

### ***Naegleria gruberi***

*Naegleria gruberi* fue la primera especie estudiada del género, se considera como un microorganismo ubicuo y ésta se encuentra en suelo húmedo, cuerpos de agua dulce y asociada a otros organismos y microorganismos en estos ambientes. Es una amiba no patógena, no termofílica, la cual tiene como fuentes de nutrientes a las bacterias Gram negativas de las biopelículas que se forman en los ambientes que coloniza. *N. gruberi* ha sido dividida en cuatro clústeres, según los resultados del análisis del ADNr de las cepas que conforman la especie, de los cuales solo la cepa EG y sus derivadas son consideradas *N. gruberi*. Además, esta especie es un modelo de estudio ampliamente reportado debido a su capacidad de diferenciación de un estado ameboide a uno de flagelado; por lo que es de gran interés el caracterizar el mecanismo de transición entre estas fases, así como la formación, ensamblaje y funcionamiento del aparato flagelar. Otros motivos por los cuales *N. gruberi* es una especie relevante, son debido a su relación con *N. fowleri*, la única especie patógena para el humano y el hecho de que su genoma fue el primero de este género en ser secuenciado [14, 27].

El genoma nuclear de *N. gruberi* tiene un tamaño de 41 Mb, organizado en al menos 12 cromosomas que van de los 0.7 a los 6.5 Mb, en los que se identifican 15,727 genes codificantes para proteínas (57.8%). Se ha descrito la presencia en el nucléolo de aproximadamente 4,000 plásmidos extracromosomales de 14 kb que contienen, exclusivamente, una única copia de los genes para las subunidades 10S, 5.8S y 28S del ARNr. Estas amibas presentan además, un genoma mitocondrial de

50 kb organizado en un único cromosoma circular que codifica para proteínas del complejo mitocondrial I, II y IV, componentes del sistema mitocondrial del citocromo c y el de maduración  $c_1$  y, de manera muy particular, un “set” completo de genes de ARNt [9, 28].

La secuenciación del genoma de *N. gruberi* ha permitido conocer diversas características biológicas de estos ameboflagelados, así, aunque no se ha podido observar un aparato de Golgi clásicamente constituido en estos microorganismos, se han encontrado genes que evidencian la presencia de una maquinaria de tráfico intracelular completa; además, se ha reportado la presencia del total de los genes que codifican para el citoesqueleto de actina (incluyendo isoformas de actina y proteínas de unión a actina) y y los microtúbulos, la presencia de varios factores de transcripción y de proteínas de señalización que podrían ayudarle a detectar las condiciones ambientales en las que se encuentra y de ser éstas adversas, desencadenar eventos de señalización que conlleven a la diferenciación a fases de resistencia que podrían involucrar a los receptores acoplados a proteínas G, receptores acoplados a histidina cinasas, al menos 265 cinasas predichas, 32 fosfatasas, 182 GTPasas tipo Ras monoméricas y al menos a 108 adenilato/guanilato ciclasas encontrados en el genoma [28].

El metabolismo de las amibas del género *Naegleria*, particularmente de *N. gruberi*, también ha sido muy estudiado. Estas amibas se consideran microorganismos aeróbicos con la capacidad de oxidar glucosa, además cuentan con la maquinaria enzimática para realizar el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria mitocondrial típica. Sin embargo, se sabe que estas amibas también cuentan con mecanismos que le permiten subsistir bajo condiciones ambientales anaeróbicas, pues dentro de su genoma se encuentran genes que codifican para la deshidrogenasa hidrogenosomal canónica (relacionada con la presencia de hidrogenosomas, y por lo tanto, con la obtención de energía a través del metabolismo anaeróbico del ácido pirúvico), así como para la vía de la malato dismutasa importante en la síntesis anaeróbica de ATP [16].

Considerando las características mencionadas anteriormente, así como la organización genómica tan peculiar de las amibas del género *Naegleria*, es que se les ha considerado como un microorganismo clave en la evolución de los primeros eucariontes [28].

### ***Naegleria fowleri***

*Naegleria fowleri* es un ameboflagelado termofílico, y es la única especie de este género que es patógena para el humano [29]. Fue nombrada en honor al Dr. Malcolm Fowler, quien fue el primero en describirla como agente etiológico de la MAP [30]. El genoma completo de esta amiba consiste en aproximadamente 66 Mb, con un genoma nuclear diploide de 29.62 Mb, el cual es rico en AT,

con un contenido de 35.4% de GC. Cuenta con 17, 252 marcos de lectura abiertos y 323 familias de genes específicos. Además, tiene 2 veces más ADN plasmídico que genómico (cada ADNr plasmídico de 12-18 kb) y 18 veces menos de ADN mitocondrial (50 kb). Al comparar el genoma completo de *N. fowleri*, con el de *N. gruberi* se encontró que la similitud entre las secuencias codificadas es de únicamente el 32.1% de los marcos de lectura abiertos predichos pero, a pesar de la baja similitud a nivel de nucleótidos, se encontró que el 78.2% de los marcos de lectura abiertos de *N. fowleri* coinciden con proteínas de *N. gruberi* [6].

*N. fowleri* ha sido aislada de cuerpos de agua dulce naturales y artificiales de prácticamente todos los ambientes y temperaturas, con preferencia por aguas templadas, por lo que en la mayoría de los casos se ha reportado en zonas subtropicales o templadas. Se ha reportado la existencia de al menos 8 tipos de esta amiba los cuales se distribuyen de manera diferencial en cada continente, excepto en la Antártida. En Oceanía y Japón solo se reporta el tipo 5, en Asia los tipos 2 y 3, en Europa se hallan todos los tipos excepto el 1 y en América los tipos 1, 2 y 3. En el caso de África no se conoce específicamente cuáles son los tipos de *N. fowleri* presentes. Además, es necesario mencionar que solo 4 de estos 8 tipos han sido aislados de pacientes (tipo 1, 2, 3 y 5) [31]. Esta distribución se está modificando actualmente, debido al cambio climático y al eventual aumento en las temperaturas a nivel global, lo que favorece las condiciones de crecimiento de la amiba; por lo que debe de ser de especial importancia la implementación de medidas de prevención en la población y de detección de la amiba en suministros de agua potable, que abastecen a los hogares y se utilizan para actividades cotidianas, así como en los ambientes acuáticos recreativos [21].

### **MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *Naegleria fowleri***

*N. fowleri* cuenta con diversos mecanismos de patogenicidad que le permiten evadir la respuesta inmunológica del hospedero durante el establecimiento y desarrollo de la MAP (Fig. 2). La adhesión es el primer paso en la infección; se sabe que en la superficie de los trofozoítos de *N. fowleri* se encuentran presentes residuos de D-manosa, L- fucosa y D-glucosa, los cuales participan en la adherencia de la amiba al neuroepitelio nasal. Existen diferencias en la cantidad de estos residuos entre especies, siendo que *N. gruberi* o *N. lovaniensis*, presentan una menor cantidad de estos carbohidratos [32, 33]. Otras proteínas que podrían estar participando en la adhesión de *N. fowleri* son las de tipo integrina. Se ha descrito que la unión a la fibronectina se da por la proteína tipo integrina  $\alpha 5/\text{FnR}$  (60 kDa), la cual a través de la señalización por la vía PKC, lleva a la formación de placas de actina [34]. También se ha reportado la presencia de una proteína tipo integrina  $\beta 1$ , que co-localiza con filamentos de actina, lamelopodios y adhesiones focales, favoreciendo ampliamente

la unión de la amiba a componentes de la matriz extracelular (MEC) (laminina-I, colágena-I y fibronectina) [35]. Finalmente, se ha determinado que existen diferencias importantes entre la membrana celular de *N. fowleri* y las especies no patógenas. Marciano-Cabral y cols., reportaron una proteína de membrana específica de *N. fowleri* denominada Mp2CL5 (17 kDa), señalada como un posible factor de virulencia [36]. Además, recientemente se encontró una proteína de 23 kDa, localizada en la periferia y en la membrana celular, que se expresa en mayor cantidad en trofozoítos de *N. fowleri*, especialmente en amibas recuperadas de cerebro, en comparación con *N. gruberi* y *N. lovaniensis*, sugiriendo su participación en la virulencia amibiana [37].

Otro mecanismo de patogenicidad de *N. fowleri* es la fagocitosis. Se ha reportado que en esta amiba se da a través de la formación de amebostomas o copas fagocíticas, descritas como estructuras tipo ventosas, las cuales pueden variar en cantidad de manera directamente relacionada a la virulencia amibiana [38]. Se sabe que la formación de estas estructuras está relacionada con la relocalización y remodelación del citoesqueleto de actina. En este sentido, se ha descrito la presencia de la Nf-actina de manera abundante en el citoplasma, pseudópodos y especialmente, en las bocas fagocíticas, por lo que se su inhibición genera una reducción o formación anormal de estas estructuras, que repercute en la capacidad citotóxica, de fagocitosis, de adhesión y adicionalmente, en la proliferación de la amiba. El papel de la actina como un importante factor de virulencia se comprobó en un estudio reciente, en el que el gen *nfa1* que codifica para la actina de *N. fowleri*, fue clonado y transfectado en trofozoítos de *N. gruberi* (amiba no patógena) resultando en un grupo de amibas transgénicas. Estos trofozoítos fueron co-incubados con monocapas de células CHO (ovario de hámster chino), donde se evaluó la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), mostrando que los trofozoítos de *N. gruberi* transgénicos presentaban una citotoxicidad de aproximadamente 55.8%, en comparación con la del 17.7% causada por los trofozoítos no transfectados ("Wild-Type"). Estas dos condiciones fueron comparadas con el daño generado por trofozoítos de *N. fowleri*, que causaron un 82% de citotoxicidad y con los experimentos realizados con los mismos grupos de amibas (*N. fowleri*, *N. gruberi* transgénica y *N. gruberi* "Wild-Type"), pero en presencia de un anticuerpo específico anti-Nfa1. Así, se encontró que en las monocapas co-cultivadas con *N. fowleri* existe un daño celular de hasta un 43.9%, mientras que en monocapas incubadas con *N. gruberi* transgénica solo se detectó un daño del 16%. De esta manera, se concluyó que la proteína actina de *N. fowleri* debe considerarse como un factor de virulencia en los trofozoítos de la especie patógena [39-41].

La capacidad citotóxica dependiente de contacto de *N. fowleri* se ha estudiado a través de la co-incubación de esta amiba con múltiples líneas celulares; incluidas células epiteliales de mamífero y de neuroblastoma humano, de rata y de ratón. En estos estudios se demostró que ésta se encuentra determinada por algunos factores, como el tipo de célula blanco, siendo las de origen neuronal las más susceptibles [42-44]. En este sentido, se ha descrito que *N. fowleri* realiza un mecanismo similar a la fagocitosis, denominado trogocitosis, el cual es dependiente de contacto, y en el que trofozoítos de *N. fowleri* destruyen a las células blanco a través de “pellizcar o mordisquear” pequeñas porciones de su citoplasma, utilizando la formación de pseudópodos en la membrana celular amibiana. De esta manera, los trofozoítos presentan numerosas vacuolas con contenido de fragmentos citoplasmáticos de las células digeridas en diferentes etapas de degradación, que se vuelven más evidentes mientras más avanzado está el proceso de daño [45, 46]. Por otro lado, *N. fowleri* tiene la capacidad de formar poros en la membrana de las células blanco a través de proteínas específicas, entre ellas la proteína N-PFP (“pore forming protein” o proteína formadora de poro). Esta proteína está anclada a la membrana celular amibiana, tiene un peso molecular de 50-54 kDa y genera canales iónicos en la célula blanco, además de tener actividad hemolítica [47, 48]. Adicionalmente, se reportó el papel de la proteína HSP70 (Nf-cHSP70) en la citotoxicidad y proliferación amibiana; de esta manera además de participar en la termo-tolerancia, HSP70 estaría actuando como un factor de virulencia [49].

Por otro lado, la citotoxicidad independiente de contacto es de los mecanismos de patogenicidad más estudiados, entre ellos se incluye a otras proteínas formadoras de poro: los naegleriaporos A y B, que son glicoproteínas de 10 y 13 kDa respectivamente, los cuales forman parte de la familia de las proteínas tipo saposina (que engloba otras proteínas formadoras de poro de parásitos como *E. histolytica*) [50, 51] y a las proteasas. Algunas de las primeras actividades enzimáticas estudiadas considerando la desmielinización propia de esta enfermedad fueron la fosfolipasa A, esfingomielinasa y lisofosfolipasa [52-54].

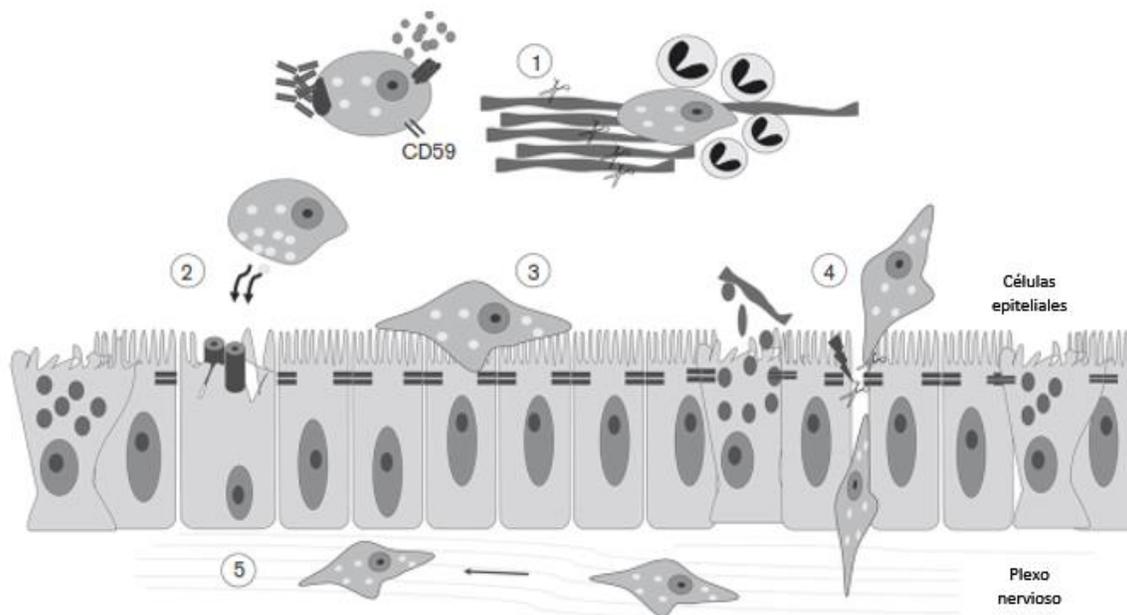
Otras actividades catalíticas reportadas son la de elastasa, que en conjunto con las metaloproteasas MMP-2 (gelatinasa A), MMP-9 (gelatinasa B) y la MMP-14 (metaloproteínasa de matriz tipo-1), podrían tener un papel relevante en la degradación de proteínas de la MEC, facilitando el libre acceso de la amiba al neuroepitelio olfatorio [55, 56]. La presencia de cisteína proteasas (CPs) en *N. fowleri*, las cuales tienen actividad óptima a condiciones fisiológicas (pH 7.0 y 35 °C) ha sido reportada ampliamente y se ha señalado que este tipo de actividad catalítica es la más importante para los mecanismos de patogenicidad en los trofozoítos de este género [57]. La primera proteasa

parcialmente caracterizada en la amiba pertenece a la familia de las CPs; tiene un peso molecular de 30 kDa y fue aislada del medio condicionado obtenido de trofozoítos de *N. fowleri*. Su caracterización bioquímica demostró que la actividad óptima de esta enzima se da a un pH de 7.5. Además, a través de ensayos proteolíticos utilizando sustratos acoplados a la molécula fluorogénica 7-amino-4-metilcumarina (AMC) e inhibidores específicos, se encontró que corresponde a una CP y se determinó que su porción amino-terminal corresponde a una tiol-proteasa con homología con la catepsina L. Adicionalmente, se demostró su participación en la producción del daño causado por *N. fowleri* a las células blanco, a través de ensayos *in vitro*, en los que se evaluó el efecto citopático de los trofozoítos hacia la monocapa de células BHK (riñón de hámster bebé) utilizando tanto a trofozoítos completos como medio condicionado, en ausencia y presencia de inhibidores específicos de esta familia de proteasas (Z- fenilalanina-alanina-fluorometil-cetona, ZFA- FMK). En este reporte también se estableció su participación en la degradación de proteínas de MEC, obtenida a partir del cultivo de células R22 (derivadas de músculo liso vascular de rata) y utilizando las mismas condiciones que en el ensayo de citotoxicidad hacia monocapas celulares (amibas completas y medio condicionado obtenido de trofozoítos co-incubados o en ausencia de inhibidores específicos). Así se concluyó que los trofozoítos de *N. fowleri* secretan una cisteína proteasa de 30 kDa, involucrada en su capacidad citotóxica independiente de contacto, que actúa bajo condiciones fisiológicas y que está participando en los mecanismos de destrucción tisular que permiten el establecimiento de la MAP [58]. Recientemente se demostró, en condiciones *in vitro*, la participación directa de las CPs en la degradación específica de las proteínas de uniones estrechas, tanto en el epitelio neuro-olfatorio (ZO-1 y claudina-1), como específicas del endotelio presentes en la barrera hematoencefálica (claudina-5, ocludina y ZO-1) en condiciones *in vitro* [59, 60]. Adicionalmente, se ha señalado la participación de cisteína proteasas de entre 50 a 150 kDa, en la degradación de proteínas de unión a hierro (hololactoferrina, holotransferrina y hemoglobina), las cuales además de ser fuente de este mineral para la amiba, pueden participar como mecanismo de evasión de la respuesta inmune [61].

Otras proteasas de importancia patológica son las que se encargan de la degradación de las glicoproteínas del moco (mucinas), las cuales actúan como parte de la respuesta inmune innata. Se ha reportado una CP de 37 kDa presente en los extractos crudos totales de *N. fowleri* que degrada mucina submaxilar bovina en condiciones fisiológicas (pH 7.0) [62]. Otras actividades proteolíticas encontradas en esta amiba son las de catepsina B (38.4 kDa) y la de una cisteína proteasa tipo catepsina B (34 kDa), relacionadas con la degradación de proteínas como IgA, IgG, IgM, colágeno, fibronectina, hemoglobina y albúmina [63]. Por otra parte, se encontró una glicosil hidrolasa de 94

kDa (Nf-GH), la cual es específica de esta amiba y que podría estar alterando la reología del moco, permitiendo que la amiba evada la mucina y se desarrolle la MAP [64].

*N. fowleri* tiene la capacidad de reorganizar su membrana para la formación de “capping”, lo cual le permite evadir la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos. Esto le permite a la amiba relocalizar los complejos antígeno-anticuerpo, primero a zonas específicas de su membrana y, posteriormente efectuar el “shedding” que le permite desechar los complejos, o bien, endocitarlos [65, 66]. Además, *N. fowleri* cuenta con la presencia de una proteína tipo CD-59 (protectina), la cual podría estar actuando en la evasión de la actividad del sistema del complemento al estar encargada de evitar el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana, propio de este sistema [67].



**Fig. 2. Mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri*.** (1) Evasión de la respuesta inmune innata incluyendo enzimas mucinolíticas, una proteína tipo CD59 y la relocalización y desprendimiento de anticuerpos. (2) Actividad citotóxica independiente de contacto (proteínas formadoras de poro). (3) Adhesión dependiente de proteínas tipo integrina y glicoproteínas con residuos de manosa y fucosa. (4) Actividad proteolítica amibiana que degrada las uniones estrechas del neuroepitelio olfatorio, (5) permitiéndole el paso al plexo nervioso y al SNC. Tomado de Martínez-Castillo, et al. (2016).

## **MENINGOENCEFALITIS AMIBIANA PRIMARIA (MAP)**

La meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) es una infección fatal del sistema nervioso central (SNC), descrita como una meningoencefalitis aguda, fulminante, hemorrágica y necrotizante. Los primeros síntomas se presentan aproximadamente entre el 5° y el 8° día después de la adquisición de la infección, y puede llevar a la muerte del paciente en aproximadamente una semana. La MAP se considera una infección no oportunista, pues los reportes clínicos señalan que afecta

principalmente a niños y adultos jóvenes inmunológicamente intactos quienes presentan una historia reciente de actividades acuáticas en cuerpos de agua dulce, personas que por sus prácticas cotidianas, religiosas o enfermedades respiratorias, se someten a lavados nasales utilizando agua del suministro común y no soluciones estériles, o personas en países en vías de desarrollo en las que debido a la falta de control sanitario, la calidad del suministro de agua es mala o bien se carece totalmente de él [68, 69].

### **SINTOMATOLOGÍA**

Esta patología cursa con un cuadro clínico similar a una meningitis de etiología bacteriana, viral o causada por hongos. Los síntomas iniciales se pueden manifestar desde las 24 horas hasta los 5 días post-infección y consisten en dolor frontal o bitemporal de cabeza que no responde a los analgésicos, fiebre superior a 38°C, alteraciones del gusto, olfato y de la visión, náuseas, rinitis, vómito en proyectil, anormalidades del comportamiento, anorexia, confusión, irritabilidad y somnolencia. En estadios más avanzados de la enfermedad, se presenta rigidez de la nuca, signos positivos de Kerning y Brudzinski, fotofobia, sangrados nasales, ganglios linfáticos inflamados, parálisis de los nervios craneales, convulsiones, anormalidades neurológicas tales como disfunciones del tercer, cuarto y sexto nervios craneales, una presión intracraneal superior a 600 mm H<sub>2</sub>O, anormalidades del ritmo cardíaco, necrosis miocárdica y coma, que pueden llevar a la muerte del paciente en aproximadamente una semana [68, 70].

### **PATOGÉNESIS**

*N. fowleri* infecta a su hospedero siguiendo una ruta de infección olfatoria. Las amibas entran a las fosas nasales y como primer paso se adhieren y penetran la mucosa nasal. Posteriormente, los trofozoítos entran en contacto con la capa de moco que recubre al epitelio olfatorio, estos se pueden encontrar embebidos en el moco y rodeados por una reacción inflamatoria de tipo aguda, principalmente conformada por neutrófilos (6 a 12 h post-infección), causando un daño importante en este epitelio aproximadamente a las 24 h. Los trofozoítos de *N. fowleri* penetran el neuroepitelio olfatorio, abriendo las uniones estrechas que lo conforman e invadiendo directamente las células sustentaculares; lo que les permite alcanzar la lámina basal del epitelio y el plexo nervioso submucosal, sobre el cual las amibas migran dentro de la fila olfatoria y de esta manera cruzan la placa cribiforme (30 h) para establecerse en los bulbos olfatorios (96 h). Aquí, causan una reacción inflamatoria severa conformada principalmente por neutrófilos (102 h). En este momento, también se ha reportado un incremento en el número de trofozoítos, así como la observación de áreas de necrosis de tipo lítica y hemorragia (5-7 días) [68, 71-74].

## EPIDEMIOLOGÍA

Las primeras descripciones reportadas de la MAP aparecieron en 1965, realizadas por los doctores Malcolm Fowler y R.F. Carter en el Hospital de Niños de Adelaide al sur de Australia. En este reporte se detallaron cuatro casos de meningitis piógena rápidamente mortal, que en los primeros momentos se creyó que habían sido causados por *Acanthamoeba* sp., puesto que las amibas observadas al analizar cortes histológicos de las piezas post-mortem no correspondían a *Entamoeba histolytica* [30]. Actualmente, la MAP se considera una enfermedad emergente, la cual presenta una tasa de mortalidad del 95 al 97% y que se presenta principalmente durante los meses de verano y en climas templados a calurosos. Hasta el momento se calculan alrededor de 440 casos a nivel mundial, pero es importante mencionar que esta cifra debe ser considerada subestimada, debido a factores como la falta de experiencia del personal médico para realizar el diagnóstico adecuado o la atribución de los casos a meningitis de etiología desconocida [21, 75]. El número de casos confirmados se reportan distribuidos de manera tal que, se conocen 143 en Estados Unidos, 105 en Pakistán, 19 en Australia, 16 en India, 16 en Republica Checa, 9 de México, 7 en Venezuela y casos aislados en Francia, Bélgica, Sudamérica, África y Asia. La tasa de recuperación reportada para esta patología es de aproximadamente el 5%, utilizando en todos los casos a la amfotericina B como tratamiento en combinación con otros fármacos [75].

La incidencia de la MAP y los factores de riesgo son diferentes según la región del mundo. Hasta hace pocos años, la mayoría de los casos confirmados provenían de regiones del sur de EE. UU. Sin embargo, de manera reciente, se ha observado un incremento en el número de reportes en países como Pakistán e India. Esto ha permitido establecer diferentes criterios epidemiológicos que se ven influidos por la geografía local, el contexto cultural y los hábitos humanos e incluso religiosos que pueden estar propiciando la aparición de la enfermedad (21, 75). En este sentido, la visión de los factores de riesgo se ha actualizado y las actividades acuáticas recreativas ya no son consideradas el único riesgo típico para la infección por MAP, ahora también se consideran las prácticas religiosas que involucran la ablución nasal, los festivales religiosos que involucran baños colectivos en aguas no potables; así como el padecimiento de enfermedades como sinusitis, rinitis o congestión nasal, pues se llega a recomendar a los pacientes, como terapia complementaria, realizar limpiezas nasales con agua corriente. También es importante señalar que se desconoce el papel de los factores del huésped tales como son el género, enfermedades pre-existentes que comprometen la integridad de la mucosa nasal o los factores inmunológicos que pudieran retrasar o evitar el establecimiento de la enfermedad [29, 69].

## DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico de la MAP rápido y certero es de crucial importancia, considerando la rapidez de la progresión de la enfermedad y la gravedad de la sintomatología que se presenta, sobre todo los eventos más tardíos de la misma. En primera instancia, una historia clínica que describa contacto con cuerpos de agua dulce, al realizar alguna de las actividades mencionadas anteriormente (recreativas, lavados nasales terapéuticos o religiosos, etc.), debe de ser sugerente de un caso de MAP. Por lo que el conocimiento e identificación temprana de esta infección por parte del personal médico, es fundamental para la recuperación del paciente [76].

El diagnóstico de la MAP se realiza a través de la toma de muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar. Una vez obtenida la muestra se debe realizar un examen físico macroscópico de la misma, que involucre la observación de parámetros como su color, si es que éste se observa blanquecino, purulento o con evidente hemorragia. A continuación, se tienen que evaluar parámetros bioquímicos que pueden ser indicativos como niveles de glucosa y una elevada cantidad de proteína. Al mismo tiempo, es necesario realizar una observación directa de las muestras del LCR con la ayuda de un microscopio de campo claro en busca de células con movimiento amibiano que se distingan por su núcleo y nucléolo característico, además de la presencia de otras células como neutrófilos o eritrocitos. Adicionalmente, se pueden utilizar tinciones de Giemsa, Wright e incluso hematoxilina y eosina para lograr una mejor y más certera visualización de los trofozoítos, así como de sus estructuras características. Es importante mencionar que los trofozoítos de *N. fowleri* pueden ser confundidos con macrófagos o con otras amibas como *E. histolytica* u otras AVL, como *Acanthamoeba* spp. o *Balamuthia mandrillaris*, por lo que es recomendable realizar una prueba de enflagelación, que se realiza bajo la premisa de que únicamente las amibas del género *Naegleria*, específicamente *N. fowleri*, presentan una fase de flagelado inducible bajo condiciones de pocos nutrientes y altas concentraciones de sal. Así que la muestra de LCR se centrifuga y el sedimento es incubado en solución salina isotónica por 2 h, posteriormente se toma una muestra y se observa al microscopio en busca de biflagelados móviles, lo que confirma el diagnóstico de MAP [76, 77]. Metodologías inmunológicas como la inmunofluorescencia indirecta o la prueba de ELISA, que utilizan anticuerpos específicos, como el anticuerpo monoclonal (5D12) que reconoce un epítipo glicosilado de *N. fowleri*, son de gran ayuda para la detección de la amiba, ya sea en muestras de LCR o comúnmente en secciones de tejido cerebral obtenido por biopsia. Aunque normalmente esto último se realiza en el caso de diagnóstico *post-mortem*[76, 78].

Actualmente, los métodos más sensibles y específicos para el diagnóstico de la MAP son técnicas moleculares como la PCR tiempo real, anidada o multiplex, utilizando iniciadores para la región ITS ribosomal completa, para la subunidad 18S rRNA o para un fragmento de 166 pb del gen *Mp2CI5* (que codifica para una proteína de membrana específica de *N. fowleri*). Desafortunadamente estas pruebas no son accesibles aún en todos los laboratorios. Otros métodos de diagnóstico que se pueden realizar son los cultivos amibianos a partir de LCR o biopsia de tejido cerebral. En estos casos, la muestra biológica se inocula en cultivos de líneas celulares, que al incubarse a la temperatura óptima para la ameba (37°C), se espera que esta se multiplique y destruya la monocapa en 24 a 48 h. Así como la prueba de virulencia en ratón, aunque ésta toma entre 4 a 7 días. También son de gran ayuda las pruebas de imagen que incluyen tomografía computarizada y la resonancia magnética [20, 76].

## TRATAMIENTO

Hasta el momento no existe un fármaco específico en contra de la MAP, y pocas son las intervenciones quimioterapéuticas que han tenido éxito, considerando que el porcentaje de recuperación de los pacientes va del 2 al 5%. Además, un obstáculo en la búsqueda de un compuesto terapéutico específico y altamente efectivo para el tratamiento de esta patología, es la dificultad de encontrar una molécula que atraviese de manera eficiente la barrera hematoencefálica, que presente nula toxicidad y mínimos efectos secundarios [79].

Hasta el momento el único fármaco que ha demostrado eficacia clínica en el tratamiento de la MAP es la amfotericina B (AmB), la cual es un polieno antifúngico de amplio espectro, que ejerce su actividad al unirse al ergosterol en las membranas celulares [80]. El mecanismo de acción de este fármaco sobre trofozoítos de *N. fowleri* ha sido estudiado *in vitro* mediante técnicas ultraestructurales, y se ha observado que la AmB induce la distorsión de la forma nuclear, hinchazón de las membranas citoplasmáticas (retículo endoplásmico rugoso y liso), disminución del número de vacuolas alimentarias, ausencia de formación de pseudópodos, anomalías mitocondriales, aumento de las vacuolas autofágicas y formación de vesículas en la membrana plasmática [81]. En el tratamiento contra la MAP, la AmB es administrada a una dosis de 0.25 a 1.5 mg/Kg/día para adultos y de 0.5 a 0.7 mg/Kg/día para niños, vía intravenosa, por un total de 14 días, o bien de manera intratecal a dosis de 1.5 mg/día por 2 días y a 1 mg/día durante 8 días [82].

Un enfoque terapéutico basado en la administración de AmB en combinación con otros medicamentos ha sido utilizado en casos exitosos de recuperación, al obtenerse beneficios como un aumento en la penetración de ambos fármacos al SNC, aumento del efecto antiamebiano, así como, disminución de la sintomatología y de la inflamación que se presentan durante los estadios más avanzados de la MAP. Algunos de estos fármacos incluyen antibióticos (azitromicina, rifampicina) y antifúngicos (fluconazol, miconazol, ketoconazol y cloranfenicol) y como antiinflamatorios (dexametasona), además de terapias no farmacológicas como el drenaje de LCR, terapia hiperosmolar, hiperventilación moderada e hipotermia [82-84].

Actualmente, se desarrollan nuevos fármacos para el tratamiento de la MAP, incluyendo la acroleína, isoflavonas, estatinas, rokitomicina, miltefosina, corfigungin y amidino derivados. Resultados experimentales *in vitro* e *in vivo* indican que estos fármacos cuentan con actividad antiamebiana efectiva contra *N. fowleri* y no presentan algunas de las desventajas de la AmB como son la toxicidad o la poca permeabilidad además, que son efectivos a menores dosis o con mínimos efectos secundarios [20, 82, 85].

Finalmente, en los últimos años se ha venido dando un nuevo enfoque para el tratamiento de la MAP que contempla el uso de fármacos sintetizados e indicados para otras patologías del SNC. Algunos de estos fármacos comprenden el haloperidol, loperamida, digoxina, amiodarona, entre otros; los cuales estarían ejerciendo su función sobre la disponibilidad de iones, la funcionalidad de receptores o sobre las vías de señalización propias de *N. fowleri*. Sin embargo, aún son necesarios estudios *in vivo* e *in vitro* para establecer los mecanismos de acción de éstos sobre la ameba, su eficacia terapéutica, y sus parámetros farmacológicos [79].

## **UBIQUITINA Y SISTEMA DE UBIQUITINACIÓN**

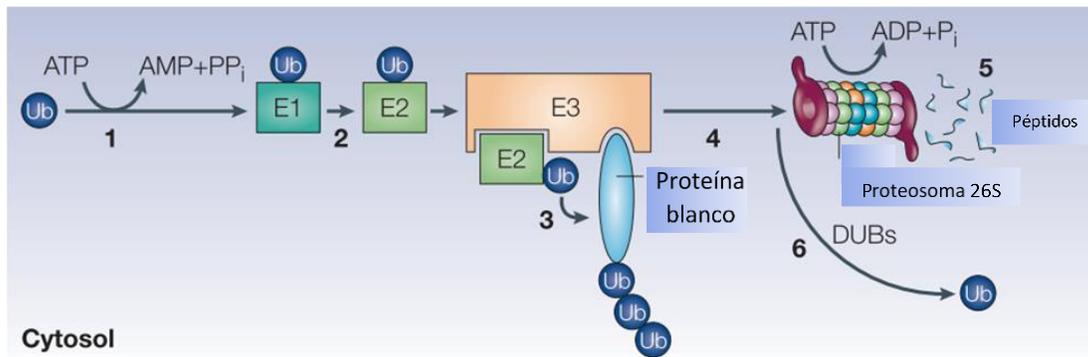
La ubiquitina (Ub) es una proteína de 76 aminoácidos, altamente conservada entre los eucariontes, que se considera ausente entre los procariontes, aunque varias proteínas bacterianas son similares tanto en estructura como en función. La Ub constituye entre el 0.1 al 5% del total de proteínas celulares y se expresa en forma de diferentes precursores, ya sea como una proteína lineal de fusión denominada poliubiquitina, formada por 4 o más copias de Ub unidas en configuración cabeza a cola, o bien, como una proteína de fusión entre la Ub<sub>L40</sub> y la Ub<sub>S27</sub>, que son polipéptidos de fusión a proteínas ribosomales. En mamíferos se han encontrado 4 genes que codifican para Ub, dos de los cuales codifican precursores para la formación de poliubiquitina y otros dos que codifican las proteínas Ub<sub>L40</sub> y la Ub<sub>S27</sub>. Los dos genes que codifican para la poliubiquitina se denominan *ubb* y

*ubc*, los cuales expresan usualmente cuatro y nueve repetidos en tándem de Ub, respectivamente [86, 87].

La estructura cristalina de la Ub muestra una conformación globular compacta “tipo perla”, formada por  $\alpha$ -hélices y láminas- $\beta$  intercaladas. Por otro lado, en su estructura primaria cuenta con siete residuos de lisina (Lys), que le permiten establecer un enlace covalente denominado isopeptídico que da lugar a la ubiquitinación, y que se forma para la conjugación de una Ub con diversas proteínas blanco o con otra Ub. Este enlace se da a partir de que el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de la primer Ub, es capaz de interactuar con residuos de Lys N-terminal de la cadena lateral de proteínas blanco o de otra Ub. La formación de este enlace es dependiente de ATP [88, 89].

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona reversible, la cual está relacionada con múltiples procesos celulares, entre los que se encuentra la degradación y tráfico proteico (endocitosis y proteosoma), regulación de ciclo celular, reparación de DNA, apoptosis, transducción de señales y respuestas ambientales [87, 90]. Es importante señalar que la Ub funciona como una etiqueta específica pues, dependiendo de la posición de la lisina en donde se establezca el enlace isopeptídico, se determinará el proceso celular que se llevará a cabo. La poliubiquitinación específica en la Lys-48, Lys-11 o Lys-29, son señales muy bien estudiadas de marcaje para degradación mediada por proteosoma y que forman parte del denominado sistema ubiquitina-proteosoma de degradación intracelular (UPS) [86, 89, 91].

El proceso de poliubiquitinación de una proteína es multi-pasos y se lleva a cabo por la acción secuencial de cuatro enzimas denominadas enzimas ubiquitinadoras. El primer paso es la activación dependiente de ATP de la Ub por la enzima E1 (enzima activadora), a través de su residuo de Gly C-terminal. La enzima E1 transfiere a Ub al residuo de Cys de la enzima E2 (enzima acarreadora), y posteriormente E2 y el substrato blanco se unen por medio de la actividad de la enzima E3 (enzima ligasa), que induce la transferencia de Ub desde E2 al grupo amino de una lisina del substrato. Posteriormente, E2 y E3 se liberan. El ciclo de transferencia para más de una molécula de Ub a la primera de ellas unida al substrato, se lleva a cabo por estas mismas enzimas y adicionalmente una enzima E4. La especificidad de substrato está dada por las diferentes clases de enzima E3 (Fig. 3) [90, 91].



**Fig. 3. Sistema de conjugación de la ubiquitina y sistema ubiquitina-proteosoma.** Mecanismo de adición de Ub a proteínas sustrato. La adición de una cadena de poliubiquitina es considerada como el marcaje característico para la degradación por proteosoma de las proteínas. Modificado de Welchman, et al. (2005).

## PROTEOSOMA

El proteosoma se define como un complejo enzimático multicatalítico, proteolítico y de elevado peso molecular (2.5 MDa). Este se encuentra libre en el citoplasma, unido al retículo endoplásmico, a la membrana mitocondrial, en el núcleo y de manera extracelular. Su función es reconocer y degradar proteínas mal plegadas, sin plegar o en condiciones no nativas que se encuentren marcadas con una etiqueta de poliubiquitinación y es considerado la principal ruta de recambio y degradación proteínica no lisosomal (aproximadamente entre el 70% y el 90% de las proteínas intracelulares son degradadas por este sistema) [86, 91-95]. El proteosoma fue identificado por primera vez en 1969 a partir de membranas de fantasmas de eritrocitos, en donde utilizando microscopía electrónica de transmisión (MET) se pudo observar a un complejo proteico con estructura cuaternaria en forma cilíndrica, construido por cuatro anillos. El proteosoma está altamente conservado en el reino Eukarya y, formas más sencillas se identificaron en arqueas y en actinobacterias. Cabe destacar que un evento clave en la descripción del proteosoma fue su descubrimiento en la arqueobacteria *Thermoplasma acidophilum*, puesto que a partir de este microorganismo se encontró que las subunidades que conforman al proteosoma son ancestros de las de células eucariotas [96-101].

El proteosoma participa en procesos celulares fundamentales, incluyendo: apoptosis (ya sea de manera pro- o anti-apoptótica dependiendo del linaje celular y el estado proliferativo de la célula), proliferación, diferenciación, respuesta a estrés, eliminación de desechos y control de calidad de las proteínas recién sintetizadas, respuesta inmunológica mediante la presentación del antígeno al MHC-I (immunoproteosoma), inflamación, transducción de señales, reparación del ADN, control del ciclo celular (mediante la regulación de los inhibidores de las CDK) y metabolismo; además, su actividad puede estar regulada por factores ambientales, como el estrés oxidativo, las

modificaciones postraduccionales (fosforilación, N-acetilación, alquilación, N- miristoilación, entre otras) o las proteínas que interactúan con el proteasoma (chaperonas y deubiquitinasas) [91, 94, 102, 103].

En la actualidad, la desregulación de la actividad proteosomal se ha relacionado con procesos patológicos, principalmente en el desarrollo del cáncer, las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebrovascular), fibrosis quística, aterosclerosis, reumatismo, diabetes y enfermedades autoinmunes, entre otras patologías [91].

FUNCIONES FISIOLÓGICAS Y SUBSTRATOS SELECTOS DE LA VÍA UBIQUITINA- PROTEOSOMA	
FUNCIÓN	SUBSTRATO
Progresión del ciclo celular	p27Kip1, p21, ciclinas
Oncogénesis	p53, p27Kip1, bax, IκB
Apoptosis	Bcl-2, cIAP, XIAP
Regulación de la expresión génica	c- Jun, E2F1, IκB, β- catenina
Inflamación	IκB. P105, precursor de NF-κB
Memoria a largo plazo	Subunidad reguladora de la proteína cinasa A
Regulación de vías metabólicas	Ornitina descarboxilasa, HMG- CoA reductasa
Control de calidad proteico	CFTRΔF508, α1- antitripsina (variante Z), calmodulina
Regulación de ciclos circadianos	Timeless
Fotomorfogénesis en plantas	Hy5
Respuesta inmunológica	proteínas de señalización para presentación de antígeno, factores de transcripción de vías de activación inmune, reguladores de transcripcionales

Tabla 1. Substratos de la vía de ubiquitina- proteosoma. Tomado de Kisselev, et al. (2001).

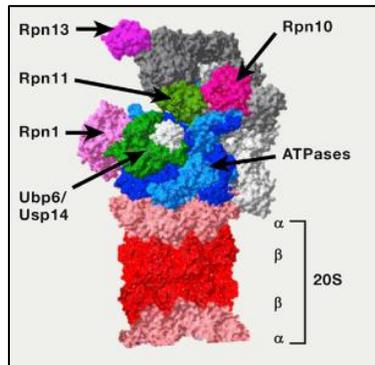
## PROTEOSOMA 26S

Se considera como el complejo más grande de la superfamilia de las ATP-asas, es decir, se trata de una proteasa intracelular dependiente de ATP, la cual es considerada un elemento central en el sistema de degradación UPS (Ubiquitin-Proteasome System) [96, 104]. Este se encuentra formada por dos subcomplejos:

- **Subunidad 19S (proteosoma 19S o PA700):** es el tipo de subunidad reguladora del proteosoma más estudiada. Corresponde a un complejo de múltiples subunidades proteicas, que incluye a enzimas de la familia de “ATPasas Asociadas con varias Actividades celulares” (AAA)<sup>+</sup> y a proteínas estructurales no ATPasas; éste es responsable del reconocimiento y desdoblamiento

de los sustratos (linearización), así como de su direccionamiento al poro central dentro del interior de la cámara proteolítica (Fig. 4) [95, 105-107].

- **Subunidad 20S:** es el núcleo catalítico, tiene forma cilíndrica y está conformado por cuatro anillos, dos exteriores con siete subunidades  $\alpha$  estructurales y dos al interior con siete subunidades  $\beta$ , en las que residen los centros de actividad enzimática en la cámara central del mismo (Fig. 4) [95, 96, 105, 106].



**Fig. 4. Proteosoma 26S.** Representación esquemática del proteosoma 26S, conformado por el proteosoma 19S y el núcleo catalítico 20S. Tomado de Collins, et al. (2017).

## PROTEOSOMA 19S

También conocida como Partícula Reguladora (RP, por sus siglas en inglés), funcionalmente es dependiente de ATP, tiene un peso molecular de 700 kDa y comprende 19 subunidades que se encuentran clasificadas en proteínas de base y tapa (Fig. 5), las cuales están presentes en forma estequiométrica, es decir que se encuentra la misma cantidad de cada subunidad por complejo. Este se puede encontrar flanqueando al núcleo del proteosoma 20S en ambos extremos (formación simétrica) o solamente en uno de ellos (formación asimétrica) [93, 108].

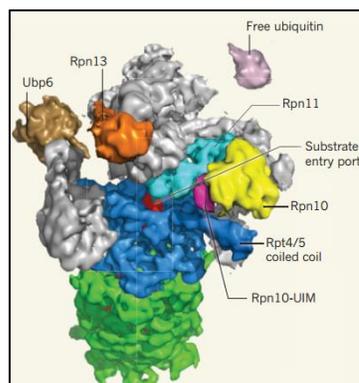
El ensamblaje en la parte de la base comprende a seis ATPasas (Rpt 1-6, parálogas a ATPasas AAA+ que forman un anillo heteroexamérico), las dos subunidades más grandes del complejo Rpn1 y Rpn2 (100 kDa) y los receptores de ubiquitina Rpn10 y Rpn13. En la tapa, se encuentran nueve subunidades (Rpn3, 5-9, 11, 13 y 15), de las cuales solo Rpn11 presenta actividad enzimática de tipo desubiquitinizante [95]. Además, estructuralmente la base y la tapa se encuentran conectadas entre sí a través de Rpn10 [109]. Las ATPasas cuentan con un dominio N-terminal “coiled-coil”, el cual permite el desdoble de las proteínas sustrato, un dominio central de unión a oligonucleótido y un cassette C-terminal de AAA ATPasa. Este anillo de ATPasas contacta directamente con la superficie

de las subunidades alfa del centro proteolítico (20S), controlando la apertura del poro de acceso al mismo [96].

Las subunidades Rpn13 y Rpn10 se unen directamente a la Ub a través de sus dominios asociados a Ub (UBA) funcionando como receptores para las cadenas de poli-Ub en las proteínas marcadas para degradación y enviándolas al núcleo a través de interacciones de sus dominios UBL (Ub-like) con la subunidad Rpn1; aunque se han identificado adicionalmente a proteínas como son UBA-UBL, Rad23, Dsk2 y Ddil [93, 96].

La base de cómo se determina que proteínas se van a degradar y cuales se conservan, es la habilidad del proteosoma para reconocer a la cadena de Ub y a una región de pérdida de plegamiento en la proteína blanco. Este mecanismo está dado en dos pasos:

- Un paso inicial, el cual es reversible y en el que la cadena de Ub se une con cierta afinidad a los receptores del complejo 19S [110].
- Un segundo paso, donde ocurre una unión subsecuente más fuerte en la que se involucra la estructura de la proteína ubiquitinada y que requiere la hidrólisis de ATP [110]. Al unirse esta última molécula al dominio de ATPasa de Rpt2, se generan cambios conformacionales en las porciones C-terminales de Rpt1, Rpt2 y Rpt5, conformando el arreglo Rpt-HbYX que interactúa con las colas N-terminales del complejo catalítico 20S, particularmente de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ , que finalmente abren el espacio para el paso de la proteína a degradar [109].



**Fig. 5. Conformación estructural del proteosoma 19S.** Tomado de Tian, et al. (2012)

## PROTEOSOMA 20S

El proteosoma 20S (partícula núcleo o partícula catalítica) es un complejo de proteasas alargado, en forma de cilindro hueco, con un peso molecular de 700 kDa, una longitud de 15 nm y un diámetro de 11 nm y representa el 1% del total de las proteínas celulares [93, 111].

El complejo está formado por 28 subunidades proteicas codificadas en mamíferos a partir de 14 genes diferentes, las cuales tienen un peso molecular que va en el rango de los 20 a los 35 kDa y con un amplio espectro de puntos isoeléctricos (de 4.5 a 8.7). Las subunidades se encuentran acomodadas en cuatro anillos heteroheptaméricos axiales de simetría  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ; cada anillo de los extremos consistente de siete subunidades  $\alpha$  y los anillos centrales poseen siete subunidades  $\beta$ . Estas subunidades muestran un plegamiento similar, a pesar de que su secuencia primaria es muy diferente, permitiendo una conformación tipo sándwich en la que dos construcciones de cinco cadenas de láminas  $\beta$  antiparalelas están flanqueadas por laminas helicoidales, tanto en la parte superior como en la inferior [95, 96, 98].

Las subunidades tipo  $\alpha$  carecen de actividad enzimática y su papel en el complejo es estructural, sirviendo además como andamiaje en el ensamble y como centro de interacción a las proteínas reguladoras del mismo. La actividad catalítica de este núcleo se encuentra en las subunidades tipo  $\beta$ , específicamente  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_5$ . Estas subunidades se encargan de la ruptura de proteínas sustrato en residuos de aminoácidos específicos en cada una de ellas. Cabe resaltar que, en el caso de los mamíferos, se han estudiado a cuatro subunidades  $\beta$  adicionales:  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$ ,  $\beta_{5i}$  y  $\beta_{5t}$ , en donde i y t corresponden al inmuno y timo proteosoma, respectivamente. Estas subunidades se expresan en tejidos del sistema inmunológico y se presentan en caso de que exista un estímulo en particular (interferón- $\gamma$ ), en el que los péptidos generados por el procesamiento catalítico son cargados a moléculas del MHC-I para su presentación a células T asesinas (inmunoproteosoma) o para ampliar el repertorio de péptidos propios para la selección positiva, durante el desarrollo de las células T en el timo (timoproteosoma) [96].

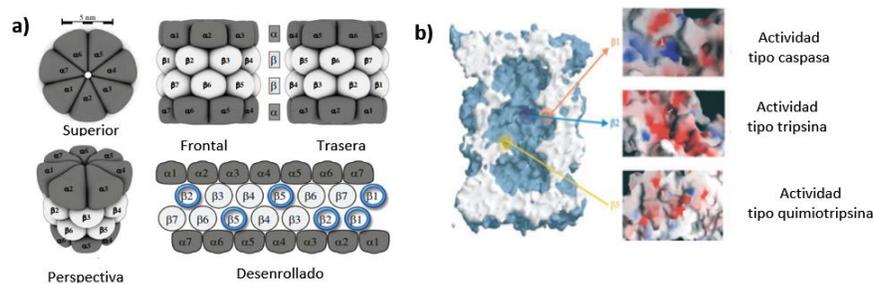
La apertura de la cámara hidrolítica en el proteosoma 20S de eucariontes se encuentra fuertemente regulada por cada subunidad  $\alpha$  que conforma los anillos estructurales, las cuales proyectan sus porciones N-terminales hacia el poro del núcleo catalítico formando varias láminas de bloqueo para el paso del sustrato. La activación de este complejo es dependiente de un motivo YDR presente en todas las subunidades  $\alpha$ , así como de la interacción de los aminoácidos Asp9 de la subunidad  $\alpha_3$  enlazado por puente de hidrogeno con los aminoácidos Tyr8 y Arg10 de la subunidad  $\alpha_4$ , los cuales

al unirse con las subunidades de la partícula regulatoria 19S, generan un re-arreglo estructural y la apertura del poro de la cámara hidrolítica del proteosoma 20S [109].

## ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DEL PROTEOSOMA 20S

Las subunidades catalíticas que forman parte del proteosoma 20S son proteasas identificadas como parte del grupo Ntn (hidrolasas nucleófilo N-terminal), las cuales presentan un residuo de treonina N-terminal que está ubicado en la cara interna de la cavidad y que actúa como el centro nucleofílico de la hidrolasa, degradando las proteínas de una manera independiente de ATP [93, 112]. Esta degradación depende de la presencia, accesibilidad, longitud y composición aminoacídica de la región no estructurada de la proteína blanco, de esta forma los polipéptidos son procesados en pequeños péptidos que van desde los 4 a los 25 residuos, con un promedio de longitud de 7 a 9 residuos [113, 114].

El proteosoma 20S presenta tres diferentes actividades catalíticas principales: tipo quimi tripsina, tipo tripsina y tipo peptidil-glutamil-peptidasa o caspasa; adicionalmente, se han encontrado actividades con preferencia a aminoácidos en cadena ramificada y aminoácidos neutros pequeños. La subunidad  $\beta 1$  se encuentra asociada a la actividad de tipo caspasa, contiene una arginina en la posición 45 de su “pocket” de especificidad y actúa preferentemente sobre residuos de aminoácidos ácidos (glutamato, principalmente), pero también muestra una actividad mínima sobre aminoácidos en cadena ramificada. La subunidad  $\beta 2$  cuenta con actividad de tipo tripsina y en su “pocket” de especificidad se ha descrito la presencia de un residuo de glicina 45; esta actúa sobre aminoácidos de carácter básico. La actividad tipo quimi tripsina se encuentra en la subunidad  $\beta 5$ , caracterizada por la presencia de una metionina en la posición 45 del “pocket” de especificidad, actúa sobre aminoácidos hidrofóbicos pero, además, cuenta con dos actividades alternas con preferencia a aminoácidos en cadena ramificada y a aminoácidos neutros pequeños (Fig. 6) [98, 105, 108].



**Fig. 6. Proteosoma 20S.** a) Organización de las subunidades en el proteosoma 20S de mamíferos. Tomado de Jung, T., et al. (2009). b) Disposición de los centros catalíticos en el núcleo del proteosoma 20S. Tomado de Groll, et al. (2005).

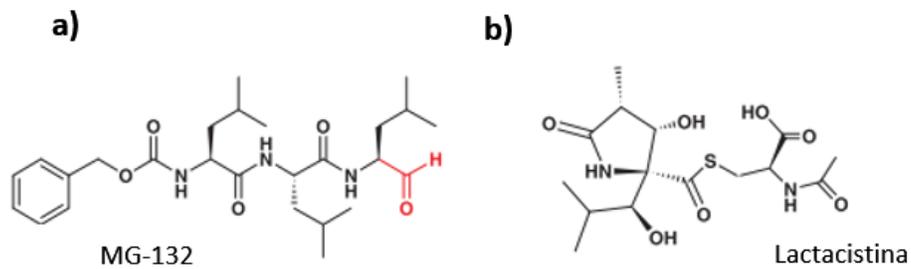
## INHIBIDORES DE PROTEOSOMA

Actualmente, existe una gran variedad de compuestos tanto naturales como sintéticos, que han probado su eficacia inhibiendo o modulando la actividad del proteosoma. Estos inhibidores se pueden clasificar dentro de siete grupos dependiendo del tipo de farmacóforo: aldehídos, vinil-sulfonas, vinilamidas, boronatos,  $\alpha'$ ,  $\beta'$ - epoxicetonas,  $\alpha$ - cetoaldehídos y  $\beta$ - lactonas [115]. Para el desarrollo experimental de este trabajo se utilizaron dos inhibidores específicos: MG132 (del grupo de los aldehídos) y lactacistina (del grupo de las  $\beta$ -lactonas).

El MG-132 es un péptido sintético que forma parte de los inhibidores aldehídos, su estructura primaria es Z-Leu-Leu-Leu-al. Es un sustrato análogo del estado de transición del proteosoma, lo que lo vuelve un potente inhibidor; su actividad es reversible y solo son necesarias cantidades nanomolares para que lleve a cabo su función ( $IC_{50}$  micromolar en cultivos celulares). Su actividad de inhibición sigue un mecanismo en el cual éste reacciona con los grupos catalíticos hidroxilo o tioles en los sitios activos de las enzimas proteolíticas blanco, de esta forma se genera un compuesto reversible hemi(tio)acetal, el cual propiamente es un análogo al estado de transición de reacción de las proteasas con su sustrato [116, 117]. Experimentalmente se ha caracterizado que este inhibidor tiene la capacidad de actuar sobre todas las subunidades catalíticas del proteosoma, aunque bloquea de manera muy importante y mucho más específica la actividad de la subunidad  $\beta 5$  (actividad tipo quimiotripsina). Adicionalmente se conoce que este inhibidor no solamente actúa a nivel de proteosoma, sino que tiene actividad sobre proteasas lisosomales y dependientes de calcio (Fig. 7) [117, 118].

Por otra parte, la lactacistina y su derivado la clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona son productos naturales aislados originalmente de los actinomicetos (*Streptomyces* sp.) y son mucho más específicos que los compuestos aldehídos. Estructuralmente, la lactacistina consiste en dos  $\alpha$ -aminoácidos llamados (*R*)-*N*- acetilcisteína unidos a través de un enlace tioéster a un ácido piroglutámico  $\alpha$ -sustituido. Su mecanismo de acción se da al actuar como un pseudo-sustrato que se une de manera covalente e irreversible, principalmente a la subunidad  $\beta 5$ , inhibiendo de forma muy eficiente la actividad de tipo quimiotripsina; mientras que las actividades de tripsina y caspasa se bloquean, pero en menor proporción. El mecanismo de acción de este compuesto se da a través de una reacción de acilación que involucra el ataque electrofílico por parte del grupo carbonil C-4 dentro de la estructura del anillo de  $\beta$ -lactona presente en la clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona (producto activo), el cual al abrirse reconoce a la treonina N- terminal que forma parte del centro activo del sitio catalítico de la subunidad  $\beta 5$  del proteosoma, provocando una modificación covalente del sitio activo y causando

su inactivación. Se ha demostrado que la lactacistina reacciona únicamente con la treonina (T1) en la parte N-terminal de las subunidades  $\beta$  del proteosoma, y no muestra actividad de inhibición en contra de otras serina proteasas, cisteína proteasas o metaloproteasas [116, 117, 119].



**Fig. 7. Estructura química de inhibidores del proteosoma 20S. a)** MG-132, inhibidor del grupo de los aldehídos. **b)** Lactacistina, inhibidor natural del proteosoma 20S. Tomado de Kisselev, et al. (2001).

## ANTECEDENTES DIRECTOS

### PROTEOSOMA EN PROTOZOARIOS

En la actualidad, el proteosoma se presenta como un blanco terapéutico prometedor en diferentes patologías como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunidades, y en padecimientos que involucran protozoarios parásitos como agentes etiológicos. De esta manera, al ser el proteosoma un moderador del funcionamiento de procesos como el ciclo celular, el crecimiento celular y la transcripción de genes estado-específicos; su identificación, caracterización y posible inhibición representan una posibilidad de control de la proliferación, diferenciación y virulencia de estos microorganismos [91, 120, 121]. Por su importancia para este trabajo, a continuación, revisamos lo que se conoce de los proteosomas de protozoarios parásitos.

*Giardia lamblia* es un protozooario parásito amitocndriado utilizado como modelo de ancestro común para el estudio de la evolución de los eucariontes, además de ser el agente causal de la giardiasis, una patología intestinal en el ser humano. En *G. lamblia* se ha logrado la identificación, purificación y caracterización estructural del proteosoma. A través de MET, se identificó la forma característica de barril del complejo 20S además, utilizando ensayos de Western blot con un anticuerpo monoclonal dirigido a las subunidades  $\alpha$ , se encontraron bandas que aparecen entre los pesos correspondientes a estas proteínas (entre 23 y 33 kDa), lo que se confirmó utilizando SDS-PAGE bidimensional en el que se identificaron 14 señales con puntos isoeléctricos correspondientes a las subunidades del proteosoma (5.1 a 7.0). Estos hallazgos indican que este protozooario, a pesar de su distancia evolutiva con los eucariontes de aparición más reciente cuenta con un proteosoma 20S de la misma complejidad. Además, se determinó la presencia de una subunidad  $\alpha_3$  específica de este complejo y su presencia durante el enquistamiento [122, 123].

*Tritrichomonas foetus* es un protozooario patógeno de interés veterinario y económico, pues es el agente causal de la trichomonosis bovina y felina; además ha servido de modelo para el estudio de algunos mecanismos de la biología celular del patógeno humano *Trichomonas vaginalis*, causante de la infección sexual no viral más importante. De manera reciente, el proteosoma de *T. foetus* fue identificado primeramente utilizando análisis bioinformáticos en los que se encontraron proteínas homólogas a las 14 subunidades proteosomales, lo que sugiere que este complejo es similar al de la mayoría de las células eucariontes. Además, utilizando ensayos de inmunofluorescencia se determinó su localización intracelular en las dos fases que presenta este parásito (trofozoíto y piriforme), encontrándolo principalmente en el citoplasma y de forma perinuclear. En la

caracterización de la actividad proteosomal utilizando sustratos fluorogénicos acoplados a péptidos específicos para cada una de las actividades catalíticas, se encontró que, a diferencia de las células eucariontes superiores y en común con lo reportado para algunos parásitos, la principal actividad de este complejo en *T. foetus* es de tipo caspasa. Además, por MET se observó la conformación de “barril” que es típica en el proteosoma y por Western blot utilizando anticuerpos contra el proteosoma de *Trypanosoma cruzi*, se identificaron proteínas de peso molecular de entre 22 a 32 kDa. En el mismo estudio se encontró que al inhibir la actividad proteosomal utilizando lactacistina a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  o superiores hubo una disminución en el crecimiento de la población de trofozoítos, quedando el ciclo celular arrestado entre las fases de G2/mitosis, de acuerdo con los análisis por citometría de flujo. De igual manera, se reportó menor número de flagelados bajo condiciones de inducción y se describieron cambios morfológicos a nivel ultraestructural, tales como el alargamiento del retículo endoplásmico y algunas alteraciones en la membrana; lo que sugiere que el proteosoma es parte de la maquinaria relacionada con la proliferación, estructura y diferenciación de *T. foetus* [124]. El papel del proteosoma dentro de estos procesos celulares fue confirmado al tratar trofozoítos con gliotoxina, que es una epipolihidrodioxopiperazina resultante del metabolismo de algunos hongos (*Aspergillus* sp. y *Candida* sp.) y que ha sido utilizada como inhibidor alostérico no competitivo del proteosoma. Adicionalmente, se observó que se inducía muerte celular y una transformación irreversible a la fase piriforme [125].

Por otro lado, el proteosoma en *T. vaginalis* ha sido estudiado a través de la co-incubación de trofozoítos con una batería de inhibidores específicos (como el bortezomib, ixazomib, delanzomib, epoxomicin, carfilzomib, oprozomib y MG-132), resultando en una disminución significativa de la viabilidad y crecimiento de estos protozoarios. Al purificarlo y realizar el análisis proteómico se pudieron identificar las siete subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma 20S, las cuales por análisis bioinformático demostraron una identidad de entre el 28 al 52% con las de humano y se determinó, utilizando ixazomib que las actividades de quimiotripsina y caspasa son las primordiales. Adicionalmente, al realizar estudios *in vivo* en el modelo murino utilizando trofozoítos de *T. foetus*, se encontró que la administración de ixazomib intravaginal (4.3  $\mu\text{M}$ ) fue efectiva en la reducción y eliminación de la infección, sugiriendo que el proteosoma 20S puede ser un blanco terapéutico efectivo para el tratamiento de la trichomonosis [126].

*Entamoeba histolytica* es el protozoario parásito, agente etiológico de la amibiasis, considerada la tercera causa de muerte por parásitos a nivel mundial. En *E. histolytica* ha sido ampliamente

descrito, en diversos trabajos, la presencia del proteosoma. Inicialmente, fueron identificados y purificados dos complejos proteicos con actividad catalítica tipo proteasa, de elevado peso molecular y con diferentes coeficientes de sedimentación (11S y 20S). Se determinó que el segundo de estos (20S) se encontraba compuesto por subunidades que pudieron ser identificadas utilizando anticuerpos para el proteosoma de rata y de otros microorganismos (*T. acidophilum*, *Dictyostelium discoideum*), en ensayos de Western blot [127]. Por otro lado, debido a que la actividad del proteosoma está involucrada en los cambios de fase de otros microorganismos; se estudió su participación en el enquistamiento de *E. invadens*, la cual es una amiba del mismo género, parásito de reptiles y que ha sido utilizado ampliamente como modelo de enquistamiento de *E. histolytica*, pues ésta no se ha logrado enquistar experimentalmente. En este estudio, los trofozoítos de *E. invadens* se sometieron a condiciones de enquistamiento por 60 h en presencia de los inhibidores lactacistina y MG132; así se encontró que de manera específica la lactacistina (10  $\mu$ M) disminuía la cantidad de quistes formados. Posteriormente, se purificó el proteosoma de los trofozoítos por centrifugación diferencial y fraccionamiento secuencial en columnas cromatográficas; las fracciones recuperadas fueron sometidas a ensayos de actividad catalítica, electroforesis 2D y se realizó MET. Con estos resultados se comprobó la presencia y la actividad del proteosoma en los trofozoítos de *E. invadens*, además de su participación en los procesos de diferenciación en el ciclo de vida de las amibas del género *Entamoeba*, de manera similar a lo reportado en otros parásitos [128]. En otros estudios se identificó la localización subcelular del proteosoma de *E. histolytica* usando microscopia confocal, utilizando anticuerpos específicos que reconocen a una subunidad  $\alpha$  presente en el complejo 20S (Eh $\alpha$ S) y contra la proteína del complejo regulador EhS2. En esta amiba el proteosoma se encuentra exclusivamente en el citoplasma, a diferencia de lo encontrado en otros protozoarios. Esto fue confirmado realizando fraccionamiento celular y Western blot, en los que solo se obtuvo reconocimiento en los extractos citosólicos de los trofozoítos [129]. En reportes más recientes, se realizaron ensayos de proliferación co-incubando trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens* en presencia de inhibidores del proteosoma. Los autores reportaron que esto afectaba negativamente el crecimiento en ambas especies. Por otra parte, en los ensayos de enquistamiento de *E. invadens* se corroboró el efecto de la inhibición al disminuir el número de quistes obtenidos. De manera interesante se encontró que esto no afectaba el desenquistamiento. Por otro lado, utilizando MET se observó que los trofozoítos de *E. histolytica* tratados con los inhibidores, almacenaban un mayor número de gránulos de glicógeno en el citoplasma, lo que sugiere que el proteosoma pudiera estar relacionado con el metabolismo en este parásito. En este estudio se identificó que en este género la mayor actividad proteolítica en el proteosoma es de tipo tripsina, de manera moderada de tipo caspasa y en menor medida de tipo quimiotripsina [130]. Tal como se mencionó en las generalidades

del proteosoma, el complejo 26S cuenta con partículas reguladoras similares a las descritas en células de mamíferos y protozoarios. Así, utilizando información proveniente de una librería de cDNA, se encontró a la proteína reguladora homóloga a la subunidad no-ATPasa S2 (EhS2), conocida previamente en levaduras y humanos, en los trofozoítos de *E. histolytica* [131].

Del grupo de las amibas de vida libre de importancia médica, solo existen reportes del proteosoma de *A. castellanii*. En estudios recientes, se encontró que de un grupo de diferentes clases de inhibidores específicos para el proteosoma (lactacistina 10  $\mu$ M,  $\beta$ -lactona 10  $\mu$ M, MG-132 100  $\mu$ M y bortezomib 100  $\mu$ M), únicamente el bortezomib afectó de manera significativa el crecimiento en cultivo de esta amiba. Además, al realizar ensayos de enquistamiento y desenquistamiento en presencia de los inhibidores se determinó que todos, excepto el MG-132, afectan el proceso de enquistamiento de manera significativa; no así para el caso del desenquistamiento en el que son la lactacistina y la  $\beta$ -lactona los que mostraron actividad. Este hallazgo es importante, debido a que la capacidad de *A. castellanii* de realizar este cambio de fase, es uno de los problemas para el tratamiento y eliminación de las infecciones causadas por esta amiba; por lo tanto el efecto de los inhibidores del proteosoma sobre la capacidad de diferenciación de esta amiba, incide en el desarrollo de fármacos eficaces que eviten la formación de fases de resistencia de la amiba en el hospedero y de esta manera, quizás en sinergia con otras moléculas terapéuticas, logren la eliminación completa de la forma de trofozoíto de este patógeno del tejido del hospedero. En este mismo estudio se llevaron a cabo ensayos que involucraron mecanismos de patogenicidad, tales como la adhesión, la cual no se afectó al incubar trofozoítos de *A. castellanii* con una monocapa de células HBMEC (células endoteliales de microvasculatura cerebral humana) en presencia de los inhibidores del proteosoma. Para la actividad proteolítica se realizaron zimogramas, con los medios condicionados recuperados de trofozoítos incubados en los diferentes inhibidores y utilizando como substrato gelatina, observando que solamente con el bortezomib se encontraban cambios en el patrón proteolítico, particularmente en las bandas correspondientes a 130 kDa y 150 kDa, las cuales desaparecen en presencia de este inhibidor y disminuyen con lactacistina y  $\beta$ -lactona. Finalmente, se determinó la citotoxicidad en las células blanco en contacto con el microorganismo, utilizando ensayos de LDH, de los cuales se concluyó que la capacidad citotóxica de la amiba no se ve afectada por la presencia de los inhibidores del proteosoma [132].

El papel del proteosoma y de la maquinaria del sistema UPS en el cambio de fase de *A. castellanii* fue reportado en un estudio *in vitro* en donde se determinaron algunos de los factores mediadores del enquistamiento. Como resultado, se encontró un aumento en la expresión de genes de las

subunidades  $\alpha$  del proteosoma 20S, de la enzima conjugadora de ubiquitina y de proteínas estabilizadoras del complejo 20S (proteínas con dominio PCI), durante la diferenciación y en el quiste [133].

En *Dictyostelium discoideum*, un mixomiceto social y modelo de diferenciación celular, se ha identificado, purificado y caracterizado el proteosoma 20S. Utilizando SDS-PAGE 2D, los autores encontraron 13 puntos con peso molecular de 25 a 31 kDa y con PI de 5.1 a 7.9, que corresponden a lo reportado para otros proteosomas en eucariontes. Realizando inmunomarcajes visualizados por MET, se encontró que este proteosoma mantiene la simetría C2, es decir, está compuesto por 2 mitades de conformación idéntica en los extremos (anillos  $\alpha$ ) y en el centro (anillos  $\beta$ ); además, por microscopía confocal se localizó de manera muy evidente en el núcleo y en menor cantidad en el citosol. Finalmente, se identificó la tipo quimiotripsina, como la principal actividad proteolítica en el proteosoma de *D. discoideum* [134]. Adicionalmente, se identificó en *D. discoideum* la presencia de la partícula reguladora del proteosoma REGY; ésta solo había sido descrita en metazoarios y en *Trypanosoma brucei*, un activador similar denominado PA26. REGY se acopla únicamente al proteosoma 20S cuando se encuentra a nivel nuclear, y genera una degradación de tipo ATP y Ub independiente, lo que correlaciona con la elevada presencia de este complejo a nivel nuclear en *D. discoideum*. Además, se encontró que la presencia de esta partícula modifica la actividad catalítica principal del complejo, siendo entonces la de tipo tripsina la más estimulada, aunque la actividad de quimiotripsina se mantiene [135].

En *L. mexicana*, se logró determinar que la estructura del proteosoma es de la misma complejidad que el de eucariontes superiores y otros protozoarios al identificarse, por western blot, al menos 10 bandas de peso molecular entre 22 y 32 kDa, con PI entre 4 y 6.5. Además, se encontró que su principal actividad catalítica es la de tipo quimiotripsina, y que ésta es susceptible a la inhibición por lactacistina y MG-132; siendo este último compuesto el que afecta su proliferación [136]. De igual manera, se logró purificar y caracterizar el proteosoma 20S de *L. chagasi*. Para este parásito la principal actividad catalítica descrita es la de tipo tripsina, la cual también es susceptible a la lactacistina. Esta inhibición afectó de manera significativa la proliferación del promastigote e impactó negativamente en su sobrevivencia intracelular en macrófagos [137]. En *L. major*, el proteosoma 20S participa en la regulación de proteínas de su ciclo celular (LmjKIN13-1), y en la degradación de algunas enzimas metabólicas (pteridina reductasa, PTR1 o la metionina adenosiltransferasa, MAT) [138]. Finalmente, se han realizado trabajos en los que se propone a las subunidades  $\alpha$  del proteosoma de *L. donovani* como candidatos viables al desarrollo de vacunas de

ADN, al mostrar efectos protectores significativos en los ensayos *in vivo* con el modelo murino de la infección [139].

El género *Trypanosoma* es aquel donde más se ha estudiado la presencia y participación de proteosoma 20S en parásitos en busca de posibles blancos terapéuticos. En *T. cruzi*, este complejo se describió bajo condiciones desnaturalizantes con un peso de 670 kDa, conformado por subunidades de 25-35 kDa y un PI de 4.5 a 8.5. Por MET se observó la conformación típica de barril del complejo y se determinó la presencia de las tres actividades catalíticas principales, siendo la de tipo quimiotripsina la más importante. Adicionalmente, en diferentes trabajos describió la participación del proteosoma en la proteólisis necesaria para la diferenciación de fases y en la metaciclogénesis de este parásito [140-142].

Por otro lado, para *T. brucei* también se describió la presencia del proteosoma 20S. Este se encuentra conformado por subunidades que van de los 23 a 34 kDa con PI de 4.5 a 7. Su actividad principal, a diferencia del proteosoma de otros eucariontes, es la de tipo tripsina, seguida de la de tipo quimiotripsina y una casi nula actividad tipo caspasa. La estructura de estos proteosomas es la típica de este complejo y su actividad catalítica es fundamental en la regulación y progresión del ciclo celular, en sus fases tanto sanguíneas como procíclicas, aunque en cada una de estas aparentemente, el rango de actividad es variable. Adicionalmente, se ha descrito también la presencia del proteosoma 26S completo, con un peso molecular de 630 kDa, conformado por 26 subunidades y, de manera muy interesante la presencia de genes que codifican para una partícula reguladora del complejo catalítico exclusivamente de localización nuclear, que únicamente había sido descrita en metazoarios, denominada REGY. Esta fue nombrada PA26 en este protozoario y se determinó que la forma dominante en la que se presenta el proteosoma en *T. brucei*, es el núcleo 20S acoplado a ésta [143-147].

*P. falciparum* es otro protozoario en donde se purificó y caracterizó el complejo del proteosoma 26S. Recientemente, a través de crio-microscopía electrónica de alta resolución se determinó la estructura completa de este complejo acoplada a un inhibidor específicamente sintetizado para este protozoario, aprovechando las diferencias en preferencia de sustratos para la actividad catalítica en comparación con el proteosoma en humano. A partir de estos estudios, se pudo determinar que este proteosoma tiene la estructura de barril bien descrita para este complejo, pero que de manera muy interesante la subunidad  $\beta 2$  que resulta la más activa reportada como de tipo tripsina, también posee la capacidad de acoplar en su centro catalítico residuos hidrófobos. Existen múltiples estudios con relación a los efectos de diferentes clases de inhibidores del proteosoma (lactacistina y clasto-

lactacistina-  $\beta$ - lactona del grupo de las  $\beta$ - lactonas; LLL-vs, WLL-vs, LLW-vs, WLW-vs del grupo de las vinyl sulfonas, carfilzomib del grupo de los boronatos y PR3 del grupo de las epoxyketonas) en *P. falciparum*. En todos ellos se ha podido concluir que la co-incubación resulta en una disminución en la proliferación en todos los estadios del ciclo de vida en sangre del parásito, incluso en periodos cortos de tiempo de interacción [148-150]. Adicionalmente, se realizó la caracterización de las proteínas con las que interactúa el proteosoma de *P. falciparum*. En este estudio se determinó que este complejo catalítico se relaciona con la maquinaria proteica relacionada al mantenimiento de la regulación redox en el parásito, glicólisis, interacción huésped-parásito al incidir directamente sobre la diferenciación a las fases intracelulares y en su capacidad invasiva a los eritrocitos, del plegamiento y control de calidad proteico y complejos ribosomales, entre otras. Además, se reportó la presencia del sistema completo del complejo activador del proteosoma 19S, así como las enzimas ubiquitinizantes y desubiquitinizantes correspondientes. Finalmente, se propone que las diferencias encontradas entre el proteosoma de este parásito y el del humano pueden ser aprovechadas para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos, además de ser una opción contra el fenotipo resistente a fármacos [151]. En *P. chabaudi*, la especie modelo para el estudio de la malaria en roedores, recientemente se identificaron las proteínas sustrato de la modificación post-traducciona de poliubiquitinación en lisina 48 (Lys 48) que marca específicamente para reciclamiento por proteosoma. Estas proteínas fueron reconocidas en cada una de las fases intraeritrocíticas del parásito (esquizonte, trofozoito y anillo), siendo la de esquizonte la que presentó mayor cantidad de proteínas marcadas con PoliUb-Lys48. Además, se determinó cuáles eran las proteínas marcadas exclusivamente en cada una de estas fases y se encontró que, en los trofozoítos y anillos, la mayoría está relacionada con el proceso de invasión; mientras que, en el esquizonte con el metabolismo de ácidos nucleicos, glicólisis y biosíntesis de proteínas. De esta manera, se sugiere la participación del complejo del proteosoma regulando el ciclo de vida del parásito, especialmente en las fases invasivas [152].

En *Toxoplasma gondii* se identificó la presencia del proteosoma 20S, compuesto por subunidades que van de los 29 a los 32 kDa y se determinó que, a diferencia de otros protozoarios y de células eucariontes superiores, éste se encuentra restringido espacialmente al citoplasma y no se encontró dentro del núcleo. Además, se caracterizó que su actividad catalítica primordial es la de tipo quimiotripsina. A través del uso de lactacistina, se identificó que su actividad está relacionada con la proliferación, la citocinesis y en la síntesis de DNA. Los autores encontraron que la incubación con este compuesto generaba alteraciones ultraestructurales, a nivel de retículo endoplásmico rugoso y la presencia de material denso en forma de parches en el citoplasma y núcleo [153, 154].

En el caso del género *Naegleria*, el único antecedente que existe es un estudio en el que se examinó la expresión diferencial de genes que pueden estar relacionados con la patogenicidad y la adaptación al hospedero que presentan los trofozoítos de *N. fowleri*, en comparación con la especie no patógena *N. gruberi* y con trofozoítos de la cepa patógena, recién recuperados de cerebro de diferentes pases sucesivos por ratón. De esta manera se identificó, utilizando hibridación por dot blot en 480 clonas de cDNA de *N. fowleri* escogidas al azar con sondas específicas de cDNA de *N. fowleri* o de *N. gruberi*, 95 clonas que presentaban una señal de hibridación diferencial. Posteriormente, se realizaron diferentes ensayos de Northern blot, que permitieron descartar señales que no fueron relevantes y finalmente, se obtuvieron 32 clonas que mostraban una señal mayor con sondas de cDNA de *N. fowleri*, en comparación con la que presentaban con el de *N. gruberi*. Estas 32 clonas corresponden a la señal de los trofozoítos obtenidos a partir de cultivos axénicos. Además, se decidió realizar 3 pases sucesivos de los trofozoítos por cerebro de ratón, recuperar las amibas de cada pase y asilar el RNA total de todos ellos, así como de trofozoítos de *N. fowleri* axénicos y de *N. gruberi*, que posteriormente fueron hibridados con las 32 clonas de inicio que mostraron diferencias entre las especies. De esta manera, se encontraron por Northern blot, 22 clonas de cDNA que mostraron mayor señal con las muestras de RNA total de *N. fowleri* en comparación con *N. gruberi* y de estas 22, únicamente 2 clonas mostraron diferencias, dependiendo del número de pase por ratón del que se tratará y en comparación con los cultivos axénicos. A través, del análisis bioinformático, utilizando el algoritmo BlastX en la información de la secuenciación de estas 22 clonas, se encontró que 16 de ellas no mostraron homologías con secuencias proteicas conocidas, sin embargo, las seis restantes correspondían a las proteínas: Ub, la proteína L7 relacionada con la subunidad ribosomal 60S, enzimas como la fumarasa y la malato deshidrogenasa, una proteína del grupo de alta movilidad (HMG) y una subunidad del proteosoma 26S. Es importante destacar que, en particular, las proteínas HMG y la subunidad del proteosoma 26S, también corresponden a las 2 clonas que mostraron un aumento en la hibridación dependiente del número de pase, es decir, relacionadas con un aumento en la virulencia de la amiba. De esta manera, al encontrar durante el experimento diferencias en las señales de hibridación entre las especie patógena y no patógena para el caso de la Ub, así como entre los pases sucesivos de la amiba en el caso de la subunidad del proteosoma 26S, se concluyó que es probable que el sistema UPS (que comprende al proteosoma) esté participando en el reciclamiento y eliminación de las proteínas que se requieren tanto para regular la virulencia de *N. fowleri*, al ser mayor su expresión en la especie patógena en comparación con *N. gruberi*, así como en el establecimiento y en la adaptación al hospedero, al ser aún mayor su expresión dependiente del número de pase por el cerebro [155].

## JUSTIFICACIÓN

El proteosoma 20S es un complejo proteico multi-catalítico considerado la vía más importante de degradación intracelular no lisosomal de proteínas de vida media corta, el cual está directamente relacionado con el mantenimiento de la homeostasis celular. En protozoarios, el proteosoma es un factor clave en la regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación a estadios de resistencia o invasivos y, de manera muy importante, modula la virulencia en el caso de las especies patógenas. Por otra parte, el género de amibas de vida libre *Naegleria* abarca especies como *N. gruberi*, una amiba no patógena, y *N. fowleri*, la única especie patógena del género para el humano.

Hasta el momento, en el género *Naegleria* no se ha descrito al proteosoma 20S o alguna subunidad que lo conforme, y se desconoce su actividad catalítica y los procesos biológicos en los que podría estar participando. Por lo tanto, la identificación y caracterización del proteosoma 20S, tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*, permitirá establecer su presencia y función, así como si existen diferencias respecto al proteosoma de células eucariontes superiores.

## HIPÓTESIS

*N. fowleri* y *N. gruberi* cuentan un complejo catalítico de degradación de proteínas intracelulares que corresponde al proteosoma 20S. Este se encuentra conformado por subunidades estructurales de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  y por las tres subunidades catalíticas de tipo  $\beta$ , las cuales tienen las actividades descritas clásicamente para el complejo: tipo caspasa, tipo tripsina y tipo quimiotripsina. Además, este complejo multicatalítico es susceptible de ser inhibido por fármacos específicos ampliamente descritos para el proteosoma clásico. Por último, el proteosoma tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*, se encuentra participando en procesos celulares, como la proliferación y el enquistamiento.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar al proteosoma 20S en los trofozoítos de las amibas *N. fowleri* y *N. gruberi*, así como establecer su participación en los procesos de su biología celular.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar la presencia de las subunidades estructurales de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , así como las catalíticas de tipo  $\beta$  del proteosoma 20S en trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*, por estudios *in silico* y experimentalmente.
2. Determinar el efecto de fármacos inhibidores del proteosoma 20S en la viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*.
3. Establecer la localización intracelular de las subunidades estructurales  $\alpha$  y  $\beta$  y las catalíticas  $\beta$  del proteosoma 20S en *N. fowleri* y *N. gruberi*, así como el efecto de inhibidores en su localización.
4. Caracterizar la actividad proteolítica del proteosoma 20S en los trofozoítos del género *Naegleria* y establecer el efecto de inhibidores en las actividades de tipo caspasa, tipo tripsina y tipo quimiotripsina.
5. Determinar la participación del proteosoma 20S en la proliferación y enquistamiento de *N. fowleri* y *N. gruberi*.

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### ANÁLISIS *in silico* DE LA SECUENCIA Y ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN AMIBAS DEL GÉNERO *Naegleria* spp.

El análisis bioinformático del proteosoma 20S en las amibas del género *Naegleria* se realizó tomando como referencia las secuencias de aminoácidos reportadas en la base de datos KEGG Orthology (KO) para las 14 subunidades (7  $\alpha$  y 7  $\beta$ ) del proteosoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* [124] y *N. gruberi* (ref: K02725-K02731, K02732 y K02734-K02739), así como las secuencias de la única subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de *Thermoplasma acidophilum* (ref.: K03432 y K03433). Es importante mencionar que todos estos organismos (excepto *N. gruberi*) son considerados modelos de estudio ampliamente reportados para el proteosoma 20S.

Con las secuencias obtenidas, se realizó un alineamiento con la información alojada en el servidor AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>) para *N. fowleri* usando la herramienta BLAST-P con los parámetros pre-establecidos en la misma. Los criterios de selección de las secuencias obtenidas son: significancia del valor de e y los porcentajes de identidad y similitud compartido con las secuencias de las especies de referencia *T. acidophilum* y *N. gruberi*.

Con los datos recabados se realizaron alineamientos múltiples para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las especies de *Naegleria* usando el algoritmo Clustal W con los parámetros “default” y comparados con las subunidades de *T. acidophilum* para determinar la presencia de motivos conservados, motivos y residuos. Los resultados se analizaron y editaron utilizando el programa Jalview Version 2. Por otra parte, los modelos tridimensionales de estas subunidades de las dos especies de *Naegleria* fueron obtenidos utilizando la herramienta Structure Prediction del servidor Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>). Adicionalmente, las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  y  $\beta 7$  fueron comparadas con sus ortólogos a partir del cristal del complejo del proteosoma 20S de *H. sapiens* [156] y su porcentaje de homología obtenido a partir de la herramienta MatchMaker del programa UCSF Chimera 1.11.3, puesto que su presencia fue demostrada experimentalmente.

### CULTIVOS CELULARES Y AMIBIANOS

Los cultivos axénicos de trofozoítos de *N. fowleri* (ATCC 30808) y *N. gruberi* (amablemente donado por el Dr. Govinda Visvesvara, CDC, Atlanta, GA) se mantuvieron a 37° y 25°C, respectivamente, en medio de Bactocasitona al 2% (m/v) (Becton Dickinson, Nueva Jersey, USA) suplementado con suero

fetal bovino al 10% (v/v) (SFB, Microlab, MX). Los trofozoítos fueron utilizados a las 48 h de cultivo, durante la fase logarítmica de crecimiento.

La línea celular de hepatocitos derivados de carcinoma humano (HUH-7, amablemente donada por la Dra. Del Ángel, CINVESTAV, México) se cultivó a confluencia en medio DMEM avanzado (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) suplementado con 2 mM de glutamina,  $5 \times 10^4$  U/mL de penicilina, estreptomycin (50  $\mu$ g/mL) (Invitrogen, California, USA), suero fetal de ternera 8% (v/v) y 1 mL/L de amfotericina B (Fungizone, Gibco, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) en un atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES DE *N. fowleri*, *N. gruberi* y células HUH-7**

Los extractos celulares fueron preparados a partir de trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* mantenidos en cultivo (48 h). Los trofozoítos se lavaron dos veces utilizando PBS estéril (pH 7.2), posteriormente se incubaron por 15 min en un baño de hielo para despegarlos de la superficie de la botella y fueron recuperados y centrifugados a 375 g por 15 min. El botón celular obtenido se re-suspendió en amortiguador de lisis (150 mM NaCl, 2% (v/v) Tritón X-100 y 50 mM Trizma base, pH 8.4 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)) adicionado con inhibidores de cisteína, serina y metalo-proteasas (10 mM ácido *p*-hidroxi-mercuri benzoico (PHMB), 5 mM N-etilmaleimida (NEM), 6  $\mu$ M aprotinina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), 10  $\mu$ M trans-epoxisuccinil-L-leucilamida-(4-guanidino) butano (E-64, Roche, Basel, SUI), 5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (JT Baker, Nueva Jersey, USA)) para inhibir la degradación proteica. Las muestras fueron sometidas a 7 ciclos de congelación-descongelación y posteriormente almacenadas a -20°C hasta su uso.

Los extractos totales de las células HUH-7 se prepararon a partir de monocapas celulares al 90% de confluencia, estas fueron lavadas 3 veces con PBS estéril (pH 7.2) y cosechadas por raspado utilizando el amortiguador de lisis adicionado con inhibidores de proteasas mencionado anteriormente.

### **ENSAYO DE WESTERN-BLOT PARA LA DETECCIÓN DE SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* Y *N. gruberi***

Las muestras de extractos proteicos celulares y amibianos fueron cuantificados por el método de Bradford [157], se ajustó su concentración a 40  $\mu$ g de proteína y se corrieron geles de SDS-PAGE al 12% que fueron teñidos con azul de Coomassie. El patrón proteico se transfirió a membranas de

PVDF (Immobilon-P, Merck-Millipore, Massachusetts, USA) por 120 min a 4°C y 400 mA. Posteriormente, las membranas se bloquearon incubándolas a 4°C toda la noche con una solución al 7% (m/v) de leche sin grasa /TBS en agitación constante. A continuación, se realizaron 4 lavados en agitación con una solución al 0.05% (v/v) de TBS/Tween 20 (TBS-T) y las membranas se incubaron por 2 h a 37°C con los siguientes anticuerpos policlonales: conejo anti-subunidad  $\alpha 1$  de *H. sapiens* (1:250, Abcam, Cambridge, UK), conejo anti-subunidad  $\beta 5$  de *H. sapiens* (1:250), conejo anti-subunidad  $\beta 7$  de *H. sapiens* (1:250) (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) y con los anticuerpos monoclonales: ratón anti-subunidad  $\beta 2$  de *H. sapiens* (1:250) y ratón anti-actina de *H. sapiens* (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Las membranas se lavaron por 3 veces con TBS-T al 0.05% (v/v) y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios: cabra anti-IgG de conejo peroxidado (1:10,000, Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) y cabra anti-IgG de ratón peroxidado (1:1000, Invitrogen, California, USA). Posteriormente, se realizaron 7 lavados de 10 min cada uno con TBS-T al 0.05% (v/v) y las membranas se revelaron por quimioluminiscencia usando el reactivo SuperSignal West Femto (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) para detectar las subunidades del proteosoma y con el kit de reactivo de luminol (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) para detectar actina. El resultado se visualizó en el scanner C-digit® Blot Scanner (LI-COR P/N 3600-00, Nebraska, USA).

#### **DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta 7$ POR ENSAYOS DE DOT-BLOT EN EXTRACTOS TOTALES DE *Naegleria* spp.**

Las muestras de extractos proteicos totales celulares y ambientales fueron ajustadas a una concentración de 25  $\mu$ g de proteína utilizando el método de cuantificación por colorimetría de Bradford [157] y se adsorbieron por vacío en membranas de nitrocelulosa de 0.20  $\mu$ m de poro (Bio-Rad, California, USA). Las membranas fueron bloqueadas toda la noche a 4°C con una solución de leche sin grasa/TBS al 5% (m/v) y posteriormente se realizaron tres lavados con TBS-T al 0.05% (v/v). A continuación, las membranas se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal conejo anti-subunidad  $\beta 7$  de *H. sapiens* (1:250) (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) o con el anticuerpo monoclonal ratón anti-actina de *H. sapiens* (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T al 0.05% (v/v) y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios cabra anti-IgG de conejo peroxidado (1:10,000, Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) y cabra anti-IgG de ratón peroxidado (1:1000, Invitrogen, California, USA). Finalmente, las membranas se lavaron siete veces con TBS-T 0.05% (v/v) y fueron reveladas por quimioluminiscencia con el reactivo SuperSignal West

Femto (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) para detectar la subunidad  $\beta 7$  y con el kit de reactivo de luminol (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) para detectar actina. El resultado se visualizó en el scanner C-digit® Blot Scanner (LI-COR P/N 3600-00, Nebraska, USA).

#### **ENSAYOS DE VIABILIDAD DE TROFOZOÍTOS DE *Naegleria* spp. CO-INCUBADOS CON INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA (LACTACISTINA Y MG-132)**

Los ensayos de viabilidad se realizaron a partir de  $2.5 \times 10^5$  trofozoítos de *Naegleria* spp. incubados con concentraciones crecientes de los inhibidores lactacistina (10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG-132) (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ , TargetMol, Massachusetts, EU) en medio de Bactocasitona sin SFB por tiempos de 24, 48 y 72 h a 37°C para *N. fowleri* o a temperatura ambiente para *N. gruberi*. Además, como condiciones control se utilizaron trofozoítos de ambas especies amibianas incubadas en condiciones de medio de Bactocasitona suplementado con SFB (condiciones de cultivo señaladas anteriormente) o en medio sin suero (condición vehículo).

La evaluación de la viabilidad amibiana se realizó utilizando el reactivo de Sytox Green Nucleic Acid Stain (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) a una concentración final de 10 nM y se cuantificó mediante citometría de flujo (FACS), a partir de los datos recabados de 20,000 eventos utilizando el equipo FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Como control negativo, las amibas fueron fijadas por 30 minutos con paraformaldehído al 4% (m/v) en PBS y permeabilizadas por 10 minutos con Tritón X- 100 en PBS al 0.2% (v/v). Los datos recabados fueron analizados utilizando el software Kaluza (Beckman Coulter, California, EU) y graficados con el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía aplicando la prueba post hoc de Dunnet para comparar los valores múltiples.

#### **INMUNOLocalización DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ Y $\beta$ DEL PROTEOSOMA 20S EN *Naegleria* spp.**

Trofozoítos de *N. fowleri*, de *N. gruberi* y células HUH-7 se crecieron en cubreobjetos silanizados (tratamiento previo con una solución de silane/acetona al 3% (v/v)). Las amibas y las células fueron fijadas por 7 min con paraformaldehído al 4% (m/v) en PBS, seguido de 3 lavados con PBS estéril y permeabilizadas con Tritón X- 100 en PBS al 0.2% (v/v) por 10 min. Las muestras se bloquearon por 1 h a 37°C con una solución de albúmina al 1% (m/v) (Equitech-Bio, Inc., Texas, USA) / SFB al 5% (v/v) (Microlab, México, MX) en PBS estéril (solución de bloqueo), seguido de tres lavados con PBS. A continuación, los cubreobjetos se incubaron por 2 h a 37°C con los siguientes anticuerpos

policonales diluidos en solución de bloqueo: conejo anti-subunidad  $\alpha 1$  de *H. sapiens* (1:200, Abcam, Cambridge, UK), conejo anti-subunidad  $\beta 5$  de *H. sapiens* (1:200) y conejo anti-subunidad  $\beta 7$  de *H. sapiens* (1:200) (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) y con el anticuerpo monoclonal ratón anti-subunidad  $\beta 2$  de *H. sapiens* (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS estéril e incubadas con los anticuerpos secundarios acoplados a FITC cabra anti-IgG de conejo (1:100) o cabra anti-IgG de ratón (1:100) (Invitrogen, California, USA). Los núcleos se tiñeron con DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) por 10 min a temperatura ambiente y los cubreobjetos se montaron utilizando 2  $\mu\text{L}$  de Vectashield (Vector Laboratory, California, USA). Las imágenes se obtuvieron y analizaron utilizando el microscopio confocal (Carl Zeiss LSM- 700, California, USA).

Adicionalmente, trofozoítos de *N. fowleri*, *N. gruberi* y células HUH-7 crecidas en cubreobjetos silanizados se trataron con las siguientes concentraciones de los inhibidores del proteosoma 20S, lactacistina (*N. fowleri*: 40  $\mu\text{M}$ , *N. gruberi*: 10  $\mu\text{M}$  y HUH-7: 10  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y MG-132 (*N. fowleri*: 25  $\mu\text{M}$ , *N. gruberi*: 10  $\mu\text{M}$  y HUH-7: 20  $\mu\text{M}$ , TargetMol, Massachusetts, USA) y se realizó la metodología anteriormente descrita.

La fluorescencia celular total corregida (CTCF) se calculó de acuerdo con Coronado-Velázquez, et al., 2018 usando el software Image J (<https://imagej.nih.gov/nih-image>) considerando la siguiente fórmula:  $\text{CTCF} = \text{densidad integrada} - (\text{área de la(s) célula(s) seleccionadas} * \text{media de la fluorescencia de lecturas de fondo})$  y se graficó usando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de ANOVA de dos vías y aplicando los análisis *post hoc* para la comparación de valores múltiples de Tukey, en el caso de la comparación de la fluorescencia entre subunidades estructurales y catalíticas; o de Dunnet para la comparación del efecto de los inhibidores en cada una de las subunidades.

### **CARACTERIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS DEL PROTEOSOMA 20S EN *Naegleria* spp.**

Las actividades catalíticas del proteosoma 20S en ambas especies de amibas se evaluaron utilizando sustratos peptídicos con un arreglo de secuencias de aminoácidos específicas para evaluar cada una de las subunidades catalíticas (caspasa, tripsina y quimiotripsina) acoplados a la molécula fluorogénica 7-amino-4-metilcumarina (AMC), la cual al ser cortada por las proteasas del proteosoma se libera y emite una señal cuantificable que resulta proporcional a la actividad proteolítica específica de la subunidad a estudiar; por lo cual fue necesario establecer una curva

estándar de AMC libre que nos permitió interpolar los resultados experimentales y que se construyó a partir de la preparación del reactivo en los amortiguadores de actividad correspondientes, que se describen con más detalle a continuación, y partiendo de concentraciones conocidas del mismo (5, 50 y 500 nM). El ensayo se llevó a cabo en microplaca de 96 pozos y se realizó incubando bajo las condiciones experimentales de trabajo para los sustratos peptídicos del proteosoma (1 h a 37°C). Posteriormente, la señal de fluorescencia fue cuantificada a 355/460 nm de longitud de onda de excitación/emisión con el fluorómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EU). A continuación, se construyó la curva estándar, se realizó el análisis de regresión lineal y se obtuvo la ecuación correspondiente a la curva, a partir de la cual se interpolaron los resultados experimentales posteriormente obtenidos.

La caracterización bioquímica del proteosoma 20S se realizó utilizando extractos celulares y amibianos totales, los cuales se obtuvieron utilizando un gendarme y un amortiguador de lisis especial para esta metodología (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, sacarosa 0.25 M, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, KCl 150 mM y glicerol 30% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)) adicionado con los inhibidores de proteasas Halt Protease and Phosphatase inhibitor (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA), como previamente se reportó [124].

Las células y los trofozoítos de ambas especies fueron lisados usando un homogeneizador tipo Potter con cinco ciclos de un minuto de lisis, descansado en hielo 30 s entre cada uno de los ciclos. Los ensayos se realizaron utilizando 200 µg de proteína de extracto total e incubando a 37°C por 1 h con los siguientes sustratos fluorogénicos (50 µM): Z-LLE-AMC para actividad de tipo caspasa, Z-ARR-AMC para actividad tipo tripsina (Merck-Millipore, Massachusetts, USA) y Z-LLL-AMC para actividad de tipo quimiotripsina (Enzo Life Science, New York, USA). Las reacciones se prepararon en un amortiguador de actividad específico Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM y ATP 1mM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). La actividad de peptidasa se detuvo añadiendo etanol frío. La fluorescencia se cuantificó a 355/460 nm de longitud de onda de excitación/emisión con un fluorómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). Los resultados se interpolaron en la curva estándar de AMC libre (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) a 5, 50 y 500 nM en amortiguador de actividad y graficados usando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Los ensayos también se realizaron en presencia de inhibidores del proteosoma usando trofozoítos de *N. fowleri*, *N. gruberi* y células HUH-7 pre-incubados por 24 h con lactacistina (*N. fowleri*: 40 µM,

*N. gruberi*: 10  $\mu$ M y HUH-7: 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y MG-132 (*N. fowleri*: 25  $\mu$ M, *N. gruberi*: 10  $\mu$ M y HUH-7: 20  $\mu$ M, TargetMol, Massachusetts, USA).

Adicionalmente, los experimentos también se realizaron utilizando inhibidores de cisteína proteasas E64 (10  $\mu$ M) y PHMB (10 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) como controles para descartar actividades de cisteína proteasas que presentan ambas especies de amibas [57].

El análisis estadístico se realizó usando la prueba de ANOVA de una vía, aplicando el ensayo *post hoc* de Dunnet para comparar los valores múltiples. Los datos representan la media  $\pm$  SD de al menos tres experimentos independientes.

### **ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE *Naegleria* spp. INCUBADOS CON INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA**

Se elaboraron ensayos con el reactivo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) a una concentración de 0.05 mg/ml preparado en medio de Bactocasitona al 2% (m/v) sin SFB para la obtención de una curva estándar de la absorbancia obtenida a partir de  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* incubados por 2 h con el reactivo, ya sea a 37°C (*N. fowleri*) o a temperatura ambiente (*N. gruberi*). A continuación, se dieron dos lavados por pipeteo con PBS 1X (pH 7.2) para eliminar el reactivo y residuos celulares, y se desarrolló el color utilizando el solvente DMSO (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Posteriormente, se determinó la absorbancia a 540 nm usando el espectrofotómetro Epoch Microplate (BioTek, Vermont, USA). Se construyeron las curvas estándar de crecimiento y se estableció la ecuación de la recta en la cual se interpolaron los datos experimentales obtenidos.

Los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* ( $2 \times 10^5$ ) fueron recuperados en la fase log de crecimiento (48 h) y cultivados en placas de 12 pozos con los inhibidores del proteosoma lactacistina (*N. fowleri*: 40  $\mu$ M; *N. gruberi*: 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y MG-132 (*N. fowleri*: 25  $\mu$ M; *N. gruberi*: 10  $\mu$ M, TargetMol, Massachusetts, USA) preparados en medio de Bactocasitona al 2% (m/v) sin SFB e incubados a 37°C para *N. fowleri* y 25°C para *N. gruberi* por periodos de tiempo de 6, 12, 24, 48 y 72 h. Posteriormente, la viabilidad y proliferación se evaluaron utilizando ensayos de MTT (0.05 mg/ml, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en los que, como se ha descrito anteriormente, las amibas fueron incubadas por 2 h con el reactivo de MTT a la concentración señalada y utilizando las temperaturas correspondientes por cada especie; a continuación, se realizaron tres lavados con PBS (pH 7.2) y se añadieron 200  $\mu$ l de DMSO (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) para la extracción del color.

Se determinó la absorbancia a 540 nm utilizando el espectrofotómetro Epoch Microplate (BioTek, Vermont, USA) y los resultados fueron interpolados en la curva estándar y graficados usando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA) y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de dos vías y aplicando la prueba *post hoc* de Tukey para comparar los valores múltiples. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

#### **ENSAYO DE ENQUISTAMIENTO DE *Naegleria spp.* EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA**

La inducción del enquistamiento se indujo en  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* pretratados por 24 h con los inhibidores del proteosoma (concentraciones previamente mencionadas). Éstos, fueron despegados de las botellas de cultivo y se realizaron tres lavados por agitación utilizando PBS 1X estéril y centrifugando a 375 x g por 15 min. Posteriormente, el botón celular se resuspendió en 600  $\mu$ l de PBS y se inocularon en placas de agar no nutritivo adicionadas con *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor, el inóculo se distribuyó por toda la placa con agitación ultrasuave y las placas se colocaron por 5 días a 37°C en el caso de *N. fowleri* y por 10 días a temperatura ambiente para *N. gruberi* [25]. Los quistes fueron obtenidos por raspado con un gendarme, fijados con paraformaldehído al 4% por 1 h a temperatura ambiente y en constante agitación para ser teñidos por 1 h con blanco de calcofluor (1%, Merck Millipore, New Jersey, USA) y analizados usando microscopia confocal (Carl Zeiss LSM- 700, California, USA). El rendimiento de enquistamiento se calculó por conteo en cámara de Neubauer y el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de ANOVA de una vía y aplicando el análisis *post hoc* de Dunnett para comparación de los valores múltiples. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

## RESULTADOS

### LAS AMIBAS DEL GÉNERO *Naegleria* POSEEN UN PROTEOSOMA 20S CONSTITUIDO POR SUBUNIDADES ALFA Y BETA CON DOMINIOS CONSERVADOS CARACTERÍSTICOS

Como se describió anteriormente, el proteosoma 20S, es un complejo multicatalítico el cual se encuentra conformado por subunidades estructurales de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  y subunidades catalíticas de tipo  $\beta$ , las cuales cuentan con dominios y motivos característicos que les permiten su identificación y clasificación como parte de este complejo. La presencia y características de las secuencias peptídicas de las subunidades del proteosoma 20S en las especies del género *Naegleria*, se identificaron a través de análisis *in silico*.

En la especie *N. fowleri*, se encontraron siete secuencias correspondientes a las subunidades  $\alpha$  del proteosoma 20S similares a las subunidades típicas de este complejo, reportadas en otros organismos eucariontes, tanto protozoarios como células de humano (Fig. 8A); en contraste en la especie *N. gruberi* se encontraron solo seis secuencias peptídicas que corresponden subunidades del proteosoma y no se encontró una secuencia homóloga a la subunidad  $\alpha 7$ , aun cuando se utilizaron como moldes varios organismos modelos (*H. sapiens* o *S. cerevisiae*) en experimentos *in silico* de BlastP. Las seis subunidades  $\alpha$  encontradas muestran las características típicamente reportadas para estas subunidades (Fig. 8B).

Al alinear y analizar con el algoritmo Clustal W, las subunidades  $\alpha$  del proteosoma 20S de ambas especies amibianas se encontró que tienen en su región N-terminal un residuo de tirosina (Y) altamente conservado (Fig. 8A y 8B, sombreado color negro), así como una región denominada hélice H0 (Fig. 8A y 8B, encuadrada en color gris), las cuales participan regulando la apertura del canal catalítico y promoviendo la unión a la subunidad reguladora 19S. Otra característica importante en estas subunidades que fue encontrada en las subunidades  $\alpha$  de ambas especies de *Naegleria*, es la presencia de motivos específicos denominados RPxG y GxxxD (Fig 8A y 8B, sombreados en color negro), los cuales regulan el tamaño y rigidez del poro del complejo. En estas subunidades  $\alpha$  también fueron identificados, los residuos de aminoácidos G32, K63, L85 e I86, de importancia funcional para la interacción del proteosoma 20S con algunos complejos reguladores y de manera muy importante, la presencia en todas estas subunidades de una señal de localización nuclear (K(K/R)xxx(K/R)) (Fig 8A y 8B, cuadro transparente) que podría indicar la translocación del proteosoma de *Naegleria* spp. del citoplasma al núcleo. De manera muy importante, destaca la presencia de un residuo conservado de treonina (T) en la región N-terminal en la subunidad  $\alpha 3$  (Fig.

8A y 8B, sombreado en color azul), encargada de la apertura del anillo de subunidades  $\alpha$  y el cual podría estar involucrado en esta función de compuerta.

Respecto a las características de las subunidades  $\beta$  se encontró que ambas especies amibianas conservan, al igual que las subunidades  $\alpha$ , características típicas encontradas en el proteosoma 20S de otros organismos. En las subunidades con actividad catalítica ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$ ) las cuales se encuentran alineadas en la parte superior de la Fig. 8C y 8D, se identificó un residuo de treonina (T) en la posición número 1 en el extremo N-terminal (Fig. 8C y 8D, señalado en color negro); este es el residuo más importante descrito para la actividad proteolítica de estas subunidades y el cual las coloca dentro del grupo de enzimas denominadas hidrolasas Ntn (hidrolasas nucleofílicas N-terminal, por sus siglas en inglés). De forma destacadas se encontraron en las subunidades de ambas especies amibianas, los residuos conservados que confieren la especificidad a cada una de las actividades catalíticas: R45 en la subunidad  $\beta 1$  que otorga la actividad tipo caspasa, D53 en  $\beta 2$  para la actividad de tipo tripsina y M45 en  $\beta 5$  para la actividad de tipo quimiotripsina; todos estos residuos señalados en color amarillo (Fig. 8C y 8D). Adicionalmente, también se encontraron los motivos GxxxD y GSG implicados en el auto-procesamiento de las subunidades y los cuales están señalados en color negro, tanto en el extremo N-terminal como C-terminal, respectivamente (Fig. 8C y 8D).

**Fig. 8. Alineamientos múltiples para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma 20S en *N. fowleri* y *N. gruberi*.** **A)** Alineamiento de las siete subunidades  $\alpha$  encontradas para el proteosoma 20S de *N. fowleri*. **B)** Alineamiento de las seis subunidades  $\alpha$  del proteosoma 20S de *N. gruberi*, donde destaca la ausencia de la subunidad  $\alpha 7$ . La región N-terminal de las secuencias contiene un residuo de tirosina (Y) (color negro) encargado del ensamblaje del anillo de este tipo de subunidades. La hélice H0 se observa en la región N-terminal de las secuencias (recuadro gris). La subunidad  $\alpha 3$  contiene un residuo de treonina (T) (recuadro azul), encargado de la apertura del poro del complejo. Los motivos GxxxD y RPxG, ambos encargados del estrechamiento del poro (recuadro negro). Destaca la presencia de señales de localización nuclear (K(K/R)xxx(K/R)) en todas las subunidades (recuadro transparente). **C)** Alineamiento de las secuencias para las subunidades  $\beta$  del proteosoma 20S en *N. fowleri*. **D)** Alineamiento de las subunidades  $\beta$  predichas para el proteosoma 20S en *N. gruberi*. En **C)** y **D)** se muestran agrupadas en la parte superior las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  (actividades catalíticas, recuadro transparente). En la porción N-terminal se encuentra un residuo de treonina (T) característico de las Ntn-hidrolasas (recuadro negro). Residuos de arginina (R), ácido glutámico (E) y metionina (M) encargados de la especificidad en cada subunidad, se observan en un recuadro amarillo. Los motivos GxxxD y GSG, relacionados al auto-procesamiento, se señalan en un recuadro negro. Se muestra como molde en la parte superior de cada panel, a la única subunidad  $\alpha$  o  $\beta$  descrita para el proteosoma de *T. acidophilum*.

## Subunidades $\alpha$

A.

*N. fowleri*

```
TacAlpha      MQQGQM-----AYDRAITVFSPOGRLFOVEYAREAYKK-GSTALGKMFANGVLLIS 50
NfowAlpha1    LNFQTQKMSRGASSGYDRFITVFSPEGRLYOYEFYAFKAYKTPGIITTIIGRKGDSCCIVT 59
NfowAlpha2    F-----YFLKKMSTDSFSLITTFSPSGKLVQIEYALNAV--LAGSTSLAIKATNGVVVAT 53
NfowAlpha3    MSR-----SRVDRAITVFSPEGRLYOYEFYAMEASH-AGAALGIATDGVIVLAA 47
NfowAlpha4    M-----SRVDRAITVFSPEGRLYOYEFYAMEASH-AGAALGIATDGVIVLAA 46
NfowAlpha5    FKLKMLMR--SEYDRGVNTENPQGRLFOVEYAEIAKL-GSTAVGIQTPDGVVLA 55
NfowAlpha6    KKQKMF--R--NOYDITITVSPQGRLHOVEYAMEAYQQ-GSAAVGLKSKBFVVLAT 53
NfowAlpha7    MS-----GMGTGVDLAVITVSPQGRLYOIEYANKAVESSE-TAIGICCKDQVVLA 50
```

```
TacAlpha      DKKVRSLIEQN-SIEKIQLLDDYVAAVTSGLVADARVLDVDFARISAQGEKVTGSLVN 108
NfowAlpha1    OKKVPDRLLKAE-SVTHVFKITDRIGCVMTGRADARVNVQARARYEAASFHF 103
NfowAlpha2    EKKLPSPVDHT-SLOKVIPLTDHIGMVYSGMOPDSRVLAQGRKHAEEYRIFYKERIP 111
NfowAlpha3    EKKITSKLLDNERKTEKMYRLDNHIGCAVAGITADANILINSARLHAQRYQF 99
NfowAlpha4    ERKAA-AKLOETRSVRKIVKIDDDHCAALFAGLADARVLIINKARLHAQSYALQFDOV 104
NfowAlpha5    ERRLTSSLDPSS-VEKIMEIDSHIGCAMSGLTADARLVEHARVETQHRRTYNEP 113
NfowAlpha6    LKRAPHAELSSYQ--KLLFKIDDDHVGIIAAGLAADGRVLSKYMNECMHQYVYOTF 110
NfowAlpha7    EKLVDSEKIQOEHTNTRIFNVDRTAGLSITGAKPDRPINKARSEARGVLDQFGRH 108
```

```
TacAlpha      IENLVKRVADQMOQYTOYGGVRFYGVSLIFAGIDQIG-PRIFDCDPAQINEYKATAI 165
NfowAlpha1    VSYLAKRMADHAQLFTOYAGIRPOGVMMMLIIGVDEETKEPOLYKVPAGYAGYFATSS 176
NfowAlpha2    VSQLVKHLASVMQEYTOGGVRFYGVSLIAGYDDT--RRHLYQVDPSSYAWAKASAI 168
NfowAlpha3    VEQLVTLCDKSKQSYTOFGGMRPFGVSLIYAGADK-OYGYLHSDPSSYGGWAKATAI 164
NfowAlpha4    IDYITRYIAOVQOKYTOGGVRFYGVSLIAGYFEP-NGTPTLSQTDPSGTFSSWKANTC 162
NfowAlpha5    VESCTQAVCDLALRFGENAEDRPFVALLIAGVDE-NG-PALYHTDPSGTFKTYEAKAT 170
NfowAlpha6    VQRANIKADKSKQKSTONSORPFGVGLLIAGYDE-TQTH-LYQTCPSGNLSYKAI 167
NfowAlpha7    GRVSERLSASVHFHILYMSRPLGLITLLAYDRIDG-YOLYGIERSGESWGRACAT 166
```

```
TacAlpha      GSGKDAVVSFLEREYKENL-- 184
NfowAlpha1    GQKETEQNFLERKLDKIKPN 197
NfowAlpha2    GKNMNVNANTELEKRNSSD-- 187
NfowAlpha3    GANNQAQASIKQOEVKEDL-- 183
NfowAlpha4    GRNSKTVEFLEKNVNDIFG 193
NfowAlpha5    GAGSEGRQTTQEEVKNKSMF- 180
NfowAlpha6    GARSQSAKTYFERNKATF-- 185
NfowAlpha7    GKGRQAQKSELEKLNLDTL-- 185
```

B.

*N. gruberi*

```
TacAlpha      MQQGQMA-YDRAITVFSPOGRLFOVEYAREAYKK-GSTALGKMFANGVLLIS 50
NgruAlpha1    NSRGSSSGYDRFITVFSPEGRLYOYEFYAFKAYKTPGIITTIIGVRGKDSCCIVT 52
NgruAlpha2    MSDTSF-----LITTFSPSGKLVQIEYALNAVQA-GSTSLAIKATNGVVVAT 46
NgruAlpha3    M---SRR-YDNRITVFSPEGRLYOYEFYAMEASH-AGAALGIATDGVIVLAA 47
NgruAlpha4    M---SR--YDRAITVFSPEGRLYOYEFYAMEASH-AGAALGIATDGVIVLAA 46
NgruAlpha5    MFLMRSE-YDRGVNTENPQGRLFOVEYAEIAKL-GSTAVGIQTPDGVVLA 50
NgruAlpha6    MF--RNQ-YDITITVSPQGRLHOVEYAMEAYQQ-GSAAVGLKSKBFVVLAT 48
```

```
TacAlpha      DKKVRSLIEQ-NSIEKIQLLDDYVAAVTSGLVADARVLDVDFARISAQGEKV 101
NgruAlpha1    CKKVPDRLLKAE-ESVTHVFKITDRIGCVMTGRADARVNVQARARYEAASFHF 103
NgruAlpha2    EKKLPSPVD-HNSLOKVIPLTDHIGMVYSGMOPDSRVLAQGRKHAEEYRIFY 97
NgruAlpha3    EKKITSKLLDNEKTEKMYKLDKHIGCAVAGITADANILINSARLHAQRYQF 99
NgruAlpha4    ERKTAALKOET-RSVRKIVKIDDDHCAALFAGLADARVLIINKARLHAQSYAL 97
NgruAlpha5    ERRLTSSLLEP-SSVEKIMEIDSHIGCAMSGLTADARLVEHARVETQHRRT 101
NgruAlpha6    LKRAPHAELSSYQK--KLLFKIDDDHVGIIAAGLAADGRVLSKYMNECMHQY 98
```

```
TacAlpha      TYGSLVNIENLVKRVADQMOQYTOYGGVRFYGVSLIFAGIDQIG-PRIFDC 151
NgruAlpha1    KFGYEIPVSYLAKRMADNAQLFTOYAGIRPOGVMMMLIGVDEETKEPOLYK 155
NgruAlpha2    IYKERIPVSQLVKHLASVMQEYTOGGVRFYGVSLIAGYDDT--PHLYQV 147
NgruAlpha3    MYQEPIMPEQLVKTLCDKSKQSYTOFGGMRPFGVSLIYAGADK-OYGYLHSD 150
NgruAlpha4    OFDOVSDYIDYITRYIAOVQOKYTOGGVRFYGVSLIAGYFEP-NGTPTLSQ 148
NgruAlpha5    TYNEPMSGVESCCTQAVCDLALRFGENADDRPFVALLIAGIDEN-G-PSLYHT 151
NgruAlpha6    VFETPVPVQRASKIADKSKQKSTQSSSRPFGVGLLVGBYDET-G-AHLYQT 148
```

```
TacAlpha      DPAQITINEYKATAIGSGKDAVVSFLEREYKE- 182
NgruAlpha1    DPAGYAGYFATSAQKETEQNFLERKLDKIKPN 187
NgruAlpha2    DPSQSYAWAKASAIKKNMNVNANTELEKRNSS- 178
NgruAlpha3    DPSQSYGWAKASAIKANNQAQASIKQOEVK- 180
NgruAlpha4    DPSQTFSSWKANTCGRNSKTVEFLEKNVND- 178
NgruAlpha5    DPSQTFTRYEAKAIGAGSEGRQTTQEEVKN- 181
NgruAlpha6    CSPSNLYSYKAIIGARSQSAKTYFERNKATF 180
```

## Subunidades $\beta$

C.

*N. fowleri*

```
TacBeta      TITVGIITLKDAMIMATERVITMENFI-MHKNGKQLFOI-DTYTGMTIAGLVGDAQV 56
NfowBeta1    TSIMAVEFDGGVVIIGADSRITITGSYIANRVSDKLTLPV-HDRIVYVCSGSAADTQ 56
NfowBeta2    TITIGCVVFKDGVVLGADTRATNGP-IVADKCKEIHYYI-APNIYCCGAGTADTNT 56
NfowBeta3    TITTLGFVFNKGIIVIAVDSRASMGNYISSONVKKVIEI-NPYLLGTAGGADCCOF 56
NfowBeta5    GGGVAMTGNKNCVIAADTRYGIRQOTVGTDMQKAFKIHDKCFIGMTGLATDITFH 57
NfowBeta4    DTLIGLKGKDFTLAADTTASFSIILMKDTEDEITAVPNQNLIIAAGSEOGDRVQV 57
NfowBeta6    GGTTLAIPGDYIIVAADTRMSLGSYIOTRKS TKLCKLTDKCVIASAGMOSDAATLH 57
NfowBeta7    GTSILGIRYNGVMLCSDTLGSYGLSARFRSIERIKKIGSNTIVGASCEYSDFYIT 57
```

```
TacBeta      RYMKAELELYRLORRVNMPIEAVATLL-SNMLNQVYKMPYM--VOLLVG---GID- 105
NfowBeta1    DYVRYFLQHSVEVGTLPVETAANLF-KDFCYN-----YK--DOLLAGIICAGAE 105
NfowBeta2    ALISSKLOLHRYATGKQSRVDTAMTF-KRMLAR-----YQ--GYISAALVGGVDV 105
NfowBeta5    RYLGMOQCRVYELRNKRRISVAASKLLSNIVYQ-----YKNYG-LSMGTMIAGAD- 105
NfowBeta3    EKLKFRMNLNLEKRLIKPSSLSNLV-SNMLYKRFQPFWIEP-----VIAGLE 107
NfowBeta4    EFTKNLNLRYLRNDTNLSVKAHFRQELAHALRSQPYOT-----NIIAGVDD 108
NfowBeta6    KVLKMLRLEVYEHQHGKPMASAVAQML-SNMLYRFRFPYTYFN-----LVAGL- 106
NfowBeta7    DLLE--QVDRDQCADDKIETSPKAI-YQYLVRIMYNNRRNFRNPLWNTLIVAGFKD 110
```

```
TacBeta      -TA--PHVFSIDAAGGSVEDIYASTGSGSPFYVGVLESQYSEK 145
NfowBeta1    KNG--GSWTLPLGQTLIREPFSIGSGSTYIYGCDANFKK 146
NfowBeta2    -NG--PALYTIYPHSDTKLPFVTMOSGSLAAMSVEFAEKDD 145
NfowBeta5    HTG--PNLFMVNDQTRLKGTRFVSGSGLYAYGVLDQGYRDP 146
NfowBeta3    DEN-KPFIICADDLIAPC---YTDNFVVSQTCSEALYGMCESL 146
NfowBeta4    FEBAKPELYFIDYLSLQEVKYGAGYGSYFVLSVLDGMYK 150
NfowBeta6    NEG-KGVVYGYDAIGS-----YQAVEVGSQSGQTLIQPLLDN 143
NfowBeta7    GKS--FLGYT-DLLSNFEDDTMASGYGARNFLDSKNGDVNN----- 149
```

D.

*N. gruberi*

```
TacBeta      TITVGIITLKDAMIMATERVITMENFI-MHKNGKQLFOI-DTYTGMTIAGLVGDAQV 58
NgruBeta1    TSIMAVEFDGGVVIIGADSRITITGSYIANRVSDKLTLPV-HDRIVYVCSGSAADTQ 58
NgruBeta2    TITIGCVVFKDGVVLGADTRATEPTIVADKCKEIHYYI-APNIYCCGAGTADTNT 58
NgruBeta3    TITTLGFVFNKGIIVIAVDSRASMGNYISSONVKKVIEI-NPYLLGTAGGADCCOF 58
NgruBeta5    GAGIVAMTGNKNCVIAADTRYGIRQOTVGTDMQKIFKIHDKCFIAGLGLATDVTVNEK 59
NgruBeta4    TIVIGLKGKDFTLAADTTASFSIILMKDTEDEITAVPNQNLIIAAGSEOGDRVQV 58
NgruBeta6    GGTTLAIPGDYIIVAADTRMSLGSYIOTRKS TKLCKLTDKCVIASAGMOSDAATLH 59
NgruBeta7    -----MLCSDTLGSYGLSARFRSVERLRKVG-N-TLIGASCEYSDFYIVDL 46
```

```
TacBeta      MKAELELYRLORRVNMPIEAVATLLSNMLNQ-V-KYPMYVOLLVGGID--TA--PHV 110
NgruBeta1    VRYFLQHSVEVGTLPVETAANLFKDFCYN--KDN--LLAGIICAGAEKNG--GSV 111
NgruBeta2    ALISSKLOLHRYATGKQSRVDTAMTF-KRMLAR-----YQ--GYISAALVGGVDV 110
NgruBeta5    RYLGMOQCRVYELRNKRRISVAASKLLSNIVYQ--Y-KDHGLSMGTMIAGADH-TG--PNL 111
NgruBeta3    EKLKFRMNLNLEKRLIKPSSFLANLSNLYEK--RFGPWFIEPVIAGLEPEN-KPFI 114
NgruBeta4    EFTKNLNLRYLRNDTNLSVKAHFRQELAHALRSQPYOT-----NIIAGVDD 115
NgruBeta6    KVLKMLRLEVYEHQHGKPMASAVAGMLSNMLYR-R-RFFPYTYFNVLVAGLDTDQK--GIV 113
NgruBeta7    LEKLVKDFKCADDKIETOPKAIIFQYLVRIMYNNRRNFRNPLWNTLIVAGVKD--GKSF 102
```

```
TacBeta      FSIDAAGGSVEDIYASTGSGSPFYVGVLESQYSEKMTVDEGVD 153
NgruBeta1    WTLPLGGS-LIIEPFSIGSGSTYIYGCDANFKKMTKEECKQ 154
NgruBeta2    YTIYPHGS-TDKLPFVTMOSGSLAAMSVEFAEKDDSEEEAK 153
NgruBeta5    FMVNDQGT-RLKGRFVSGSGLYAYGVLDQGYRADLSEEEAK 154
NgruBeta3    CADDLIAPCFQDNFVVSQTCSEALYGMCESLKYPMNEPEDLFE 158
NgruBeta4    YYIDYLS-SMOEVKYGAGYGSYFVLSLIDKHKIDGMNLNEAL 158
NgruBeta6    FSYDAIGS-YQSVVGVSGSQTLLIQPLLDNOVAFKNHLLVNPNT 156
NgruBeta7    GYTDLLSNFEDDTMAS-GYAYLAKPILRFVLEKGGDVNNIT 145
```

Respecto al cálculo de porcentajes de similitud e identidad de las secuencias proteicas de cada subunidad amibiana en comparación con organismos modelo, este se realizó a partir del análisis de BlastP de cada subunidad, tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*, contra el molde en *H. sapiens* y en *S. cerevisiae*. De esta manera se encontró que, en ambas especies amibianas, las subunidades  $\alpha$  tienen mayor porcentaje de homología con las pertenecientes a *H. sapiens*, con identidades entre 56 al 67 % y similitudes de entre 74 al 81% en *N. gruberi* y de 51 a 67% de identidad y 74 a 83% de similitud en *N. fowleri*. Mientras que, en comparación con *S. cerevisiae* los porcentajes encontrados para las subunidades  $\alpha$  en *N. gruberi* van de 46 al 61% de identidad y similitud de 64 a 78% y en *N. fowleri* una identidad de 45 a 59% y una similitud de 65 a 78% (Tabla 2).

Para las subunidades  $\beta$ , los porcentajes de identidad y similitud encontrados en las comparaciones para *N. fowleri* y *N. gruberi* contra *H. sapiens* o *S. cerevisiae*, fueron similares. De esta manera *N. gruberi*, mostró un porcentaje de identidad del 44 al 68% con *H. sapiens* y de 41 a 63% con *S. cerevisiae*, con similitudes del 69 al 84% y de 60 a 81%, respectivamente. Por su parte, *N. fowleri* mostró para las subunidades  $\beta$ , porcentajes de identidad del 45 al 67% respecto a *H. sapiens* y del 42 al 60% para *S. cerevisiae*, con similitudes del 69 al 84% y del 61 al 80%, respectivamente.

<i>N. gruberi</i>			<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. sapiens</i>		
Subunidad	Numero de acceso	Longitud (aa)	Identidad (%)	Similitud (%)	e-value	Identidad (%)	Similitud (%)	e-value
α1	XP_002679314.1	255	46	64	2e-75	58	76	4e-103
α2	XP_002675300.1	233	59	68	1e-93	67	80	6e-115
α3	XP_002678658.1	236	61	78	2e-108	64	77	4e-114
α4	XP_002681621.1	259	56	76	3e-104	61	76	2e-113
α5	XP_002683078.1	251	60	74	6e-107	64	81	2e-118
α6	XP_002681735.1	219	52	66	7e-72	56	74	1e-93
α7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
β1	XP_002683020.1	251	62	81	8e-90	67	84	3e-102
β2	XP_002678659.1	271	50	70	7e-93	62	78	2e-120
β3	XP_002679261.1	205	54	71	1e-82	62	79	3e-102
β4	XP_002682514.1	209	44	66	1e-60	44	69	1e-61
β5	XP_002678668.1	300	63	76	2e-95	68	81	9e-103
β6	XP_002675936.1	223	41	60	6e-64	53	70	5e-85
β7	XP_002678511.1	198	45	64	8e-57	49	73	3e-75
<i>N. fowleri</i>			<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. sapiens</i>		
Subunidad	Numero de acceso	Longitud (aa)	Identidad (%)	Similitud (%)	e-value	Identidad (%)	Similitud (%)	e-value
α1	NF0021030	262	45	65	6e-78	58	76	1e-106
α2	NF0043020	240	58	67	4e-91	66	80	1e-113
α3	NF0126930	271	57	78	1e-105	63	77	5e-115
α4	NF0094840	261	57	76	3e-107	60	77	1e-115
α5	NF0080710	256	59	74	8e-107	67	83	3e-122
α6	NF0073410	254	50	66	7e-82	53	74	1e-103
α7	NF0049560	257	46	65	4e-78	51	69	2e-95
β1	NF0013300	265	60	80	4e-87	67	84	8e-102
β2	NF0002210	203	52	69	4e-93	62	77	7e-119
β3	NF0123230	205	54	71	3e-83	63	78	1e-102
β4	NF0037830	208	50	67	6e-30	45	69	2e-63
β5	NF0096880	299	57	71	2e-94	69	81	1e-103
β6	NF0014850	265	42	61	8e-65	54	70	2e-85
β7	NF0059180	300	43	62	2e-61	51	75	3e-85

Tabla 2. Porcentajes de identidad y similitud entre las subunidades del proteosoma 20S de *N. fowleri* y *N. gruberi*, en comparación con organismos modelo

Finalmente, se realizó una comparación de la identidad y similitud entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las secuencias encontradas en *N. fowleri* y *N. gruberi*. Los resultados demostraron porcentajes de identidad de entre el 83 al 96%, con similitudes del 91 al 99% (Tabla 3).

Subunidad	<i>N. gruberi</i>	<i>N. fowleri</i>	Identidad (%)	Similitud (%)	e-value
$\alpha$ 1	XP_002679314.1	NF0021030	91	97	1e-177
$\alpha$ 2	XP_002675300.1	NF0043020	96	98	3e-172
$\alpha$ 3	XP_002678658.1	NF0126930	94	97	3e-176
$\alpha$ 4	XP_002681621.1	NF0094840	89	93	3e-179
$\alpha$ 5	XP_002683078.1	NF0080710	94	97	0.0
$\alpha$ 6	XP_002681735.1	NF0073410	90	97	6e-157
$\alpha$ 7	-----	NF0049560	-----	-----	-----
$\beta$ 1	XP_0026813020.1	NF0013300	96	99	0.0
$\beta$ 2	XP_002678659.1	NF0002210	90	96	0.0
$\beta$ 3	XP_002679261.1	NF0123230	89	95	2e-145
$\beta$ 4	XP_002682514.1	NF0037830	88	94	1e-141
$\beta$ 5	XP_002678668.1	NF0096880	83	91	0.0
$\beta$ 6	XP_002675936.1	NF0014850	93	96	3e-162
$\beta$ 7	XP_002678511.1	NF0059180	86	95	1e-135

**Tabla 3. Porcentaje de identidad y similitud entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma 20S de los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi***

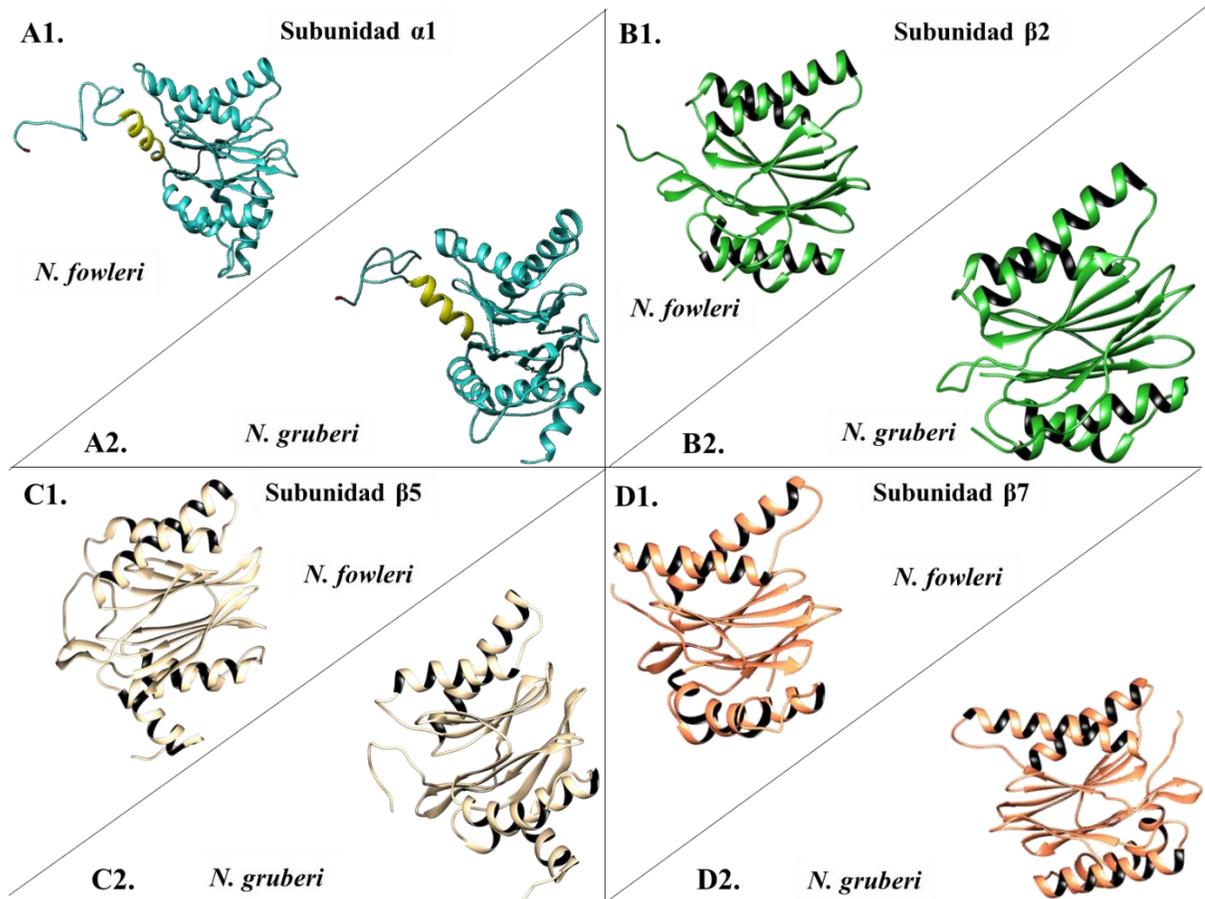
De esta manera, se puede sugerir la presencia de subunidades tipo  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma 20S en las especies del género *Naegleria*, puesto que las secuencias identificadas mostraron la presencia de residuos, motivos y dominios específicos que se requieren para los arreglos estructurales y funcionales, primordialmente para la actividad catalítica, típica de este complejo proteolítico.

### **MODELAMIENTO TRIDIMENSIONAL DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ Y $\beta$ DEL PROTEOSOMA 20S EN AMIBAS DEL GÉNERO *Naegleria***

La estructura tridimensional de las subunidades, tanto estructurales como catalíticas, del proteosoma 20S es característico de este complejo; siendo el plegamiento tipo “sándwich” reportado como el típico para estas proteínas. Así, el establecimiento del modelo tridimensional de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma 20S en las amibas del género *Naegleria* spp. nos permite analizar si estas mantienen la conformación tridimensional necesaria para formar parte del núcleo catalítico.

El modelado tridimensional de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma 20S predichas a partir de la secuencia de aminoácidos encontradas para *N. fowleri* y *N. gruberi*, arrojaron como resultado que todas las subunidades presentaron la conformación tridimensional clásicamente descrita para las

14 diferentes subunidades proteosomales. A pesar de sus diferencias a nivel de secuencia primaria, estructuralmente estas subunidades, comparten una conformación descrita como tipo sándwich, formada por dos arreglos de 5 láminas beta anti-paralelas, rodeadas de dos o tres alfa hélices a los extremos, que ya ha sido ampliamente reportado en proteosomas de otros organismos eucariontes [158] (Fig. 9A-9D).



**Fig. 9. Estructuras tridimensionales de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del proteosoma 20S de los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*.** Conformación tridimensional predicha para la subunidad  $\alpha$ 1 de tipo estructural perteneciente al anillo externo de **A1)** *N. fowleri* y **A2)** *N. gruberi*. La hélice H0 se muestra en color amarillo. Estructura para la subunidad catalítica de tipo tripsina  $\beta$ 2 en **B1)** *N. fowleri* y **B2)** *N. gruberi*. Modelamiento estructural de la subunidad  $\beta$ 5 con actividad de tipo quimiotripsina para **C1)** *N. fowleri* y **C2)** *N. gruberi*. Estructura predicha para la subunidad  $\beta$ 7 de tipo estructural del anillo catalítico para **D1)** *N. fowleri* y **D2)** *N. gruberi*.

A partir del cristal del proteosoma 20S de *H. sapiens*, se realizó el cálculo del porcentaje de identidad estructural de cada una de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las dos especies amibianas trabajadas, lo que mostró porcentajes de identidad estructural que van del 8.8 al 66.1% en *N. gruberi* y del 9.3 al 66.6% en *N. fowleri* (Tabla 4).

Subunidad	Molde (cadena)	Identidad estructural (%)	
	<i>H. sapiens</i>	<i>N. gruberi</i>	<i>N. fowleri</i>
$\alpha 1$	A	59.4	58.6
$\alpha 2$	B	61.3	60.5
$\alpha 3$	C	58.9	57.2
$\alpha 4$	D	61.7	58.8
$\alpha 5$	E	65.3	65.8
$\alpha 6$	F	54.3	52.1
$\alpha 7$	G	-----	47.7
$\beta 1$	H	63.8	63.8
$\beta 2$	I	59.5	63.6
$\beta 3$	J	8.8	9.3
$\beta 4$	K	41.7	42.7
$\beta 5$	L	66.1	66.6
$\beta 6$	M	52.5	53.5
$\beta 7$	N	44.4	49.7

Tabla 4. Porcentaje de identidad estructural de las subunidades del proteosoma 20S de especies del género *Naegleria* en comparación con *Homo sapiens*

Los resultados sugieren que el proteosoma 20S de las amibas del género *Naegleria* es estructuralmente similar al proteosoma constitutivo de otros organismos, conservando los arreglos tridimensionales que le permiten llevar a cabo su función catalítica.

#### EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* Y *N. gruberi*

El proteosoma 20S está típicamente conformado por subunidades de peso molecular entre los 20 a los 30 kDa, reportado en células eucariontes superiores, protozoarios y en la arquea *T. acidophilum*. Estas subunidades pueden presentar modificaciones post-traduccionales o pro-péptidos que influyen en el peso de las mismas y la presencia de 7 subunidades  $\alpha$  y 7 subunidades  $\beta$ , es necesaria para el ensamblaje de cada uno de los 4 anillos que se encuentran conformando el núcleo catalítico y para su correcto funcionamiento.

Para demostrar la presencia de las subunidades del proteosoma 20S en amibas del género *Naegleria*, se realizaron ensayos de Western blot utilizando extractos totales de trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*, y como control positivo extractos de células HUH-7. Los resultados demostraron la presencia en ambas especies amibianas y en las células de hepatocarcinoma humano, de las subunidades estructurales  $\alpha$  y  $\beta$ , así como de las subunidades catalíticas  $\beta$  del proteosoma 20S (Fig. 10).

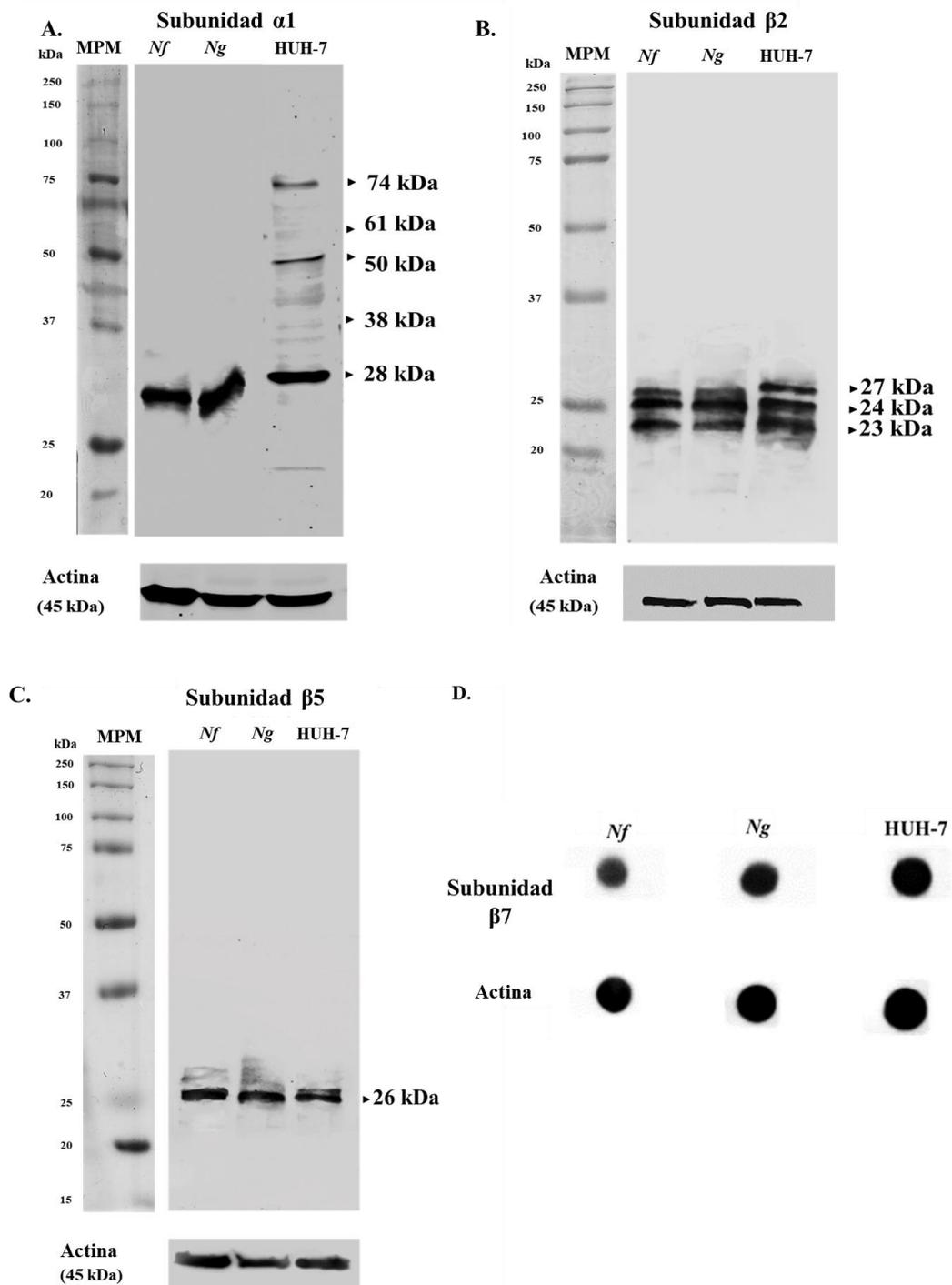
Las inmunotransferencias mostraron la presencia de una banda correspondiente a la subunidad  $\alpha 1$  del anillo externo de las subunidades estructurales en *N. fowleri* y en *N. gruberi*. Esta mostró un peso molecular de 28 kDa; mientras que en células HUH-7 se obtuvo reconocimiento a los 28.4 kDa (Fig. 10A). Es importante mencionar que en este resultado se encontraron otras bandas de reconocimiento en los extractos de las células HUH-7, que podría corresponder a que se está reconociendo a la subunidad específica  $\alpha 1$  unida a otras subunidades  $\alpha$ . Al respecto, se ha reportado que la secuencia N-terminal de las subunidades de este tipo, les permite interactuar fuertemente entre ellas; de esta manera, éstas podrían estar modificando el peso de la misma. Además, se tiene que considerar la presencia de las modificaciones post-traduccionales reportadas para esta subunidad en específico (fosforilaciones y N- acetilaciones), así como las presentes en las otras subunidades  $\alpha$  con las que podría estar unida (adición de fosforilaciones, N- acetilaciones y sumoilaciones) [159-161].

Por otro lado, las subunidades catalíticas  $\beta 2$  y  $\beta 5$  correspondientes a las actividades de tripsina y quimiotripsina, respectivamente también fueron identificadas. Para la subunidad  $\beta 2$  se encontraron bandas tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi* con pesos moleculares de 23, 24 y 27 kDa, de la misma manera que para las células control (Fig. 10B). Es posible que las bandas de diferentes pesos moleculares, correspondan a la detección que incluye tanto a la proteína con su pro-péptido, así como a la formas procesada de la subunidad [162]. Cabe destacar, que en la subunidad  $\beta 2$  de *H. sapiens*, la región pro-beta (pro-péptido) le aporta 4.08 kDa de peso molecular a la proteína, mientras que la secuencia homóloga a esta región en *N. gruberi* y *N. fowleri*, aporta 3.44 y 3.54 kDa respectivamente. Esto se calculó a partir de la secuencia completa para la subunidad  $\beta 2$  de *H. sapiens* alojada en la base de datos KEGG; de la cual se realizó la búsqueda de los dominios presentes, utilizando las herramientas de alineamiento y búsqueda de dominios Pfam alojada en la base de datos UNIPROT (Q99436, ID de dominio PF12465) y en la base CDD- NCBI “conserved domain database” (gi|4506203|ref|NP\_002790|) que señalan al pro-péptido entre los aminoácidos 236-271, con un valor de e de  $8.54e-12$ . A partir de éstos, utilizando la herramienta Protein Molecular Weight en el sitio Sequence Manipulation Suite de la Universidad de Alberta, Canadá ([https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/protein\\_mw.html](https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/protein_mw.html)), se calculó el peso molecular que otorga esta región, al total de la proteína identificada en *H. sapiens*. A continuación, se realizó un alineamiento de la secuencia del pro-péptido con las proteínas completas encontradas en la búsqueda bioinformática para *N. fowleri* y *N. gruberi*, se identificó esta región y siguiendo el mismo procedimiento que para la proteína en humano, se calculó el peso molecular de esta región en la subunidad  $\beta 2$  de las amibas de *Naegleria* spp. Esto con el objetivo de identificar el peso molecular

aportado por el pro-péptido en la proteína homóloga amibiana, dando como resultado los valores mencionados anteriormente. En el caso de la subunidad  $\beta 5$  se encontró una banda de 26 kDa en las muestras de todos los extractos celulares evaluados (Fig. 10C), que corresponden al peso molecular esperado para la identificación de esta subunidad. Es importante mencionar, que todas las bandas corresponden a los pesos moleculares reportados típicamente para las subunidades del proteosoma 20S, tanto en células eucariontes superiores como en protozoarios (aproximadamente 20 a 30 kDa).

Por ensayos de Western blot no fue posible detectar la subunidad  $\beta 7$  en los extractos totales de *N. fowleri* y *N. gruberi*, por lo que se decidió realizar ensayos de dot blot. De esta manera, se identificó la subunidad  $\beta 7$  para ambas amibas y en las células HUH-7 (Fig. 10D).

De esta manera, en los trofozoítos del género *Naegleria* se estableció la presencia de subunidades tanto estructurales como catalíticas, que conforman al proteosoma 20S, sugiriendo que este complejo está conformado de la misma forma que en los eucariontes.



**Fig. 10. Identificación por ensayos de Western blot de subunidades estructurales y catalíticas del proteosoma 20S en trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*.** **A)** Bandas de 28 kDa que muestran la presencia de la subunidad estructural del anillo externo  $\alpha 1$  en los tres extractos celulares evaluados. **B)** Bandas de 23, 24 y 27 kDa que corresponden a la subunidad catalítica  $\beta 2$ , con actividad de tipo tripsina. **C)** Bandas de 26 kDa que indica la presencia de la subunidad catalítica  $\beta 5$  en los extractos ambientales y celulares HUH-7. **D)** Puntos correspondientes a la identificación de la subunidad  $\beta 7$  de tipo estructural del anillo catalítico en extractos totales de *N. fowleri*, *N. gruberi* y HUH-7. La actina fue utilizada como control de carga en todos los ensayos realizados (45 kDa).

## VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE *Naegleria* spp. INCUBADOS CON INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA

Los inhibidores del proteosoma 20S constituyen una de las herramientas más utilizadas en el estudio de este complejo catalítico, pues permiten determinar el impacto de la disminución de la actividad proteosomal en la homeostasis celular, así como, establecer la principal actividad catalítica relacionada a este complejo. Por lo que es fundamental el lograr establecer la concentración adecuada de trabajo para cada inhibidor, sin que la presencia de este afecte la viabilidad de las células en el sistema estudiado.

El establecimiento de la concentración de trabajo adecuada para el empleo de los inhibidores lactacistina y MG-132, se realizó incubando los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* con concentraciones crecientes de ambos compuestos, y utilizando el colorante fluorescente Sytox Green Nucleic Acid Stain, el cual solo es permeable en las células con la membrana celular y nuclear comprometida y que tiñe de manera específica los ácidos nucleicos, y cuantificando mediante citometría de flujo la señal obtenida. Como controles positivos de viabilidad se utilizaron cultivos amibianos incubados en medio de Bactocasitona al 2% sin suplementar, pues este es el vehículo en el que se prepararon los inhibidores y una condición de cultivo en el que se conoce que se mantiene adecuadamente la viabilidad de los trofozoítos. Además, se utilizó la condición de crecimiento en medio de Bactocasitona al 2% suplementado con SFB al 10%, que es como se mantiene normalmente en cultivo a la amiba en el laboratorio.

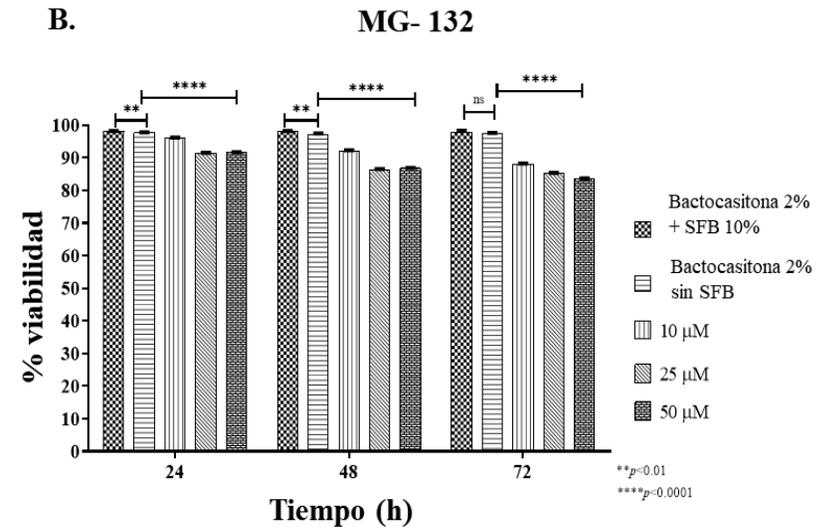
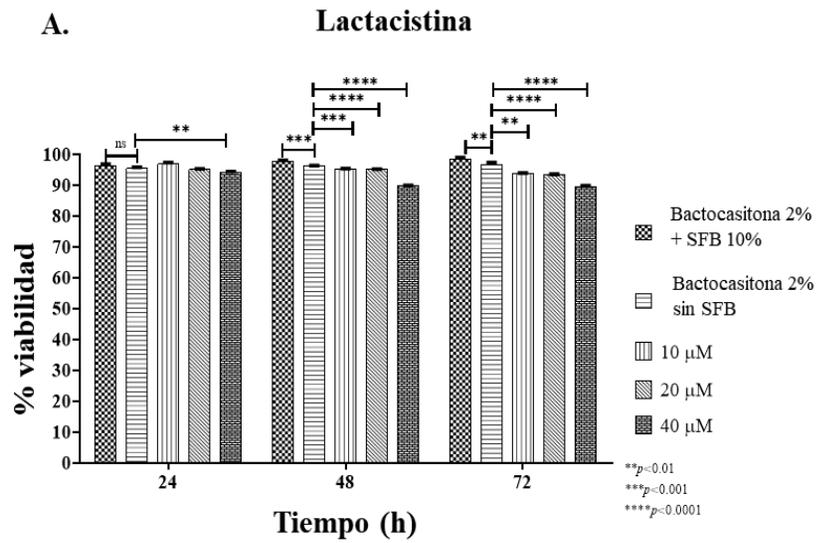
Los resultados encontrados con los trofozoítos de *N. gruberi* incubados con concentraciones de 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  de lactacistina por 24, 48 y 72 h muestran que, a las 24 h, la viabilidad encontrada es de entre el 95 al 97%; manteniéndose en 95% a las 48 h para las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$ ; mientras que en la de 40  $\mu\text{M}$  disminuye a un 90%. A las 72 h, la viabilidad no cambia respecto a lo encontrado en los tiempos experimentales previos (Fig. 11A). Estos porcentajes fueron comparados con los controles de cultivo y de amibas muertas; en donde se observó que en cultivo con y sin suplementar con SFB; la viabilidad se mantenía por encima del 90% en todas las condiciones evaluadas mientras que, en las amibas fijadas, la viabilidad fue del 0%. Considerando estos resultados se determinó que, en este proyecto, la concentración de trabajo del inhibidor lactacistina para los trofozoítos de *N. gruberi* fue de 10  $\mu\text{M}$ . De la misma manera, en la incubación de *N. gruberi* con concentraciones crecientes de MG-132 (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) la viabilidad amibiana se mantuvo aproximadamente al 95% a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  y entre el 90 y 91% para 25 y 50  $\mu\text{M}$  a las 24 h de interacción; este porcentaje disminuyó a las 48 h hasta un 92% para la menor concentración; mientras que para 25 y 50  $\mu\text{M}$ , la viabilidad fue de aproximadamente el 86%. Finalmente, a las 72 h de ensayo la viabilidad en las tres condiciones disminuyó hasta el 85% en las concentraciones más

altas y al 88% a la menor concentración. Estos resultados permitieron determinar que la concentración de 10  $\mu\text{M}$  es la más adecuada para el uso del inhibidor MG-132 en los trofozoítos de *N. gruberi* (Fig. 11B).

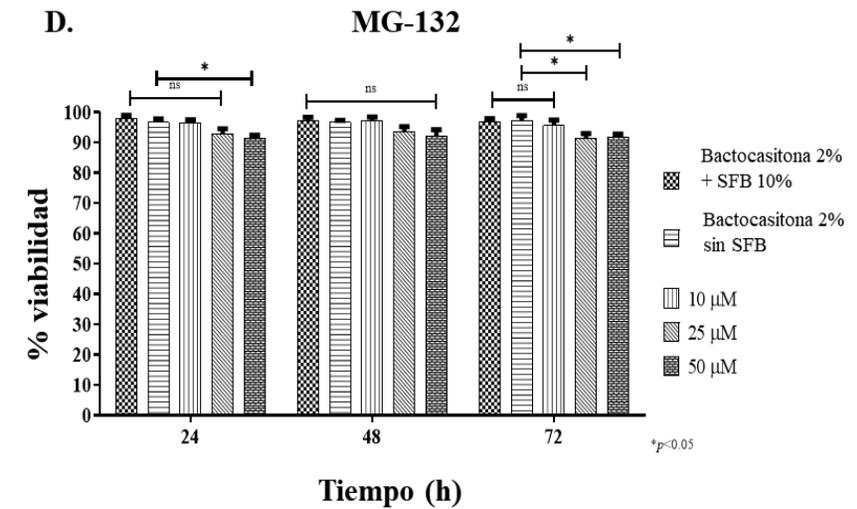
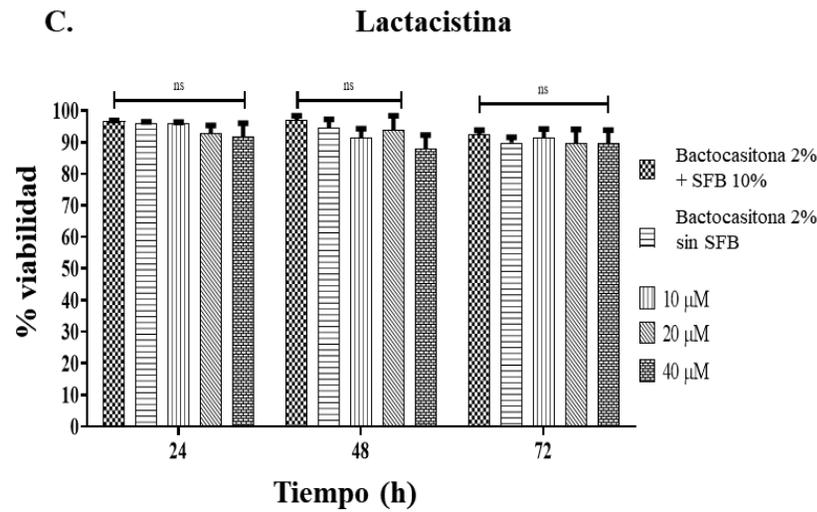
Por otro lado, se llevaron a cabo los mismos experimentos para la determinación de la concentración de trabajo de estos mismos inhibidores, pero en los trofozoítos de *N. fowleri*. De esta manera se encontró que, para la lactacistina a las 24 h de incubación con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  la viabilidad se mantuvo al 97%, mientras que en el mismo tiempo a las concentraciones de 20 y 40  $\mu\text{M}$ , la viabilidad permaneció entre el 96 y el 94%, respectivamente. Para los tiempos más tardíos, de 48 y 72 h, la viabilidad a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  fue del 91%, y entre el 91 al 85% en las de 20 y 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente. De esta manera, se estableció la concentración de 40  $\mu\text{M}$  de lactacistina, como la adecuada para el trabajo con *N. fowleri* (Fig. 11C). Respecto a la concentración para el inhibidor MG-132 con *N. fowleri*, se encontró que durante todos los tiempos evaluados (24, 48 y 72 h) y a las concentraciones antes mencionadas, la viabilidad permanencia similar o superior al 91% (Fig. 11D); por lo que se determinó 25  $\mu\text{M}$  como la concentración de trabajo para este inhibidor, en el presente proyecto.

**Fig. 11. Porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de *N. gruberi* y *N. fowleri* incubados con concentraciones crecientes de inhibidores del proteosoma 20S.** Viabilidad obtenida en los trofozoítos de *N. gruberi* incubados por periodos de 24, 48 y 72 h con **A**) lactacistina (10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ ) y **B**) MG-132 (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Resultados de viabilidad de trofozoítos de *N. fowleri* incubados con **C**) lactacistina (10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ ) y **D**) MG- 132 (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ).

*N. gruberi*



*N. fowleri*



## **LOCALIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL PROTEOSOMA 20S EN LOS TROFOZOÍTOS DE *Naegleria* spp.**

El proteosoma 20S es un complejo catalítico que se ha reportado que se encuentra distribuido principalmente en el citoplasma celular, anclado a membranas de retículo endoplásmico rugoso y mitocondria, de forma periférica al núcleo, dentro del núcleo celular, anclado a membrana celular, y recientemente se conoce que puede ser secretado de manera extracelular [86]. En protozoarios ha sido reportado principalmente en citoplasma y de manera nuclear [121].

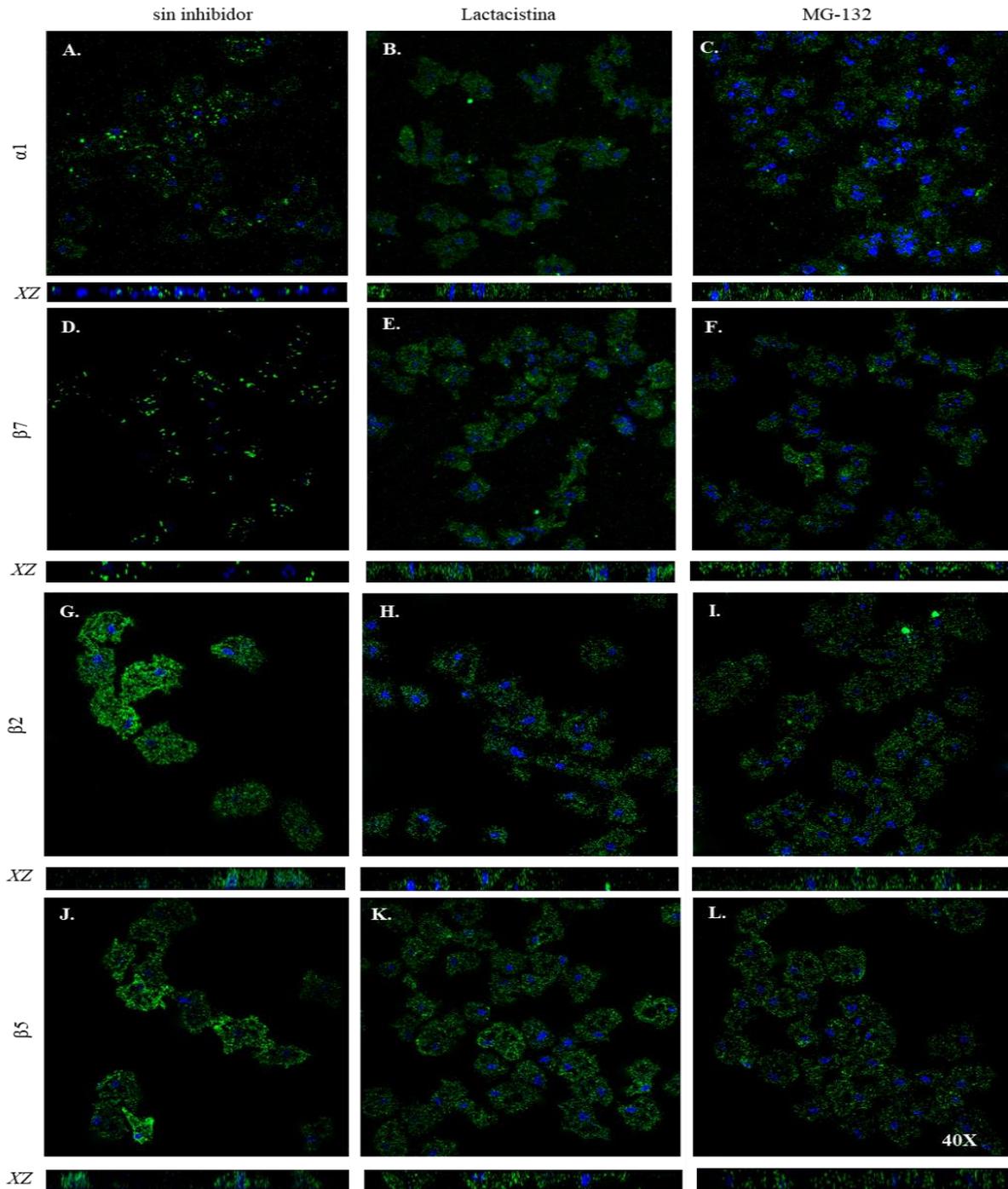
Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular del proteosoma 20S en los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*. En ambas especies y en las células HUH-7 se determinó que la marca de todas las subunidades analizadas, tanto estructurales ( $\alpha 1$ ,  $\beta 7$ ) como catalíticas ( $\beta 2$  y  $\beta 5$ ), aparece con un patrón punteado principalmente distribuido en todo el citoplasma de las células y en las áreas periféricas al núcleo (Fig. 12- 14).

En las imágenes obtenidas se puede observar que las subunidades catalíticas ( $\beta 2$  y  $\beta 5$ ) en *N. fowleri*, muestran una marca homogénea, aparentemente más abundante en el citoplasma (Fig. 12G, J) en comparación con la señal proveniente de las subunidades estructurales ( $\alpha 1$  y  $\beta 7$ ) la cual se observa como una señal acumulada de manera más evidente en puntos específicos (Fig. 12A, D). El mismo patrón de comportamiento de la señal de las subunidades estructurales y catalíticas se encontró para los trofozoítos de *N. gruberi* (Fig. 13); mientras que para las células HUH- 7, la marca de todas las subunidades se observa distribuida de manera homogénea en el citoplasma celular (Fig. 14).

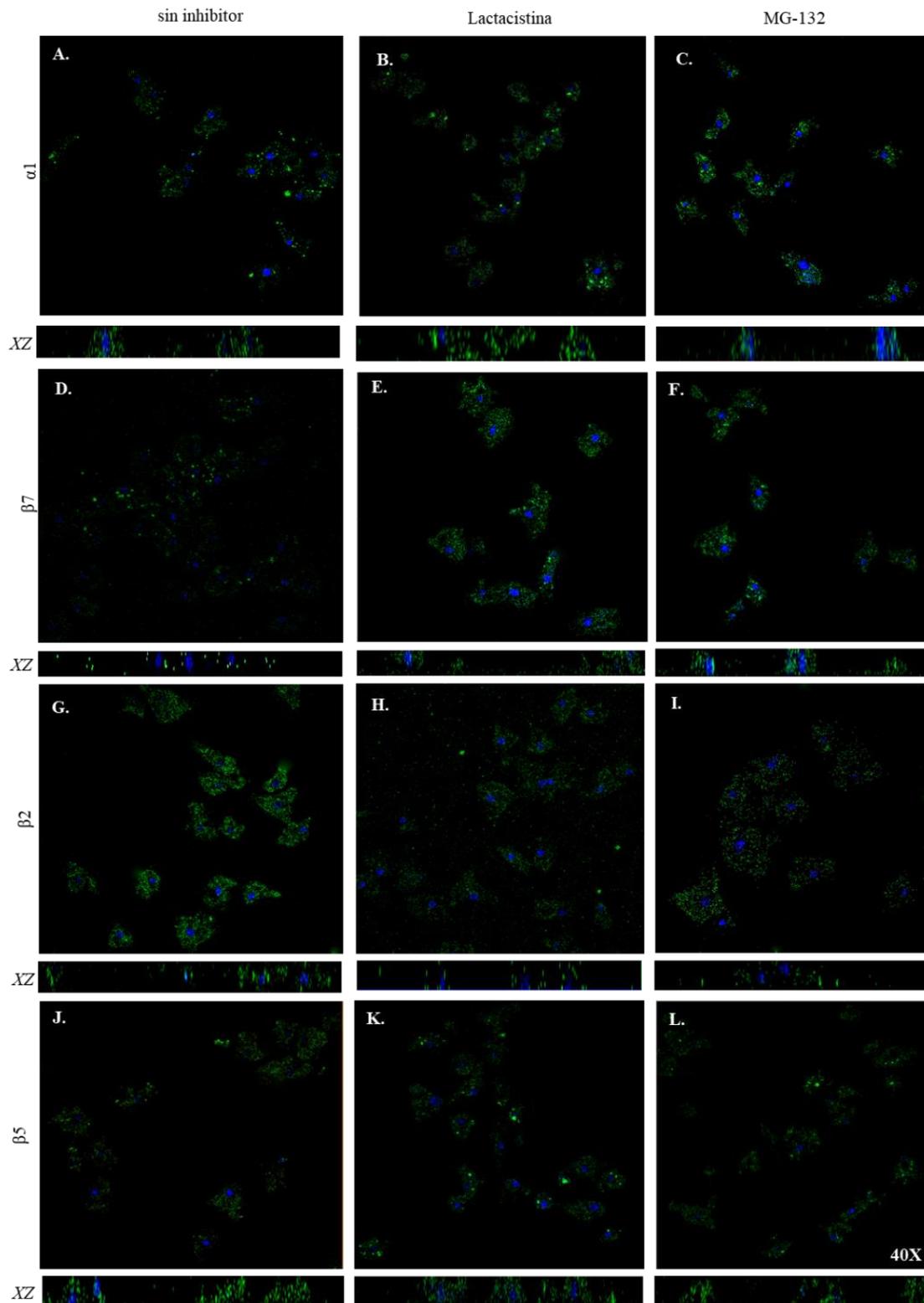
Para identificar la posible localización nuclear del proteosoma en las amibas, se realizó un análisis del plano xz de las imágenes obtenidas por microscopía confocal. La localización de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  estructurales y catalíticas del proteosoma no fue clara en los núcleos de los trofozoítos de ninguna de las especies amibianas; sin embargo, aparentemente estas proteínas se encontraron de manera periférica rodeando el núcleo (Fig. 12-13). En contraste, en las células HUH-7 se observó la marca de las subunidades claramente en el citoplasma y de manera abundante dentro del núcleo, lo que corresponde a los reportes en la literatura para las células de mamífero, incluyendo de humano (Fig. 14).

El efecto de los inhibidores lactacistina y MG-132 en la localización del complejo también fue evaluado por microscopía confocal. Los resultados señalan que los inhibidores no modificaron la localización del complejo o una disminución en la marca de las subunidades, ya sean estructurales o catalíticas (Fig. 12-14, columnas 2 y 3). Sin embargo, bajo esta condición, las subunidades

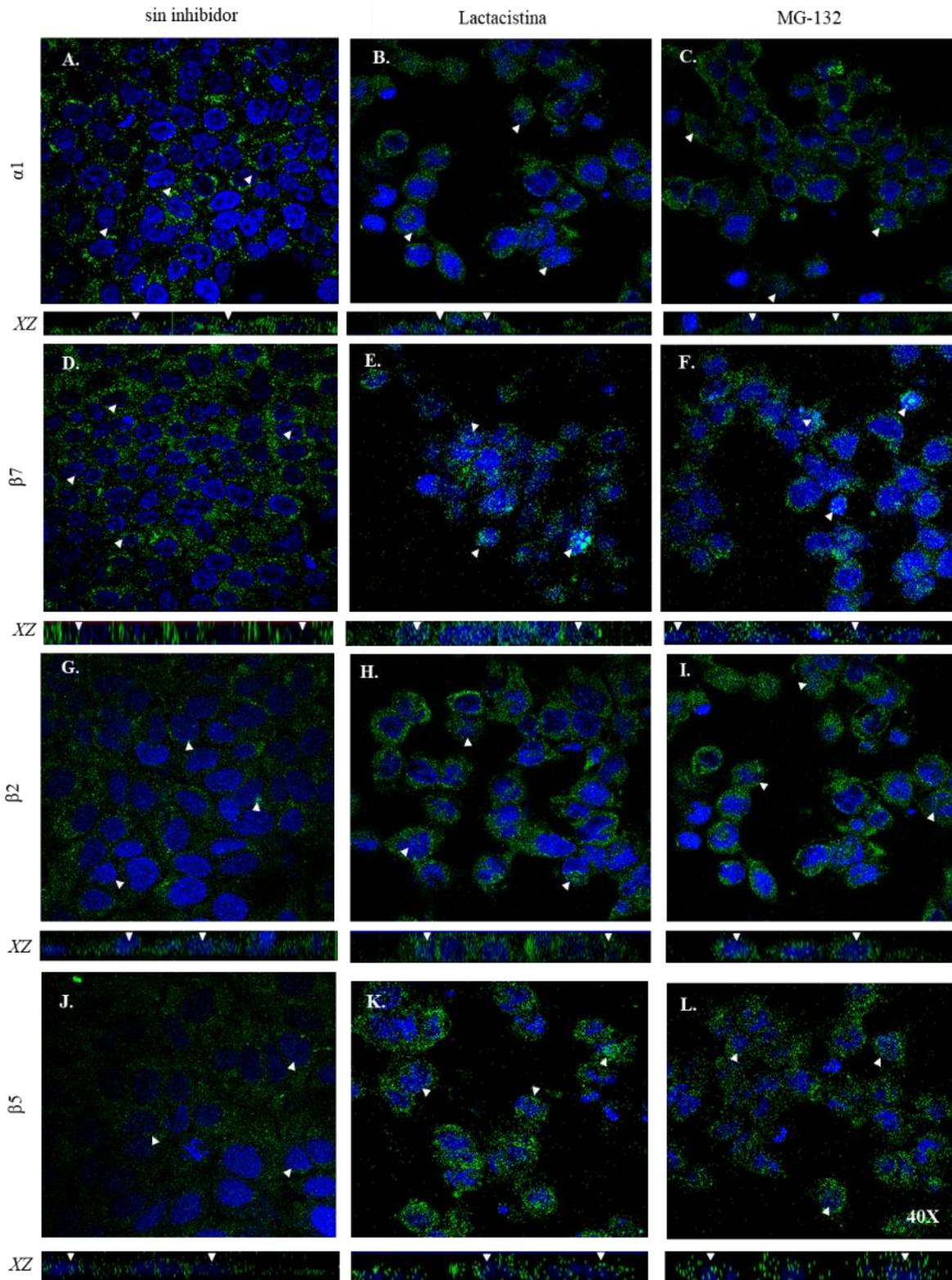
estructurales modificaron la localización puntillada observada en ausencia de inhibidores, presentando una distribución más homogénea en el citoplasma (Fig. 12-14, columnas 2 y 3).



**Fig. 12. Localización subcelular de las subunidades estructurales y catalíticas del proteosoma 20S en trofozoítos de *N. fowleri*.** Imágenes obtenidas a través de microscopio confocal, mostrando la localización intracelular, en ausencia de inhibidores específicos del proteosoma, principalmente a nivel del citoplasma de la **A)** subunidad estructural del anillo externo  $\alpha 1$ , **D)** subunidad estructural del anillo interno  $\beta 7$ , **G)** subunidad catalítica con actividad de tipo tripsina  $\beta 2$  y **J)** subunidad con actividad catalítica de tipo quimi tripsina  $\beta 5$ . Localización intracelular de las subunidades **B)**  $\alpha 1$ , **E)**  $\beta 7$ , **H)**  $\beta 2$  y **K)**  $\beta 5$  del proteosoma en trofozoítos de *N. fowleri* incubados con lactacistina y con MG-132 en **C)**  $\alpha 1$ , **F)**  $\beta 7$ , **I)**  $\beta 2$  y **L)**  $\beta 5$ . En el plano xz se muestra las subunidades proteosomales rodeando al núcleo celular, pero no dentro de éste. Las subunidades proteosomales se observan en color verde y los núcleos celulares en color azul.



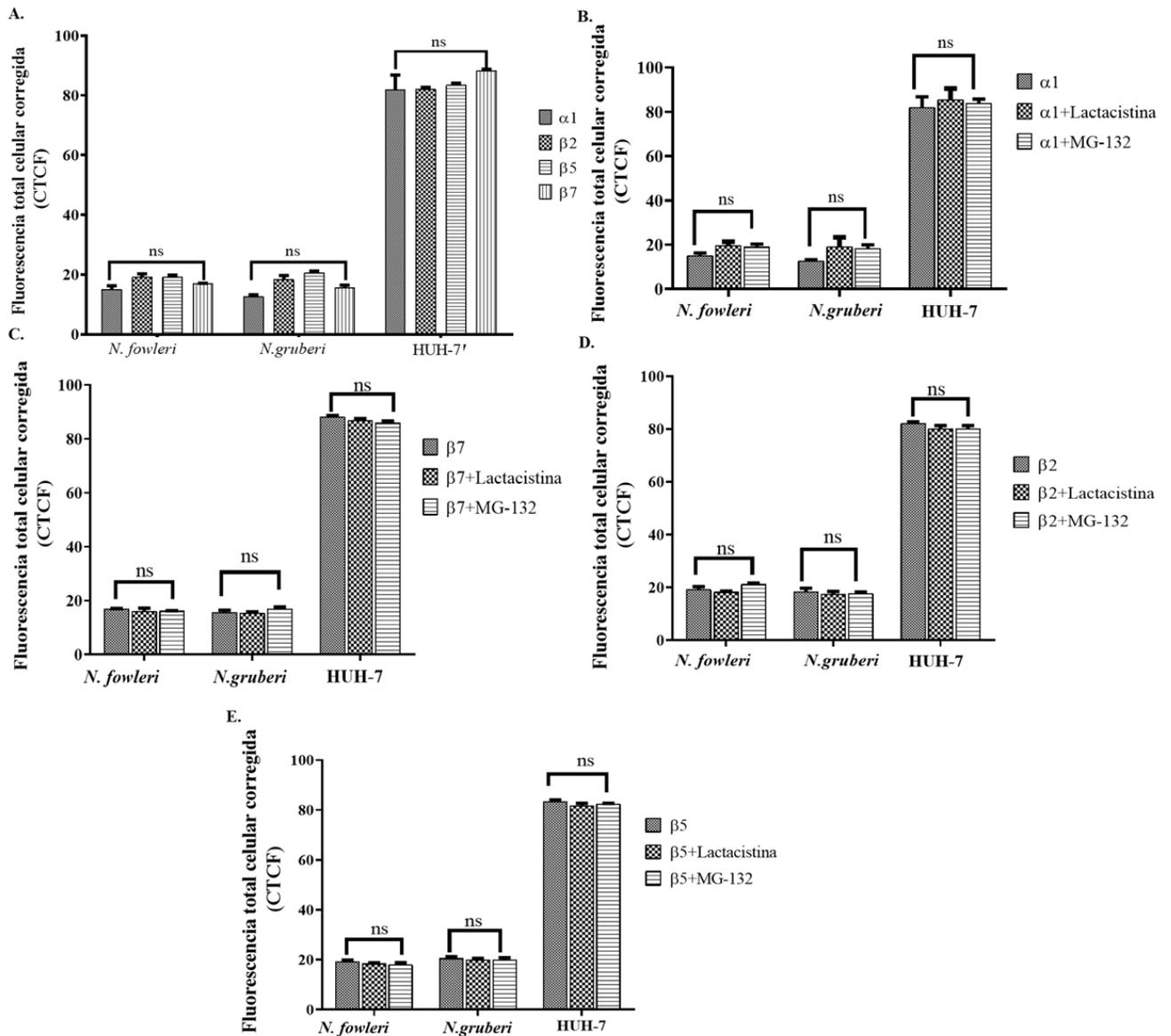
**Fig. 13. Localización intracelular de las subunidades proteosomales estructurales y catalíticas en *N. gruberi*.** Inmunofluorescencias que muestran la localización intracelular de las subunidades **A)** estructural del anillo externo  $\alpha 1$ , **D)** estructural del anillo interno  $\beta 7$ , **G)** catalítica con actividad de tipo tripsina  $\beta 2$  y **J)** con actividad catalítica de tipo quimiotripsina  $\beta 5$ , obtenidas en ausencia de inhibidores específicos. Localización de las subunidades proteosomales en trofozoítos tratados con lactacistina en **B)**  $\alpha 1$ , **E)**  $\beta 7$ , **H)**  $\beta 2$  y **K)**  $\beta 5$  y en **C)**  $\alpha 1$ , **F)**  $\beta 7$ , **I)**  $\beta 2$  y **L)**  $\beta 5$  con MG-132. En el plano xz se muestra las subunidades proteosomales únicamente rodeando al núcleo, pero aparentemente no se observa dentro del núcleo. Las subunidades proteosomales se observan en color verde y los núcleos celulares en color azul.



**Fig. 14. Localización intracelular de las subunidades proteosomales en células HUH-7.** Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopia confocal que muestran la localización de las subunidades **A)  $\alpha 1$ , D)  $\beta 7$ , G)  $\beta 2$  y J)  $\beta 5$** , en células sin tratamiento de inhibidores del proteosoma. En **B)  $\alpha 1$ , E)  $\beta 7$ , H)  $\beta 2$  y K)  $\beta 5$**  se muestra la localización de estas subunidades en células tratadas con lactacistina; mientras que en **C)  $\alpha 1$ , F)  $\beta 7$ , I)  $\beta 2$  y L)  $\beta 5$**  fueron tratadas con MG-132, a las concentraciones previamente señaladas. En el plano xz se muestra la localización nuclear de las subunidades proteosomales; se apunta con cabezas de flecha en color blanco la señal dentro del núcleo celular. Las subunidades proteosomales se observan en color verde y los núcleos celulares en color azul.

Por otra parte, se realizó la cuantificación de la CTCF correspondiente y los resultados señalaron que en *N. fowleri*, *N. gruberi* y HUH-7, la marca correspondiente a las subunidades estructurales ( $\alpha 1$  y  $\beta 7$ ) y catalíticas ( $\beta 2$  y  $\beta 5$ ), se encuentra presente de manera estequiométrica. Es decir, se sugiere que la cantidad de las subunidades estructurales y catalíticas es equivalente en el proteosoma 20S de los trofozoítos del género *Naegleria* spp. y en las células de hepatocarcinoma humano HUH-7 (Fig. 15A). Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la señal de cada subunidad ( $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  y  $\beta 7$ ) en *N. fowleri*, *N. gruberi* y células HUH-7 de los cultivos tratados con lactacistina o MG-132. De esta manera, se determinó que la co-incubación con estos inhibidores específicos del proteosoma no causa una disminución en la marca obtenida en comparación con las condiciones control de cultivo sin inhibidor. Lo que apunta a que no existe un cambio en la proporción de la presencia de las subunidades estructurales y catalíticas que forman parte del complejo en las células tratadas y por lo tanto en el proteosoma 20S (Fig. 15B-E).

De esta manera, los resultados señalan que la principal localización subcelular del proteosoma 20S en trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* es en el citoplasma y la periferia nuclear. Además, se encontró que la proporción de subunidades estructurales y catalíticas en los trofozoítos de *Naegleria* spp. es equivalente en todas las condiciones analizadas y que, la distribución intracelular y estequiometría, se mantienen sin cambios incluso ante la presencia de inhibidores específicos del proteosoma 20S.

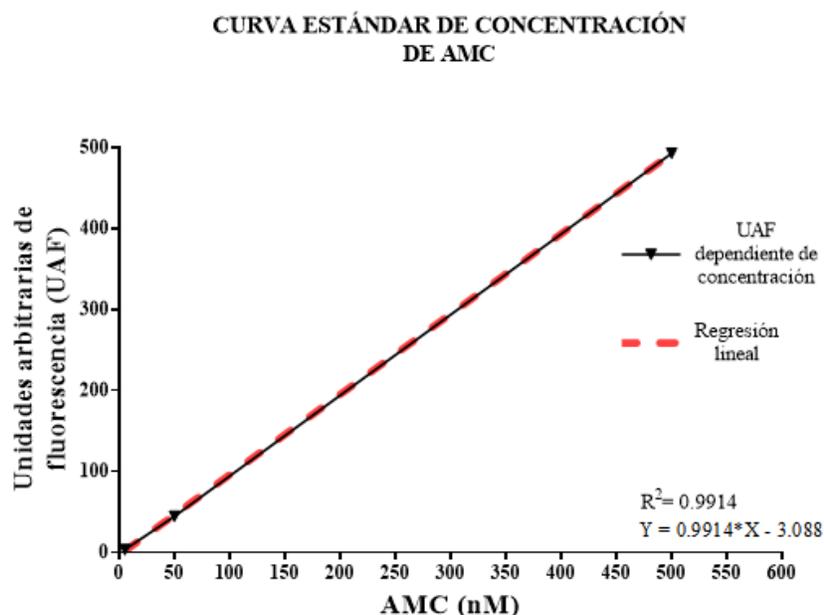


**Fig. 15. Fluorescencia de las subunidades del proteosoma 20S en *Naegleria* spp. y células HUH-7.** Graficas que representan la CTCF obtenida de subunidades estructurales ( $\alpha 1$  y  $\beta 7$ ) y catalíticas ( $\beta 2$  y  $\beta 5$ ) del proteosoma 20S de trofozoítos de *N. fowleri*, *N. gruberi* y células HUH-7. En **A)** comparación de la presencia de las subunidades del proteosoma 20S, a partir de la fluorescencia obtenida en amibas y células de hepatocarcinoma. **B)** Fluorescencia de la subunidad estructural  $\alpha 1$  en condiciones control (barra gris) comparada con la obtenida al incubar los trofozoítos con lactacistina (barra cuadriculada) y con MG-132 (barra rayada). **C)** Fluorescencia de la subunidad estructural  $\beta 7$  en ausencia de inhibidores del proteosoma, comparada con la obtenida en incubaciones con lactacistina y con MG-132. **D)** Fluorescencia de la subunidad catalítica  $\beta 2$  con actividad de tipo tripsina en condiciones control, comparada con la obtenida en incubaciones con lactacistina y con MG-132. **E)** Fluorescencia de la subunidad catalítica  $\beta 5$  con actividad de tipo quimiotripsina en ausencia de inhibidores del proteosoma, comparada con la obtenida en incubaciones con lactacistina y con MG-132.

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DEL PROTEOSOMA 20S EN TROFOZOÍTOS DE *Naegleria* spp.

El proteosoma 20S es un complejo multicatalítico, que de manera constitutiva cuenta con tres actividades catalíticas principales: tipo caspasa, tipo tripsina y tipo quimiotripsina, siendo esta última la más conservada evolutivamente y la cual es la actividad blanco para la mayoría de los inhibidores disponibles hasta el momento [98].

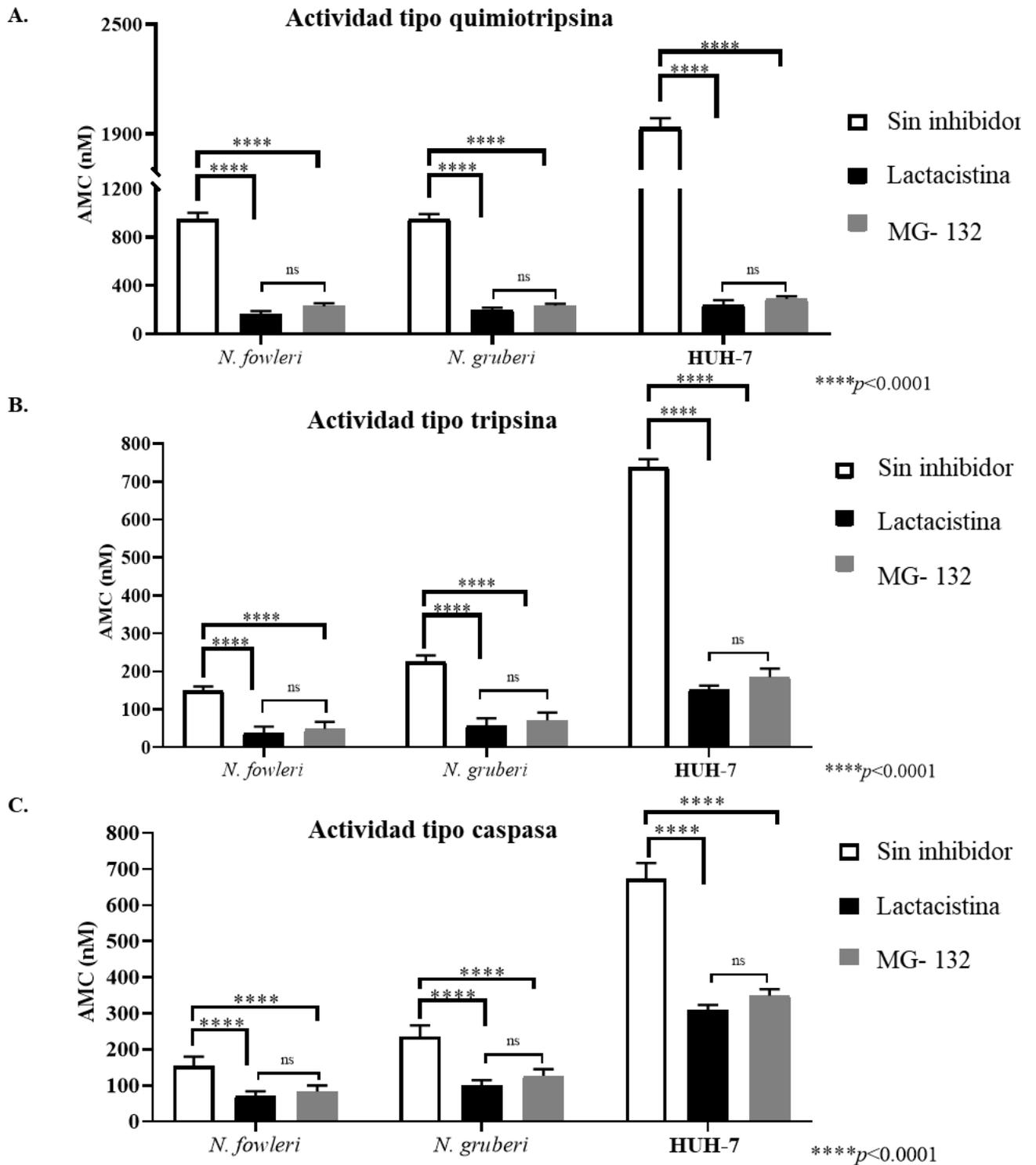
Para caracterizar las propiedades bioquímicas del proteosoma 20S en el género *Naegleria*, se llevaron a cabo los ensayos proteolíticos, utilizando sustratos fluorogénicos específicos para cada una de las actividades del complejo, acoplados a 7-amino-4-metilcumarina (AMC, molécula fluorogénica). Para estos experimentos se estableció una curva estándar de AMC, considerando que la señal emitida por esta molécula es proporcional a la cantidad de sustrato procesado por cada actividad específica del proteosoma y por lo tanto está directamente relacionado a la actividad del complejo. Cabe destacar que, por cada experimento realizado en este bloque de resultados, se realizaron curvas de este tipo utilizando las tres concentraciones de reactivo estándar de AMC libre establecidas (5, 50, 500 nM), además se obtuvo la ecuación correspondiente al comportamiento de cada uno y se interpolaron los datos obtenidos específicamente en el experimento correspondiente. A continuación, se muestra una curva estándar representativa de todas las obtenidas (Fig. 16).



**Fig. 16. Curva estándar de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) libre.** Curva representativa de cada experimento para la interpolación de unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Las concentraciones establecidas fueron 5, 50 y 500 nM.

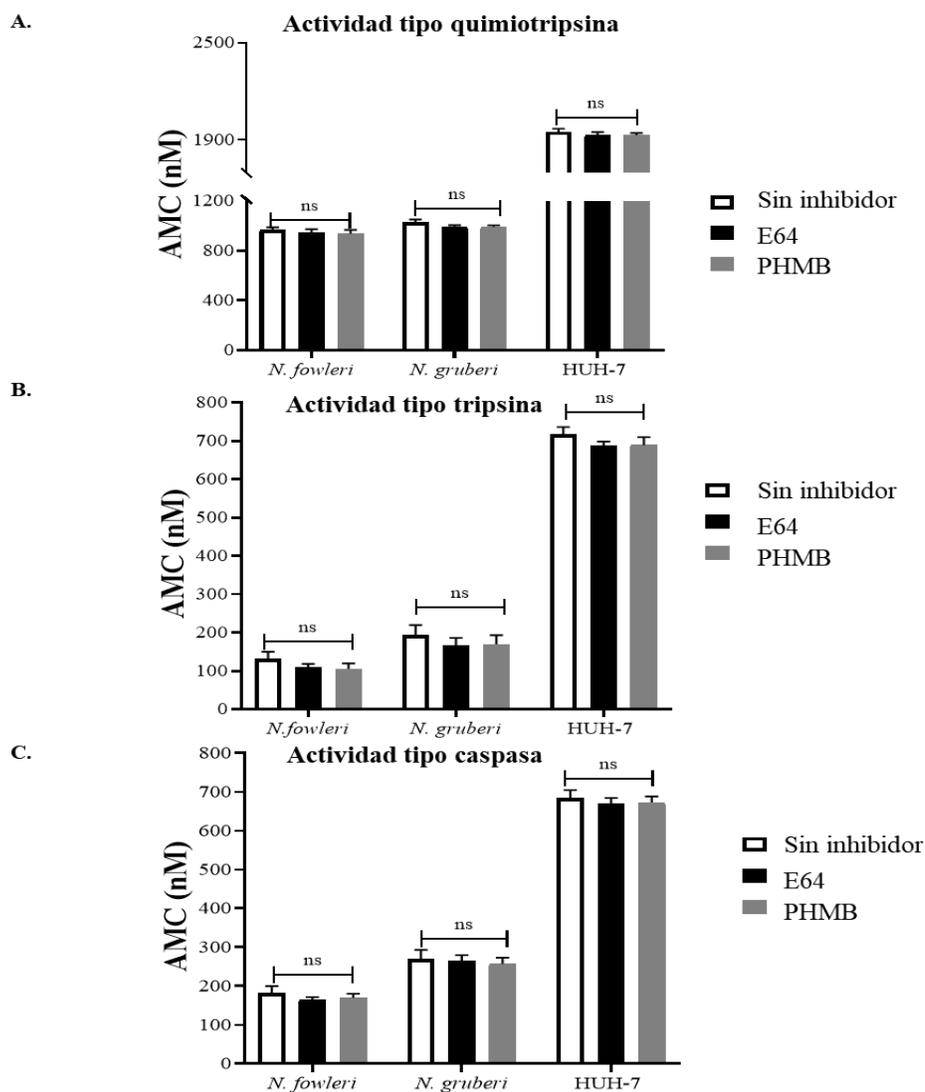
A continuación, se realizaron los ensayos correspondientes al establecimiento de la actividad catalítica principal en los trofozoítos de *Naegleria* spp., los cuales sugieren que de acuerdo con la concentración nanomolar de AMC libre, la principal actividad catalítica del proteosoma 20S en *N. fowleri* y *N. gruberi* es la de tipo quimiotripsina (Fig. 17A), seguida de la de tipo tripsina (Fig. 17B) y finalmente la de tipo caspasa (Fig. 17C). En las células HUH-7, la principal actividad resultante también fue la de tipo quimiotripsina (Fig. 17A), lo que corresponde a los reportes previos de la actividad del complejo en células de mamífero [117].

A continuación, los ensayos proteolíticos se realizaron en presencia de los inhibidores lactacistina y MG-132. Estos demostraron que la principal actividad inhibida por estos compuestos en los trofozoítos de *Naegleria* spp. fue la de tipo quimiotripsina, de igual manera que en las células de humano (Fig. 17A). La actividad catalítica de cada subunidad se graficó, y se observó que la lactacistina inhibió la actividad de tipo caspasa en aproximadamente 50% (Fig. 17C, barra negra) y la de tipo tripsina en un 75% (Fig. 17B, barra negra) en todas las muestras evaluadas. Por su parte, la actividad de tipo quimiotripsina fue inhibida en un 80% en ambas especies amibianas, y en las células de hepatocarcinoma, la disminución de actividad fue del 90% (Fig. 17A barra negra). Por otro lado, cuando se utilizó el inhibidor MG-132, la inhibición resultó menor que con la lactacistina para las tres actividades catalíticas; sin embargo, el análisis estadístico demostró que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 17 A-C, barra gris).



**Fig. 17. Caracterización de las actividades catalíticas del proteosoma 20S en trofozoítos de *Naegleria* spp.** Gráficas que representan la actividad catalítica específica del proteosoma 20S, cuantificada en concentración nanomolar (nM) de AMC liberada de sustratos específicos para la **A)** actividad de tipo quimi tripsina, **B)** actividad de tipo tripsina y **C)** actividad de tipo caspasa, en extractos totales de trofozoítos de *N. fowleri*, *N. gruberi* y como control células HUH-7. Cada inhibidor fue utilizado a las concentraciones específicas para cada célula. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Para determinar el posible efecto de otros inhibidores no específicos sobre la actividad catalítica del proteosoma 20S, se realizaron ensayos de actividad proteolítica en presencia de inhibidores de cisteína proteasas (E-64 y PHMB), considerando que es el tipo de proteasas que ha sido reportado como el más importante dentro del género *Naegleria* [57]. Los resultados demostraron que estos compuestos no afectaron ninguna de las tres actividades proteosomales evaluadas (Fig. 18A-C), sugiriendo que la actividad proteolítica reportada en la Fig. 17, es debida específicamente a las proteasas presentes en el complejo catalítico del proteosoma 20S (actividades de tipo caspasa, tripsina y quimiotripsina) y no por actividad de otras proteasas del microorganismo sobre los sustratos específicos.



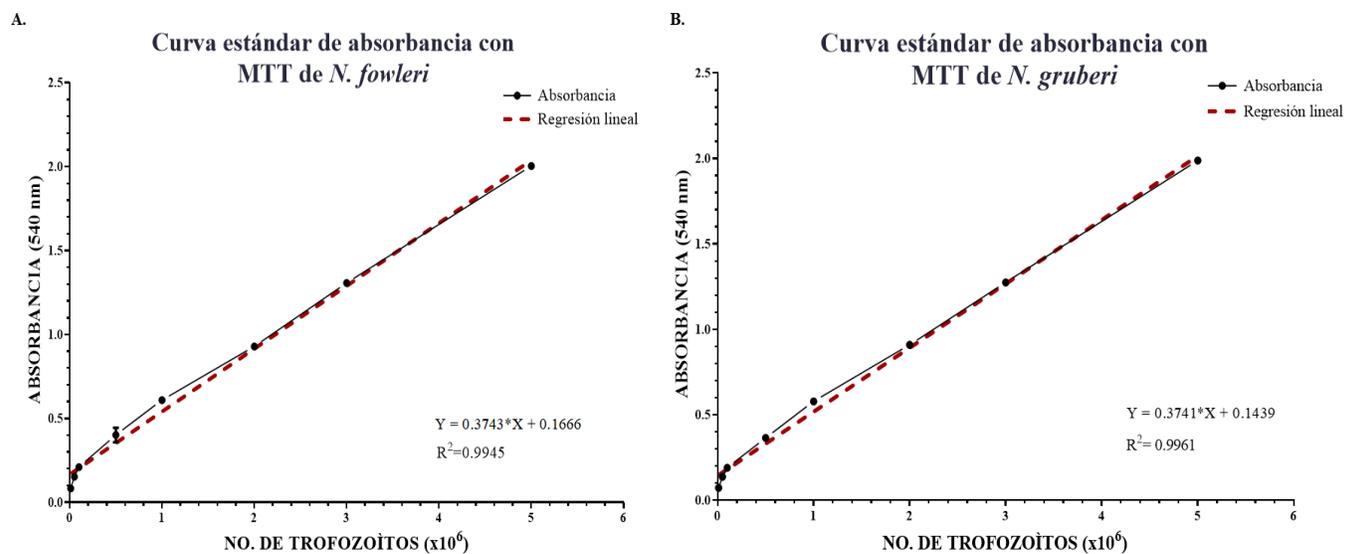
**Fig. 18. Actividad del proteosoma 20S en trofozoítos de *Naegleria* spp. en presencia de inhibidores de proteasas no relacionados.** Las gráficas representan la actividad de las subunidades catalíticas del proteosoma 20S de *N. fowleri*, *N. gruberi* y las células HUH-7 en presencia de inhibidores de cisteína proteasas, no específicos para este complejo proteolítico. En **A)** la actividad de tipo quimiotripsina, en **B)** la actividad de tipo tripsina y en **C)** la actividad de tipo caspasa. La actividad se representa en concentración nanomolar de AMC libre. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Todos estos resultados indican que la principal actividad catalítica presente en el proteosoma 20S de los trofozoítos del género *Naegleria* es la de tipo quimiotripsina, la cual es susceptible de inhibición por compuestos previamente descritos para el proteosoma en otras células, tales como lactacistina y MG- 132.

### EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL PROTEOSOMA 20S EN LA PROLIFERACIÓN DE LOS TROFOZOÍTOS DE *Naegleria* spp.

El proteosoma 20S ha sido relacionado con múltiples procesos celulares fundamentales, siendo de los más reportados la proliferación; tanto en células eucariontes superiores implicado en la evolución de procesos oncogénicos como en protozoarios [93, 109, 121].

Para evaluar el papel del proteosoma 20S en la proliferación de las amibas del género *Naegleria*, se realizaron ensayos de MTT en trofozoítos incubados con lactacistina y MG-132. Así, se construyeron curvas estándar específicas de trofozoítos de *N. fowleri* (Fig. 19A) y de *N. gruberi* (Fig. 19B) en las que, a partir de un número creciente conocido de amibas ( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$ ) se obtuvo la absorbancia correspondiente al MTT procesado y se calculó la ecuación de regresión lineal. A partir de esta ecuación, se interpolaron los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación bajo las condiciones control de cultivo, del vehículo del inhibidor y en presencia de las concentraciones específicas establecidas para cada inhibidor (lactacistina o MG- 132), tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*.



**Fig. 19. Curva estándar de absorbancia de trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*.** Curvas representativas de la absorbancia de cantidades crecientes de trofozoítos de **A)** *N. fowleri* y **B)** *N. gruberi*. Se muestra la ecuación de regresión lineal para la interpolación de los datos experimentales y el valor de R<sup>2</sup>.

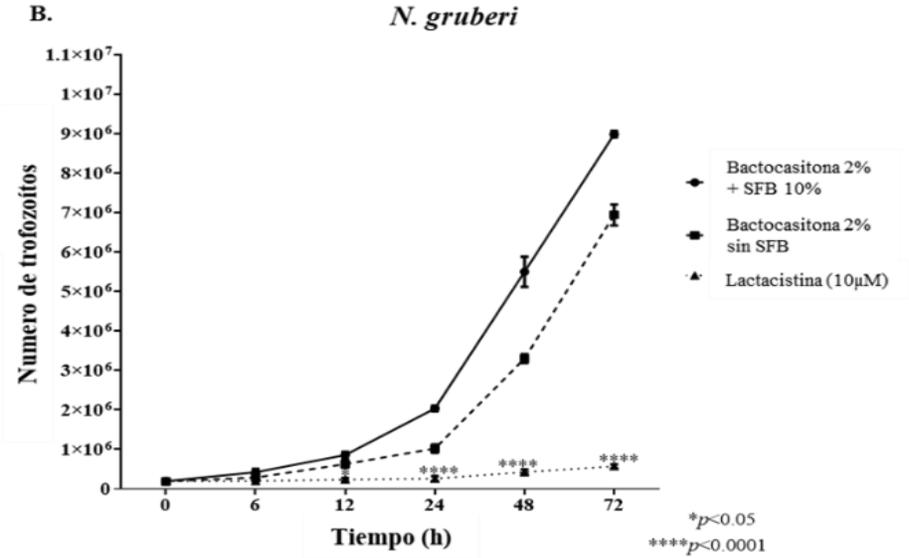
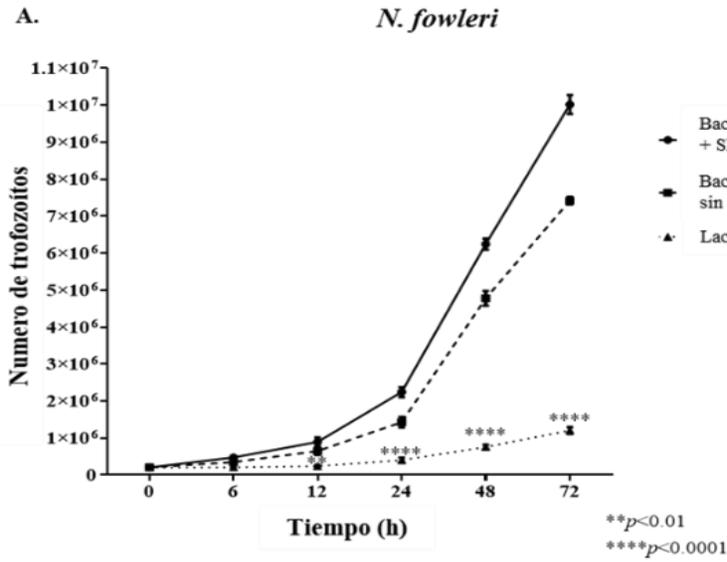
Respecto a los resultados encontrados del efecto de la inhibición de la actividad del proteosoma 20S en la proliferación de los trofozoítos de *Naegleria* spp., estos mostraron que ambos compuestos (lactacistina y MG-132) impactaron en la proliferación de *N. fowleri* y *N. gruberi*, en todos los tiempos analizados (6, 12, 24, 48 y 72 h), comparados con las condiciones control sin inhibidores, tanto la condición de cultivo (medio de cultivo suplementado con SFB), como la del vehículo del inhibidor (medio sin SFB) (Fig. 20). En particular, se observa una disminución en la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* durante los primeros tiempos de co-incubación (6, 12 y 24 h) con el inhibidor lactacistina a las concentraciones adecuadas para cada especie amibiana, la cual resulta estadísticamente significativa. Este efecto mostró una disminución después de 48 h. De esta manera con los trofozoítos de *N. fowleri* se observó una recuperación en la proliferación, aunque a una menor tasa de crecimiento; mientras que en *N. gruberi*, el efecto de la lactacistina fue de tipo amebostático (Fig. 20A-B).

Por otro lado, el compuesto MG-132 inhibió la proliferación en ambas especies amibianas, en comparación con las condiciones control; de manera similar a los resultados obtenidos con lactacistina. Se encontró una disminución sostenida en la proliferación durante los tiempos de 6, 12 y 24 h, para que posteriormente a las 48 y 72 h, la proliferación aparentemente comienza a recuperarse en los trofozoítos de *N. fowleri*, mientras que la recuperación fue a menor ritmo en los trofozoítos de *N. gruberi* (Fig. 20C-D).

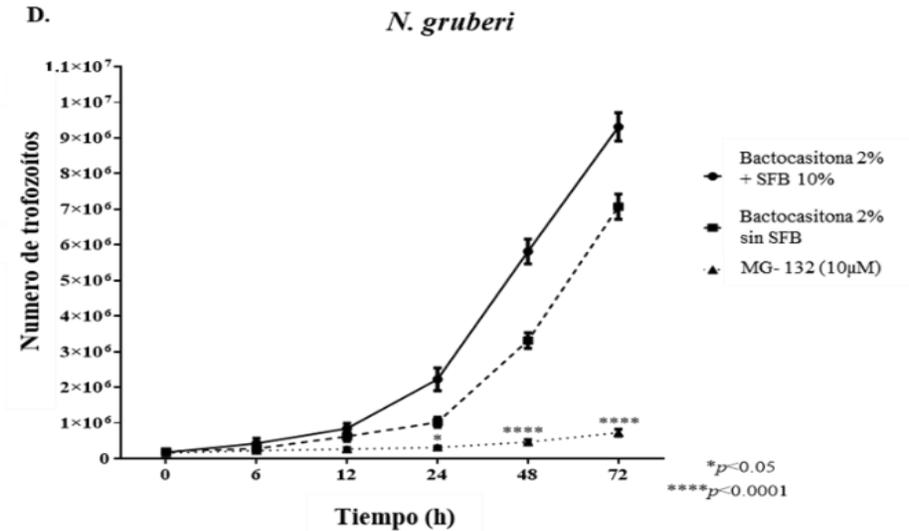
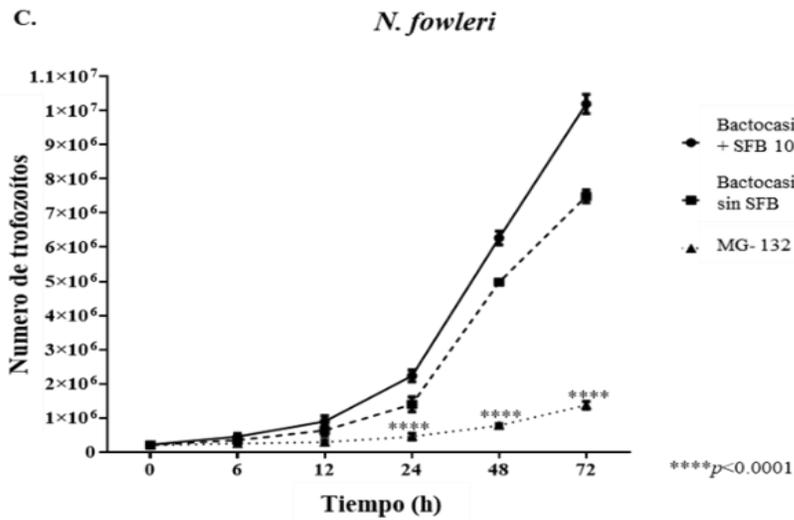
Es destacable que, en todos los casos analizados, la tasa de crecimiento amibiano resultó en una disminución estadísticamente significativa, si se compara con los controles correspondientes; lo que sugiere una importante participación de este complejo catalítico en la proliferación de los trofozoítos de *Naegleria* spp.

**Fig. 20. Curvas de crecimiento de *N. fowleri* y *N. gruberi* en presencia de inhibidores del proteosoma 20S.** Gráficas que representan el efecto de la lactacistina (triángulo sólido) en **A) *N. fowleri*** (40  $\mu$ M) y en **B) *N. gruberi*** (10  $\mu$ M) a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h. Como control, condiciones de crecimiento (círculo sólido) y vehículo (cuadro sólido). Gráficas que representan el efecto del MG-132 (triángulo sólido) en **C) *N. fowleri*** (25  $\mu$ M) y en **D) *N. gruberi*** (10  $\mu$ M) a tiempos de 6, 12, 24, 48 y 72 h, comparado con las condiciones control.

## Lactacistina



## MG-132



## **EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA 20S EN EL ENQUISTAMIENTO DE *Naegleria* spp.**

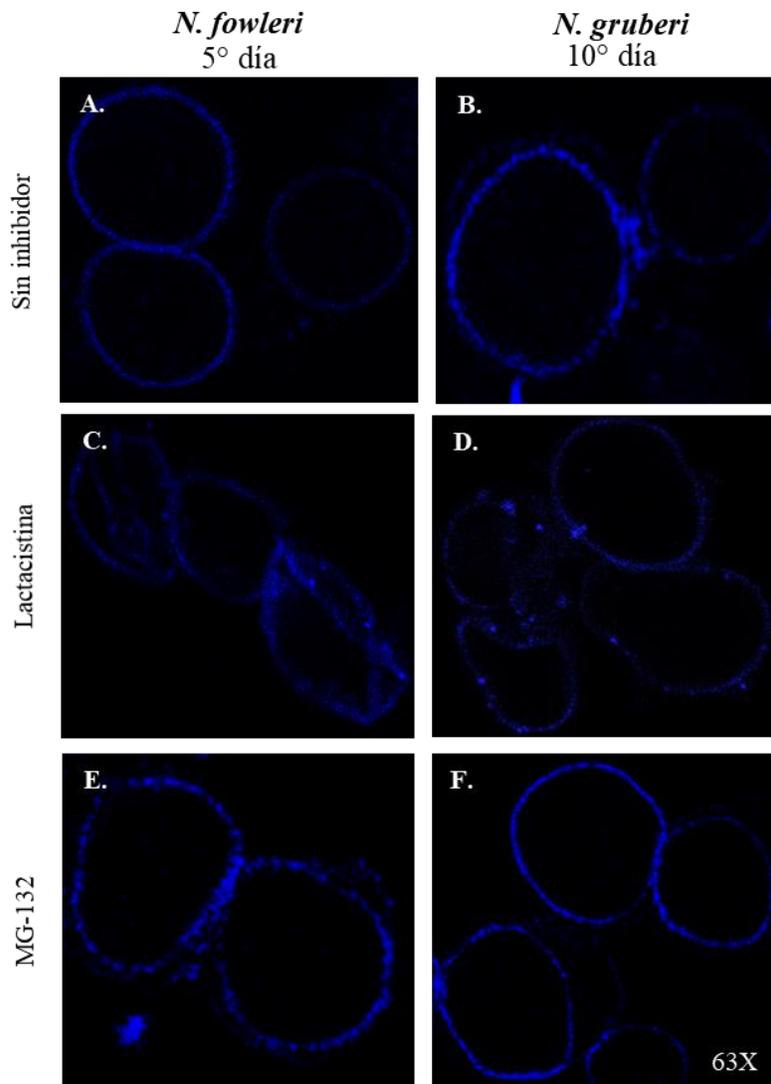
Otro proceso celular en el que se ha relacionado al proteosoma 20S, particularmente en protozoarios de importancia médica, es en el recambio proteico necesario para la diferenciación a fases infectivas o de resistencia [140].

El efecto de la inhibición del proteosoma 20S en la capacidad de enquistamiento de *Naegleria* spp., mostró que en ambas especies amibianas (*N. fowleri* y *N. gruberi*), la morfología de los quistes resultantes de los trofozoítos incubados con lactacistina y MG-132 se encontraba alterada, en comparación con los quistes obtenidos en las condiciones control de inducción, de acuerdo con la tinción con blanco de calcofluor y a las imágenes obtenidas por microscopía confocal (Fig. 21).

Los resultados mostraron que el efecto fue más evidente en los trofozoítos de ambas amibas (*N. fowleri* y *N. gruberi*) inducidas a enquistamiento, en presencia de lactacistina a las concentraciones específicas para cada una de ellas y durante los tiempos adecuados. En *N. fowleri* estos quistes perdieron su morfología redondeada, presentaron formas irregulares, alargadas y ovaladas, además algunos presentaron estructuras que cruzaban toda la célula (Fig. 21C), que no se observaron en los quistes control (Fig. 21A).

Los efectos morfológicos fueron menos evidentes en los trofozoítos incubados con MG-132, pues presentaron menores irregularidades y se observaron solo un poco alargados y con zonas en su superficie ligeramente achatadas, comparados con la morfología de los quistes en condiciones control (Fig. 21E).

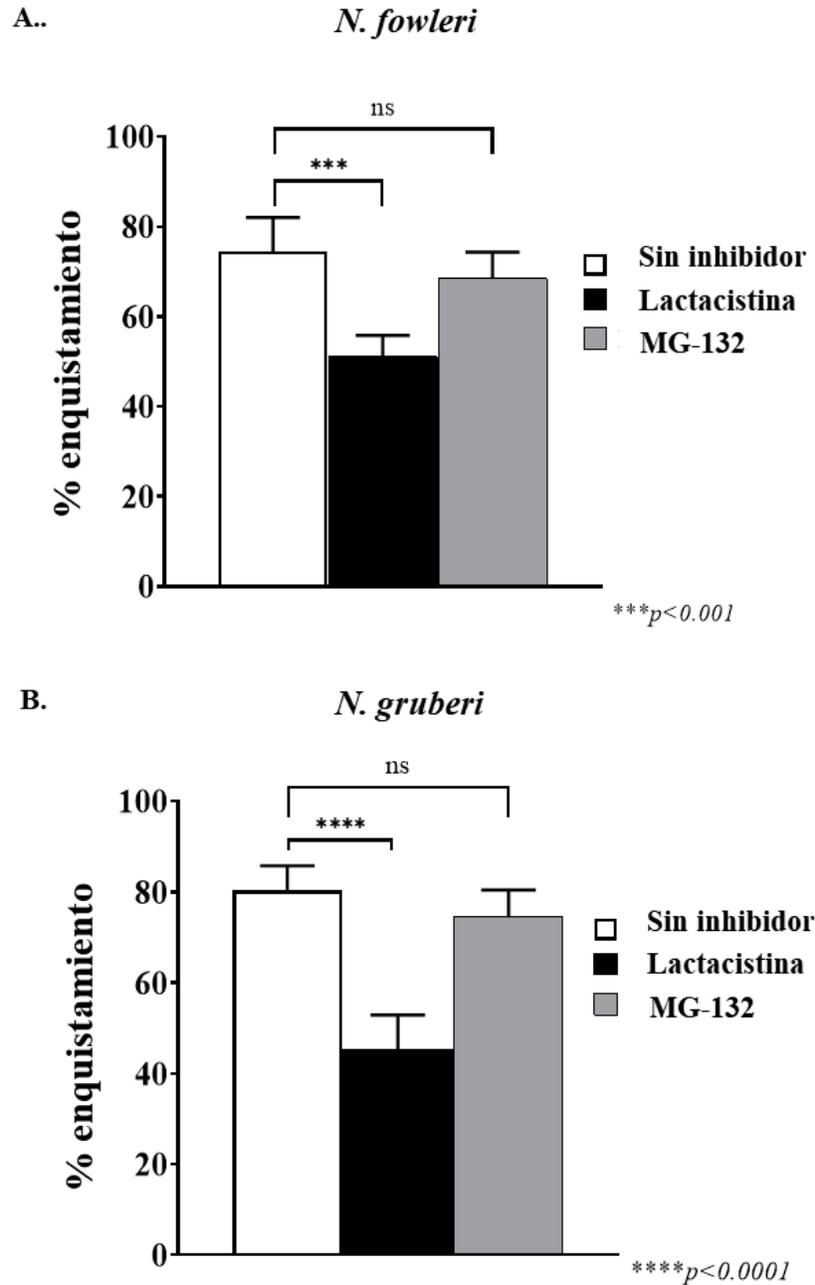
En el caso de los quistes obtenidos en la inducción con *N. gruberi*, se encontró que la incubación con el inhibidor lactacistina, al igual que con *N. fowleri*, generó cambios más drásticos en la morfología del quiste. De esta manera, se observó que los quistes no se encontraron completamente redondeados, algunos de ellos presentaron formas pronunciadamente estrechas en uno de sus extremos, mientras que en otras zonas de la superficie estas irregularidades fueron menores, comparados con la condición control. Cabe destacar que ninguno de éstos mantuvo la forma redondeada característica (Fig. 21 B y D). Similarmente a lo observado con *N. fowleri*, la incubación con MG-132 mostró menor efecto en la morfología del quiste, causando irregularidades poco evidentes en su superficie (Fig. 21F).



**Fig. 21. Efecto de los inhibidores del proteosoma 20S en la morfología de los quistes de *Naegleria* spp.** Quistes teñidos con blanco de calcofluor de **A)** *N. fowleri*, colectados al 5° día de inducción y de **B)** *N. gruberi*, colectados al 10° día de inducción. **C)** Quistes de *N. fowleri* y **D)** Quistes de *N. gruberi* obtenidos a partir de trofozoítos incubados con lactacistina. Se observa morfología atípica en estos quistes y la presencia de bordes irregulares. **E)** Quistes de *N. fowleri* y **F)** Quistes de *N. gruberi* obtenidos de trofozoítos inducidos a enquistamiento en presencia del inhibidor MG-132. Imágenes obtenidas por microscopía confocal.

A continuación, se evaluó el porcentaje de rendimiento de enquistamiento en ambas especies amibianas por conteo, en cada condición. Los resultados fueron graficados y se encontró que tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*, la incubación con lactacistina afectó significativamente la capacidad de enquistamiento comparado con el rendimiento bajo las condiciones control (Fig. 22). Por otro lado, se determinó que la incubación con el inhibidor MG-132, no afectó de manera estadísticamente significativa los porcentajes de enquistamiento. Es importante destacar que este efecto puede deberse a la pérdida del efecto de inhibición por parte del MG-132, considerando el tiempo necesario para llevar a cabo la inducción de la diferenciación a quiste en *Naegleria* spp., pues

cabe recordar que el MG-132 es considerado como un inhibidor reversible de la actividad proteosomal (Fig. 22).



**Fig. 22. Porcentaje de trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* inducidos a enquistamiento, en presencia de inhibidores del proteosoma.** Gráficos que representan el efecto en el rendimiento de enquistamiento de A) *N. fowleri* y B) *N. gruberi*, en presencia de los inhibidores lactacistina (barra color negro) y MG-132 (barra color gris) comparado con el rendimiento en condiciones control sin inhibidor (barra vacía).

De esta manera, se sugiere que el proteosoma 20S participa en el enquistamiento de los trofozoítos del género *Naegleria*, particularmente dentro de los mecanismos que regulan la formación del quiste, relacionados a su morfología e incidiendo directamente en su rendimiento.

## DISCUSIÓN

El proteosoma es un complejo proteolítico multi-catalítico en forma de barril, el cual forma parte del sistema ubiquitina-proteosoma. Además, se considera el principal responsable de la degradación de proteínas intracelulares de peso molecular bajo y un componente esencial para la regulación de múltiples procesos celulares, entre los que se incluyen la proliferación, diferenciación, respuesta a estrés, ciclo celular, reciclaje de proteínas y apoptosis, entre otros [103, 163]. Su presencia se ha descrito y caracterizado anteriormente en múltiples géneros de protozoarios, varios de ellos de relevancia médica como *Plasmodium* spp., *Toxoplasma* spp. o *Trichomonas* spp., por lo que su estudio como un posible blanco terapéutico, ya ha sido explorado [126, 149, 154, 164].

Dentro de los microorganismos protozoarios en los que ya han sido estudiados algunos componentes de este complejo, su función y relevancia celular, se incluyen también a las amibas parásitas *E. histolytica* y *E. invadens*; así como a la amiba de vida libre *A. castellanii*. [127, 128, 132]. Sin embargo, hasta el momento en el género *Naegleria* no existían informes experimentales que describieran la presencia o caracterizaran la actividad del proteosoma 20S, ni los procesos celulares en los que podría estar involucrado. Por lo que el objetivo de este proyecto fue identificar la presencia y caracterizar la participación de este complejo multi-catalítico en las amibas del género *Naegleria* spp.

En principio, mediante un análisis *in silico*, se determinó la presencia de subunidades del proteosoma 20S, tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*. En *N. fowleri*, se encontraron siete subunidades de tipo  $\alpha$  y siete  $\beta$ , como se ha reportado típicamente en otros protozoarios [123, 136]. Por otra parte, para la especie *N. gruberi*, solo fue posible identificar seis de las siete diferentes subunidades de tipo  $\alpha$ , que se han descrito para el núcleo catalítico del proteosoma en células eucariontes, en tanto que si se encontraron las siete subunidades de tipo  $\beta$  que forman el anillo interno del núcleo catalítico. Se ha descrito que en la falta de una subunidad  $\alpha$  ocurren composiciones alternativas del proteosoma 20S que no comprometen su función. Así, en la levadura *S. cerevisiae*, la eliminación del gen de la subunidad  $\alpha 3$  provoca su reemplazo por una segunda subunidad  $\alpha 4$ , dando como resultado un núcleo catalítico con la conformación  $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 4-\alpha 4-\alpha 5-\alpha 6-\alpha 7$ , lo que podría sugerir que las amibas *N. gruberi* cuentan con un anillo de subunidades estructurales  $\alpha$ , con una conformación alternativa, pues es posible que se realice el reemplazo de la subunidad ausente  $\alpha 7$ , a través de la duplicación o aumento de la expresión (sin duplicación génica) del gen de alguna otra subunidad, de este tipo de manera tal que no se afecte el funcionamiento y estructura del núcleo catalítico [165]. Una alternativa podría ser la subunidad  $\alpha 5$ , pues ya se ha determinado que en el parásito *T. brucei*, la subunidad  $\alpha 5$  recombinante puede auto-ensamblarse,

generando un anillo heptamérico, con características similares al anillo heptamérico  $\alpha$  del proteosoma constitutivo 20S de este microorganismo. Además, se sabe que es ésta la subunidad  $\alpha$  más parecida a la única subunidad  $\alpha$  descrita en el proteosoma de *T. acidophilum*, el cual además de ser un organismo modelo para el estudio del proteosoma 20S, es el complejo considerado como el ancestro directo del proteosoma 20S constitutivo presente en células eucariontes, incluyendo el de mamíferos como *H. sapiens* [100, 166].

El análisis bioinformático permitió reconocer en las secuencias putativas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , dominios, motivos y residuos esenciales para la actividad del proteosoma 20S. Así, para las subunidades de tipo  $\alpha$  se hallaron en las secuencias, tanto de *N. fowleri* como de *N. gruberi*, la conformación de aminoácidos que da origen a la hélice H0. Esta se encuentra altamente conservada en la porción N-terminal de este grupo de subunidades y es responsable de la interacción y el ensamblaje del anillo estructural específico de tipo  $\alpha$ , así como de las interacciones del proteosoma 20S con los complejos reguladores [167, 168]. De igual manera, fueron identificados los motivos GxxxD y RPxG, los cuales se sabe que se encuentran regulando el tamaño y la rigidez, permitiendo la apertura y cierre del núcleo catalítico [97]. Respecto a los residuos, en todas las subunidades  $\alpha$  amibianas se encontró, un residuo de treonina (T) en la porción N-terminal de la secuencia, el cual es importante para el ensamblaje de los anillos  $\alpha$ . Además, en *N. fowleri* y *N. gruberi* se encontraron los residuos G34, K66, L81 y V82, los cuales son cruciales para la interacción de este complejo con sus complejos reguladores [167].

Con respecto a las subunidades  $\beta$ , en ambas amibas se encontraron dentro de las secuencias de las subunidades catalíticas  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5, un residuo de treonina, característico en la porción N-terminal, que le confiere a estas proteasas el carácter de hidrolasas nucleofílicas N-terminales (Ntn hidrolasas) [169]. Además, estas subunidades poseen los residuos específicos de la actividad catalítica específica correspondiente. De esta manera, la subunidad  $\beta$ 1, con una función de tipo caspasa, tiene un residuo R45;  $\beta$ 2 con actividad tipo tripsina, tiene un residuo de E53; y  $\beta$ 5 con actividad tipo quimiotripsina, tiene un M45, tal como se ha reportado en el núcleo catalítico de otros organismos, incluidos microorganismos y eucariotas superiores [98].

Con respecto a los resultados obtenidos del análisis estructural *in silico*, todas las subunidades que conforman al proteosoma 20S en *N. fowleri* y *N. gruberi*, presentaron una estructura secundaria de tipo sándwich, la cual es clásica en las proteínas de este complejo. Esta estructura está dada por dos construcciones de cinco láminas beta antiparalelas, rodeadas por dos o tres hélices alfa en los

extremos, como se ha descrito en organismos como *T. acidophilum*, levadura y *H. sapiens* [100, 156, 163, 170].

Por otro lado, se determinó mediante ensayos de Western y dot blot, la presencia de algunas subunidades estructurales y catalíticas del proteosoma 20S en trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi* ( $\alpha$  1,  $\beta$ 7,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5) con pesos moleculares que van desde los 23 hasta los 28 kDa, correspondientes a lo reportado en otros microorganismos. Por ejemplo, en *E. histolytica* se ha descrito la presencia del proteosoma 20S, con proteínas entre 25 y 30 kDa detectadas mediante un anticuerpo diseñado para el reconocimiento de un motivo común a todas las subunidades  $\alpha$  [127]. Por otro lado, el proteosoma 20S también se identificó en una fracción enriquecida de proteasomas purificados de *T. foetus*, a través de una inmunotransferencia y utilizando un anticuerpo dirigido al proteosoma de *T. cruzi*, que detectó bandas de 22 a 32 kDa [124]. En otros protozoarios, como *L. mexicana*, se identificaron al menos seis subunidades, en un intervalo de peso molecular de 22-32 kDa [136] y en *T. gondii*, se detectaron tres bandas a diferentes pesos moleculares: 29, 30 y 32 kDa [153]. El reconocimiento de la subunidad  $\beta$ 7 del proteosoma mediante la metodología de dot blot y no por Western blot, podría deberse a que el anticuerpo utilizado está reconociendo la estructura tridimensional del epítipo en los extractos amibianos. En general, la estructura de toda la proteína se modifica en el proceso de desnaturalización durante el Western blot, en tanto que el principio metodológico que se utiliza en el dot blot, favorece el reconocimiento del epítipo 3D. Además, existen reportes que señalan que esta metodología es entre 10 a 1000 veces más sensible que la inmunotransferencia, con una especificidad mayor al 95%, la cual es comparable con lo obtenido en otros ensayos, tales como las pruebas de ELISA [171-173]. Una consideración de importancia para este punto del proyecto es lograr la purificación del proteosoma 20S de los trofozoítos de ambas especies amibianas, y llevar a cabo electroforesis de 2D y Western blot, utilizando anticuerpos producidos concretamente para las subunidades de estas amibas. Esto permitiría identificar específicamente a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de mayor relevancia para la actividad del complejo, de manera tal que se pueda establecer el peso molecular exacto de estas proteínas en el proteosoma del género *Naegleria*.

Con respecto a la localización subcelular del proteosoma en los trofozoítos de *Naegleria* spp., se observó que las subunidades se distribuyeron de manera homogénea en el citoplasma y en la periferia del núcleo. Esta localización corresponde a los reportes de distribución de este complejo en células eucariontes, en donde normalmente se ha encontrado al proteosoma 20S en el citoplasma, unido al retículo endoplásmico rugoso, cercano a las mitocondrias, anclado a la

membrana y de manera importante en el núcleo; además de que recientemente se ha reportado de forma extracelular [86, 91]. Cabe resaltar que su distribución aparentemente se encuentra regulada por el estado metabólico y el tipo celular del que se trate; así en el tejido embrionario, tumoral o en células de rápida división, este complejo catalítico se llega a acumular de forma más importante en el núcleo, comparado con otras áreas de la célula, incluyendo el citoplasma [174-176]. La distribución en *Naegleria* spp., se asemeja con lo reportado en otros protozoarios, tal es el caso de *T. foetus* en donde se sabe que, en cualquiera de las fases de su ciclo de vida, la distribución principal del proteosoma 20S es a nivel del citoplasma. Al igual que para *T. cruzi* y *D. discoideum*, aunque es importante mencionar que en estos microorganismos también se ha observado la localización del complejo a nivel nuclear. Lo que es contrario con los resultados de este estudio, pues en el caso de *Naegleria* spp. no fue posible determinar su presencia a este nivel [124, 134, 177]. Sin embargo, la localización exclusiva del proteosoma a nivel del citoplasma ha sido descrita también en otros microorganismos como *E. histolytica* y *T. gondii* [129, 153]. De igual manera, será necesario realizar experimentos de fraccionamiento subcelular que permitan separar las proteínas de citoplasma, núcleo y de membrana celular de los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*, y realizar ensayos de Western blot para cada una de las fracciones subcelulares obtenidas, de manera tal que se pueda confirmar la localización observada en estos resultados.

Una herramienta importante en este trabajo fueron los inhibidores específicos de la actividad del proteosoma, que se utilizaron para la caracterización bioquímica de su capacidad proteolítica, así como para evaluar su participación en diversos procesos celulares en estas amibas (proliferación y diferenciación). La utilización de inhibidores del proteosoma se ha reportado ampliamente en los últimos años, debido a su posible aplicación en tratamientos farmacológicos contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, autoinmidades y enfermedades infecciosas [115-117]. En el desarrollo de este trabajo, se utilizaron dos inhibidores específicos del proteosoma: lactacistina y MG-132. La lactacistina es un producto natural derivado del metabolismo de los actinomicetos, el cual se une de manera covalente e irreversible a la subunidad  $\beta 5$  (actividad de tipo quimiotripsina), aunque también se puede unir en menor medida a las actividades tipo tripsina ( $\beta 2$ ) y tipo caspasa ( $\beta 1$ ) [116, 117]. Por su parte, el MG-132 es un inhibidor de tipo péptido aldehído que se une de manera reversible a la subunidad con actividad de tipo quimiotripsina aunque se conoce que también inhibe parcialmente a otras actividades proteolíticas no relacionadas al proteosoma [116, 117]. La lactacistina y el MG-132 se han utilizado ampliamente en el estudio del proteosoma de protozoarios. En este trabajo, se demostró que la co-incubación de trofozoítos de *Naegleria* spp.

con estos inhibidores, en concentraciones ya reportadas en amibas de vida libre como *A. castellanii*, no afectó la viabilidad, aunque sí tuvo efecto durante la diferenciación a fase de quiste [132].

Por otro lado, una de las características que es primordialmente estudiada en el proteosoma 20S es su actividad proteolítica. En *Naegleria* spp., ésta fue evaluada mediante ensayos de proteólisis, utilizando sustratos específicos para cada subunidad. De esta manera, la actividad más importante encontrada fue la de tipo quimiotripsina, seguida por la de tipo tripsina y finalmente la de tipo caspasa; tal como se ha reportado en el proteosoma de eucariotas superiores [103, 178, 179]. Estas propiedades bioquímicas difieren de lo reportado para otros protozoarios, como *P. falciparum*, donde la actividad catalítica más importante es la de tipo tripsina, seguida de la actividad tipo quimiotripsina y finalmente la de tipo caspasa; lo que ha generado que, gracias a estas diferencias con el proteosoma de mamíferos, se proponga al núcleo catalítico 20S de este patógeno como un objetivo terapéutico específico para el tratamiento de la malaria [180]. Otros reportes señalan que para *T. brucei*, *L. chagasi* y *E. invadens*, la actividad de tipo de tripsina es la actividad proteolítica más importante [128, 137, 144]; mientras que en *T. foetus*, lo es la actividad de tipo caspasa [124]. De manera similar, estas diferencias vuelven al proteosoma 20S de estos microorganismos, posibles dianas terapéuticas importantes, considerando que este complejo proteolítico se encuentra relacionado en muchos casos con los mecanismos de diferenciación a fases infectivas, la proliferación o regulando la virulencia [120, 121, 140]. En contraste con estos reportes y de forma similar a los resultados encontrados en *Naegleria* spp., el proteosoma de *T. gondii*, *L. mexicana* y *D. discoideum* presenta como actividad catalítica más importante a la de tipo quimiotripsina [134, 136, 153]. Es importante señalar que esta actividad es la principal reportada para el proteosoma de células en mamíferos, como también se pudo comprobar con los resultados obtenidos de la actividad proteolítica del proteosoma en las células HUH-7 (hepatocarcinoma humano). Además, de que se conoce que esta actividad proteolítica es la más conservada evolutivamente, pues corresponde a la que presenta la única subunidad  $\beta$  del proteosoma de *T. acidophilum* [100].

Por otra parte, la incubación de los trofozoítos de *Naegleria* spp. con lactacistina y MG-132 causó una evidente disminución en todas las actividades proteolíticas evaluadas, siendo la de tipo quimiotripsina la más afectada, seguida de la actividad de tipo tripsina y finalmente la de tipo caspasa, probablemente debido a la especificidad de unión del inhibidor. Esto sugiere que existe una importante similitud en la secuencia de aminoácidos específicos que forman el sitio de unión de los inhibidores en los trofozoítos del género *Naegleria* spp. en comparación con el de la subunidad  $\beta$ 5 en otros organismos, incluyendo mamíferos o protozoarios. El efecto de estos

inhibidores también se ha estudiado en otros protozoarios, entre los que destacan *L. chagasi*, del cual se determinó que las actividades de tipo tripsina y quimiotripsina se inhibían de manera significativa por la incubación con lactacistina [137]. De manera similar, en *P. falciparum* se observa una inhibición casi completa de la actividad de tipo quimiotripsina y tipo caspasa, en presencia de la lactacistina, mientras que con MG-132 esta inhibición ocurre en la actividad de tipo tripsina [151]. Por su parte, en *T. foetus* se encontró que la lactacistina inhibe de manera significativa a las tres peptidasas mencionadas, siendo más específica la inhibición de la actividad tipo quimiotripsina, de manera muy similar al resultado encontrado en este estudio [124].

El proteosoma en los protozoarios, como se mencionó anteriormente, también se ha relacionado con múltiples funciones celulares como la proliferación, diferenciación y, en varios casos, en la virulencia; por lo que se decidió evaluar el papel de este complejo catalítico tanto en la proliferación como en la diferenciación a quiste de *N. fowleri* y *N. gruberi*. Primeramente, se evaluó el efecto de los inhibidores lactacistina y MG-132 en la proliferación. Con base a los resultados obtenidos a través de ensayos de MTT, se observó una disminución estadísticamente significativa de la tasa de proliferación en los trofozoítos tratados con las concentraciones establecidas para cada especie, lo que puede sugerir que la actividad del proteosoma 20S está relacionada con la proliferación de los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. gruberi*. De esta manera, en un futuro sería de interés el establecer exactamente cuáles son las proteínas (como factores de transcripción y ciclinas, entre otras) que está regulando la actividad del proteosoma 20S, en el ciclo celular de estas amibas.

El efecto mostrado en la proliferación de cada especie de la amiba es diferente; en los trofozoítos de *N. fowleri* ambos inhibidores causaron una disminución en la proliferación amibiana por al menos 48 h, y posteriormente (72 h) presentó una tendencia de aumento, que sería interesante analizar y que también puede deberse a la pérdida de la unión de los inhibidores a su sitio blanco en la subunidad  $\beta 5$ . Ya que se ha reportado la hidrólisis de la unión (subunidad  $\beta 5$  del proteosoma-inhibidor), tanto de la lactacistina como del MG-132, lo que llevaría a la recuperación de la actividad proteosomal y por lo tanto a la restauración de sus funciones [116]. Por otro lado, en los trofozoítos de *N. gruberi*, estos inhibidores también afectaron la proliferación, con un notable efecto amebostático que se conserva, al menos hasta las 72 h de co-incubación, para ambos inhibidores; sugiriendo un efecto diferente de la inhibición del proteosoma en la proliferación amibiana dependiente de la especie analizada. El papel del proteosoma en la proliferación de las amibas de vida libre ya ha sido descrito. Tal es el caso del trabajo realizado con *A. castellanii*, en la cual utilizando un enfoque farmacológico a través de varios inhibidores específicos entre los que se

incluyen lactacistina y MG-132, se encontró que estos dos no disminuían de manera significativa la tasa de proliferación de esta amiba. Sólo cuando se incubó con el inhibidor bortezomib se presentó un efecto amebostático similar al obtenido para *N. gruberi* en este reporte. Esto contribuye a explicar las diferencias encontradas en la proliferación e inhibición del proteosoma, dependientes del género o especie del organismo estudiado, así como del inhibidor utilizado [132]. Por otro lado, existen trabajos en los que se evaluó el efecto de la inhibición del proteosoma usando lactacistina y MG-132 a concentraciones crecientes, en las amibas *E. histolytica* y *E. invadens*. En estos trabajos se encontró que la incubación con lactacistina inhibe la proliferación de los trofozoítos, incluso a las concentraciones más bajas utilizadas para ambas amibas; mientras que la incubación con MG-132, requiere de concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$  para disminuir el crecimiento de *Entamoeba* spp. [130]. Otros protozoarios en los que se ha descrito una inhibición importante del crecimiento debido a la incubación con inhibidores del proteosoma, incluyen a *L. mexicana* [136], *L. chagasi* [137], *T. gondii* [154], *T. cruzi* [142], *T. foetus* [124], entre otros.

Por su parte, el papel del proteosoma en la diferenciación durante el ciclo de vida de algunos protozoarios patógenos se ha descrito en múltiples géneros. En *T. cruzi*, la incubación con lactacistina o MG-132, causa la inhibición de la transformación de tripomastigote en amastigote sin que se vea afectada su motilidad, morfología o capacidad de invasividad [142]. En *E. invadens*, el uso de lactacistina, clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona y MG-132, inhibió significativamente el enquistamiento de las amibas, lo que sugiere que la actividad catalítica de este complejo es necesaria para la diferenciación a la fase de resistencia de este género. Bajo estas condiciones, el desenquistamiento no se ve afectado por la inhibición del proteosoma [128, 130]. En *T. foetus*, la lactacistina evitó la transformación de la morfología en forma de pera a la forma endoflagelada; mientras que, si se usa un inhibidor de proteosoma no específico, como la gliotoxina, se inhibe la inversión de la forma endoflagelada a la forma de pera; arrojando al microorganismo en este estado y eventualmente causando su apoptosis [124, 125]. Finalmente, en *A. castellanii*, la incubación con inhibidores del proteosoma, afecta la capacidad de enquistamiento y desenquistamiento de la amiba; particularmente el tratamiento con lactacistina, mostró el mayor porcentaje de inhibición de la diferenciación a la fase de resistencia y su reversión en estas amibas [132]. Con respecto al género *Naegleria*, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con la literatura, al encontrarse que el tratamiento con lactacistina y MG-132 afectaron tanto la morfología como la tasa de rendimiento de enquistamiento para *N. fowleri* y *N. gruberi*; pero siendo más evidente los cambios generados por la lactacistina. Por lo tanto, se puede sugerir que, tal como en otros protozoarios, el complejo del proteosoma 20S participa en la diferenciación de *N. fowleri* y

*N. gruberi*, al menos en el proceso de enquistamiento, y de manera particular en los mecanismos que regulan la formación y estructura del quiste. Sería de interés realizar ensayos que permitan determinar el efecto de esta inhibición en el fenómeno de desenquistamiento, así como determinar si los quistes obtenidos a partir del tratamiento con los inhibidores conservan su viabilidad y por lo tanto la capacidad de reversión a trofozoíto.

La capacidad de las amibas del género *Naegleria* para diferenciarse en tres fases durante su ciclo de vida y la presencia de especies patógenas, especialmente la que afecta al humano *N. fowleri*, plantean la existencia de mecanismos de reciclamiento, remplazo y eliminación de proteínas. Tal como el sistema de ubiquitina-proteosoma, altamente eficiente y de rápida disponibilidad para la síntesis de proteínas, a partir de la degradación de secuencias peptídicas pre-existentes. Esto representaría un menor gasto energético para la célula, así como un mecanismo de recambio proteico rápido, que le permita la adaptación a diferentes condiciones ambientales, a través de la diferenciación a la fase de flagelado o a la de resistencia de quiste. También contribuiría a regular la presencia y actividad de factores de transcripción o proteínas inhibidoras, involucrados en la síntesis *de novo* de proteínas relevantes en estos cambios, así como las involucradas en mecanismos celulares como la proliferación, la resistencia al estrés y la virulencia.

La posible participación del proteosoma en la virulencia de *N. fowleri* fue descrita por Zysset-Burri et al., (2014) en el reporte del genoma de esta especie. A través de los resultados de electroforesis 1D, en combinación con un análisis de nano-LC MS/MS de los patrones proteicos de dos grupos de trofozoítos altamente patógenos versus uno de débil patogenicidad, se identificó dentro del grupo de las proteínas sobre-expresadas, una secuencia peptídica homóloga a la subunidad 8 del complejo regulador del proteosoma 19S (parte del proteosoma 26S). Esto podría sugerir que el proteosoma se encuentra potencialmente participando en la regulación de los mecanismos de patogenicidad, que inciden en la virulencia de *N. fowleri* [6].

Por otra parte, en un reporte reciente se realizaron ensayos de hibridación tipo Northern blot utilizando material genético obtenido de trofozoítos de *N. fowleri* mantenidos en cultivo axénico, así como de amibas recién recuperadas de cerebro de ratones infectados y de la cepa no patógena *N. gruberi*. En este trabajo se describió un incremento en la expresión de los genes que codifican para proteínas metabólicas, proteínas de movilidad, pero de manera importante para una subunidad del proteosoma 26S y de ubiquitina en *N. fowleri* de cultivo axénico, en comparación con los resultados en *N. gruberi*. Además, este aumento fue incluso mayor en trofozoítos recién recuperados de cerebro dependiendo del número correspondiente de pase sucesivo del que se

tratará. De esta manera, se sugiere que el sistema UPS está involucrado en el establecimiento de la MAP regulando el encendido/apagado de algunos factores de virulencia que le permiten a la amiba su adaptación en el hospedero [155].

Sin embargo, hasta el momento no existen otros reportes experimentales que describan la presencia o los procesos celulares en los que específicamente participa el proteosoma 20S en los trofozoítos del género *Naegleria*. Esta tesis constituye el primer trabajo donde se describe que, en estas amibas de vida libre, el proteosoma 20S está conformado por las subunidades estructurales  $\alpha$  y  $\beta$ , que presentan actividades catalíticas canónicas, con una localización intracelular y actividad proteolítica similar a la reportada tanto en otros protozoarios y en células eucariontes superiores y que, posee funciones se encuentran relacionadas con los procesos de proliferación y enquistamiento.

## CONCLUSIONES

El proteosoma 20S se encuentra presente en los trofozoítos pertenecientes al género *Naegleria*, tanto en especies no patógenas (*N. gruberi*), así como en la patógena *N. fowleri*, descrita como el agente etiológico de la MAP.

En estas amibas, el proteosoma se encuentra conformado de manera típica por subunidades estructurales y catalíticas que cuentan con los residuos, motivos y dominios propios de este complejo y que son homólogas a las reportadas en otros organismos. Su localización intracelular está dada principalmente a nivel del citoplasma y en la periferia nuclear. El perfil proteolítico del proteosoma 20S en *Naegleria* spp. se asemeja a lo descrito en otros organismos, siendo la actividad tipo quimiotripsina, la subunidad catalítica más importante. Por lo que es necesario analizar las diferencias entre las subunidades catalíticas del complejo amibiano con lo previamente descrito en otros organismos, en particular con *H. sapiens*, con el objetivo de encontrar posibles diferencias que sean susceptibles de ser explotadas en el desarrollo de tratamientos específicos, o para ser consideradas dentro de un esquema de tratamiento sinérgico con otros fármacos, que permiten retrasar o evitar el establecimiento de la MAP.

Asimismo, el proteosoma 20S participa en los mecanismos relacionados a la proliferación, tanto en *N. fowleri* como en *N. gruberi*. Por lo tanto, es interesante considerar que su inhibición específica en la amiba patógena podría impactar en la evolución de la enfermedad, si se considera la probable proliferación de los trofozoítos *in situ* durante la progresión de la infección a nivel de SNC.

La participación del proteosoma 20S en la diferenciación, específicamente en el enquistamiento amibiano, podría usarse para evitar el desarrollo de fases de resistencia que le permitan al microorganismo su permanencia y difusión en ambientes desfavorables, que incluyen, las aguas termales consideradas como una de las áreas de contagio de *N. fowleri* reportada para el ser humano.

## PERSPECTIVAS

- Establecer la participación del proteosoma 20S en el proceso de desenquistamiento de *Naegleria* spp. post-incubación con inhibidores del proteosoma.
- Confirmar la localización subcelular del proteosoma 20S, a través de metodologías de fraccionamiento subcelular, Western blot o MET.
- Aislar y purificar el proteosoma 20S a partir de trofozoítos de *Naegleria* spp. e identificar la estructura de barril típica, a través de MET.
- Establecer la participación *in vitro* del proteosoma 20S en los mecanismos de patogenicidad de los trofozoítos de *N. fowleri*.
- Realizar ensayos *in vivo*, utilizando trofozoítos de *N. fowleri* pre-incubados con inhibidores del proteosoma (curvas de sobrevivencia).
- Identificar a través de co-inmunoprecipitaciones a las proteínas blanco de la actividad del proteosoma 20S en los trofozoítos de *Naegleria* spp., con el objetivo de dilucidar algunos procesos celulares en los que incide la actividad de este complejo catalítico.
- Evaluar el efecto de inhibidores de diferentes grupos del proteosoma 20S, sobre la actividad y funciones del complejo.
- Identificar y caracterizar al complejo regulatorio 19S y a la proteína ubiquitina, en los trofozoítos de *Naegleria* spp.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Król-Turmińska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric Environ Med* 24(2), 254-260 (2017).
2. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34(9), 1001-1027 (2004).
3. Samba-Louaka A, Delafont V, Rodier MH, Cateau E, Héchard Y. Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS Microbiol Rev* 43(4), 415-434 (2019).
4. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(1), 1-26 (2007).
5. Clarke M, Lohan AJ, Liu B *et al.* Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* 14(2), R11 (2013).
6. Zysset-Burri DC, Müller N, Beuret C *et al.* Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC Genomics* 15, 496 (2014).
7. Detering H, Aebischer T, Dabrowski PW *et al.* First Draft Genome Sequence of *Balamuthia mandrillaris*, the Causative Agent of Amoebic Encephalitis. *Genome Announc* 3(5), (2015).
8. Greninger AL, Messacar K, Dunnebacke T *et al.* Clinical metagenomic identification of *Balamuthia mandrillaris* encephalitis and assembly of the draft genome: the continuing case for reference genome sequencing. *Genome Med* 7, 113 (2015).
9. Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML *et al.* The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* 140(5), 631-642 (2010).
10. Liechti N, Schürch N, Bruggmann R, Wittwer M. The genome of *Naegleria lovaniensis*, the basis for a comparative approach to unravel pathogenicity factors of the human pathogenic amoeba *N. fowleri*. *BMC Genomics* 19(1), 654 (2018).
11. Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* 213(3), 167-175 (2010).
12. Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 52(1), 114-133 (1988).
13. De Jonckheere JF. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp Parasitol* 145 Suppl, S2-9 (2014).
14. De Jonckheere JF. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool* 41, 309-342 (2002).
15. Alexeieff A. Sur les caracteres cytologiques et la systematique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannia* nov. gen.) et des amibes parasites des vertébrés (*Proctamoeba* nov. gen.). *Bull. soc. zool* 37, 55-74 (1912).

16. Opperdoes FR, De Jonckheere JF, Tielens AG. *Naegleria gruberi* metabolism. *Int J Parasitol* 41(9), 915-924 (2011).
17. González-Robles A, Cristóbal-Ramos AR, González-Lázaro M, Omaña-Molina M, Martínez-Palomo A. *Naegleria fowleri*: light and electron microscopy study of mitosis. *Exp Parasitol* 122(3), 212-217 (2009).
18. Weik RR, John DT. Cell and mitochondria respiration of *Naegleria fowleri*. *J Parasitol* 65(5), 700-708 (1979).
19. Fulton C. Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Annu Rev Microbiol* 31, 597-629 (1977).
20. Martínez-Castillo M, Cárdenas-Zuñiga R, Coronado-Velázquez D, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J Med Microbiol* 65(9), 885-896 (2016).
21. Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite? *Trends Parasitol* 36(1), 19-28 (2020).
22. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A *et al.* Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* 60(6), 399-405 (2012).
23. Schuster FL. Ultrastructure of Cysts of *Naegleria* spp: A Comparative Study. *J Protozool* 22(3), 352-359 (1975).
24. Chávez-Munguía B, Omaña-Molina M, Castañón G *et al.* Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *J Eukaryot Microbiol* 56(1), 66-72 (2009).
25. Chávez-Munguía B, Segovia-Gamboa N, Salazar-Villatoro L, Omaña-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *J Eukaryot Microbiol* 58(5), 463-468 (2011).
26. Werth JM, Kahn AJ. Isolation and preliminary chemical analysis of the cyst wall of the amoeba-flagellate *Naegleria gruberi*. *J Bacteriol* 94(4), 1272-1274 (1967).
27. Fulton C. *Naegleria*: A Research Partner For Cell and Developmental Biology. *J Eukaryot Microbiol* 40(4), 520-532 (1993).
28. Fritz-Laylin LK, Ginger ML, Walsh C, Dawson SC, Fulton C. The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Res Microbiol* 162(6), 607-618 (2011).
29. Siddiqui R, Ali IKM, Cope JR, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Trop* 164, 375-394 (2016).
30. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* 2(5464), 740-742 (1965).
31. De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 11(7), 1520-1528 (2011).

32. Carrasco-Yépez M, Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M *et al.* *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of alpha-D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitol Res* 112(10), 3615-3625 (2013).
33. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, Pacheco-Yépez J, Silva-Olivares A, Tsutsumi V, Shibayama M. Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitol Res* 106(3), 695-701 (2010).
34. Han KL, Lee HJ, Shin MH, Shin HJ, Im KI, Park SJ. The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol Res* 94(1), 53-60 (2004).
35. Jamerson M, Da Rocha-Azevedo B, Cabral GA, Marciano-Cabral F. Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins. *Microbiology* 158(Pt 3), 791-803 (2012).
36. Réveiller FL, Suh SJ, Sullivan K, Cabanes PA, Marciano-Cabral F. Isolation of a unique membrane protein from *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* 48(6), 676-682 (2001).
37. Flores-Huerta N, Sánchez-Monroy V, Rodríguez MA, Serrano-Luna J, Shibayama M. A comparative study of the membrane proteins from *Naegleria* species: A 23-kDa protein participates in the virulence of *Naegleria fowleri*. *Eur J Protistol* 72, 125640 (2020).
38. John DT, Cole TB, Jr., Marciano-Cabral FM. Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 47(1), 12-14 (1984).
39. Sohn HJ, Kim JH, Shin MH, Song KJ, Shin HJ. The *Nf-actin* gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* 106(4), 917-924 (2010).
40. Jeong SR, Kang SY, Lee SC, Song KJ, Im KI, Shin HJ. Decreasing effect of an anti-Nfa1 polyclonal antibody on the in vitro cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Korean J Parasitol* 42(1), 35-40 (2004).
41. Jeong SR, Lee SC, Song KJ *et al.* Expression of the *nfa1* gene cloned from pathogenic *Naegleria fowleri* in nonpathogenic *N. gruberi* enhances cytotoxicity against CHO target cells in vitro. *Infect Immun* 73(7), 4098-4105 (2005).
42. Tiewcharoen S, Malainual N, Junnu V, Chetanachan P, Rabablert J. Cytopathogenesis of *Naegleria fowleri* Thai strains for cultured human neuroblastoma cells. *Parasitol Res* 102(5), 997-1000 (2008).
43. John DT, John RA. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mammalian cell cultures. *Parasitol Res* 76(1), 20-25 (1989).
44. Marciano-Cabral FM, Fulford DE. Cytopathology of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. *Appl Environ Microbiol* 51(5), 1133-1137 (1986).

45. Brown T. Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. *J Med Microbiol* 12(3), 363-371 (1979).
46. Marciano-Cabral FM, Patterson M, John DT, Bradley SG. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *J Parasitol* 68(6), 1110-1116 (1982).
47. Young JD, Lowrey DM. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 264(2), 1077-1083 (1989).
48. Lowrey DM, Mclaughlin J. A multicomponent hemolytic system in the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Infect Immun* 45(3), 731-736 (1984).
49. Song KJ, Song KH, Kim JH *et al.* Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and in vitro cytotoxicity. *Parasitol Res* 103(2), 313-317 (2008).
50. Herbst R, Ott C, Jacobs T, Marti T, Marciano-Cabral F, Leippe M. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 277(25), 22353-22360 (2002).
51. Herbst R, Marciano-Cabral F, Leippe M. 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 (2004).
52. Chang SL. Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba. *Folia Parasitol* 26(3), 195-200 (1979).
53. Hysmith RM, Franson RC. Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim Biophys Acta* 711(1), 26-32 (1982).
54. Barbour SE, Marciano-Cabral F. *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta* 1530(2-3), 123-133 (2001).
55. Lam C, Jamerson M, Cabral G, Carlesso AM, Marciano-Cabral F. Expression of matrix metalloproteinases in *Naegleria fowleri* and their role in invasion of the central nervous system. *Microbiology* 163(10), 1436-1444 (2017).
56. Ferrante A, Bates EJ. Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun* 56(12), 3320-3321 (1988).
57. Serrano-Luna J, Cervantes-Sandoval I, Tsutsumi V, Shibayama M. A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. *J Eukaryot Microbiol* 54(5), 411-417 (2007).
58. Aldape K, Huizinga H, Bouvier J, Mckerrow J. *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp Parasitol* 78(2), 230-241 (1994).
59. Shibayama M, Martínez-Castillo M, Silva-Olivares A *et al.* Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology* 159(Pt 2), 392-401 (2013).

60. Coronado-Velázquez D, Betanzos A, Serrano-Luna J, Shibayama M. An *In Vitro* Model of the Blood-Brain Barrier: *Naegleria fowleri* Affects the Tight Junction Proteins and Activates the Microvascular Endothelial Cells. *J Eukaryot Microbiol* 65(6), 804-819 (2018).
61. Martínez-Castillo M, Ramírez-Rico G, Serrano-Luna J, Shibayama M. Iron-Binding Protein Degradation by Cysteine Proteases of *Naegleria fowleri*. *Biomed Res Int* 2015, 416712 (2015).
62. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, García-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology* 154(Pt 12), 3895-3904 (2008).
63. Lee J, Kim JH, Sohn HJ *et al.* Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitol Res* 113(8), 2765-2776 (2014).
64. Martínez-Castillo M, Cárdenas-Guerra RE, Arroyo R *et al.* Nf-GH, a glycosidase secreted by *Naegleria fowleri*, causes mucin degradation: an *in vitro* and *in vivo* study. *Future Microbiol* 12, 781-799 (2017).
65. Ferrante A, Thong YH. Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* 9(6), 599-601 (1979).
66. Shibayama M, Serrano-Luna J, Rojas-Hernández S, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Can J Microbiol* 49(3), 164-170 (2003).
67. Fritzing AE, Marciano-Cabral F. Modulation of a "CD59-like" protein in *Naegleria fowleri* amebae by bacteria. *J Eukaryot Microbiol* 51(5), 522-528 (2004).
68. Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis* 8(4), 201-206 (2010).
69. Siddiqui R, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 8(8), e3017 (2014).
70. John DT. Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Annu Rev Microbiol* 36, 101-123 (1982).
71. Martínez J, Duma RJ, Nelson EC, Moretta FL. Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study. *Lab Invest* 29(2), 121-133 (1973).
72. Rojas-Hernández S, Jarillo-Luna A, Rodríguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res* 94(1), 31-36 (2004).
73. Jarolim KL, Mccosh JK, Howard MJ, John DT. 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 (2000).

74. Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna J, García-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol Int* 57(3), 307-313 (2008).
75. Jahangeer M, Mahmood Z, Munir N *et al.* *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 47(2), 199-212 (2020).
76. Da Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009, 251406 (2009).
77. Behets J, Seghi F, Declerck P *et al.* Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Sci Technol* 47(3), 117-122 (2003).
78. Sparagano O, Drouet E, Brebant R, Manet E, Denoyel GA, Pernin P. Use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (cysts, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species. *J Clin Microbiol* 31(10), 2758-2763 (1993).
79. Baig AM, Kulsoom H, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis: amoebicidal effects of clinically approved drugs against *Naegleria fowleri*. *J Med Microbiol* 63(Pt 5), 760-762 (2014).
80. Bodge M, Cumpston A. Pharmacology of Drugs Used in Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Hematopoietic Cell Transplantation for Malignant Conditions*. (Ed.), Elsevier, 19-35 (2019).
81. Schuster FL, Rechthand E. *In vitro* effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* 8(5), 591-605 (1975).
82. Grace E, Asbill S, Virga K. *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrob Agents Chemother* 59(11), 6677-6681 (2015).
83. Cope JR, Conrad DA, Cohen N *et al.* 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 (2016).
84. Bellini NK, Santos TM, Da Silva MTA, Thiemann OH. The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. *Exp Parasitol* 187, 1-11 (2018).
85. Debnath A, Tunac JB, Galindo-Gómez S, Silva-Olivares A, Shibayama M, Mckerrow JH. Corifungin, a new drug lead against *Naegleria*, identified from a high-throughput screen. *Antimicrob Agents Chemother* 56(11), 5450-5457 (2012).
86. Tsakiri EN, Trougakos IP. The amazing ubiquitin-proteasome system: structural components and implication in aging. *Int Rev Cell Mol Biol* 314, 171-237 (2015).
87. Kimura Y, Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* 147(6), 793-798 (2010).
88. Doherty FJ, Dawson S, Mayer RJ. The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis. *Essays Biochem* 38, 51-63 (2002).

89. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31(1), 137-155 (2006).
90. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479 (1998).
91. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med* 30(4), 191-296 (2009).
92. Rivett AJ. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J* 291 ( Pt 1), 1-10 (1993).
93. Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 295-317 (1999).
94. Gan J, Leestemaker Y, Sapmaz A, Ovaa H. Highlighting the Proteasome: Using Fluorescence to Visualize Proteasome Activity and Distribution. *Front Mol Biosci* 6, 14 (2019).
95. Kish-Trier E, Hill CP. Structural biology of the proteasome. *Annu Rev Biophys* 42, 29-49 (2013).
96. Tomko RJ, Jr., Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem* 82, 415-445 (2013).
97. Gille C, Goede A, Schloetelburg C *et al.* A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J Mol Biol* 326(5), 1437-1448 (2003).
98. Groll M, Bochtler M, Brandstetter H, Clausen T, Huber R. Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem* 6(2), 222-256 (2005).
99. Harris J. Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. *J Mol Biol* 46(2), 329-335 (1969).
100. Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268(5210), 533-539 (1995).
101. Seemüller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 268(5210), 579-582 (1995).
102. Konstantinova IM, Tsimokha AS, Mittenberg AG. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* 267, 59-124 (2008).
103. Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3), 19-31 (2004).
104. Orino E, Tanaka K, Tamura T, Sone S, Ogura T, Ichihara A. ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. *FEBS Lett* 284(2), 206-210 (1991).
105. Reidlinger J, Pike AM, Savory PJ, Murray RZ, Rivett AJ. Catalytic properties of 26 S and 20 S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *J Biol Chem* 272(40), 24899-24905 (1997).

106. Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* 121(1), 19-29 (1998).
107. Tian G, Finley D. Cell biology: Destruction deconstructed. *Nature* 482(7384), 170-171 (2012).
108. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(1), 12-36 (2009).
109. Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci* 35(11), 634-642 (2010).
110. Collins GA, Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169(5), 792-806 (2017).
111. Raynes R, Pomatto LC, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol Aspects Med* 50, 41-55 (2016).
112. Ben-Nissan G, Sharon M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules* 4(3), 862-884 (2014).
113. Yu H, Matouschek A. Recognition of Client Proteins by the Proteasome. *Annu Rev Biophys* 46, 149-173 (2017).
114. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-1068 (1999).
115. Huber EM, Groll M. Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angew Chem Int Ed Engl* 51(35), 8708-8720 (2012).
116. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8(8), 739-758 (2001).
117. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8(10), 397-403 (1998).
118. Alexandrova A, Petrov L, Georgieva A, Kirkova M, Kukan M. Effects of proteasome inhibitor, MG132, on proteasome activity and oxidative status of rat liver. *Cell Biochem Funct* 26(3), 392-398 (2008).
119. Tomoda H, Omura S. Lactacystin, a proteasome inhibitor: discovery and its application in cell biology. *Yaku. zas.* 120(10), 935-949 (2000).
120. Muñoz C, San Francisco J, Gutiérrez B, González J. Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. *Biomed Res Int* 2015, 141526 (2015).
121. Paugam A, Bulteau AL, Dupouy-Camet J, Creuzet C, Friguet B. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends Parasitol* 19(2), 55-59 (2003).
122. Emmerlich V, Scholze H, Gillin FD, Bakker-Grunwald T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. *Parasitol Res* 87(2), 112-115 (2001).

123. Emmerlich V, Santarius U, Bakker-Grunwald T, Scholze H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 100(1), 131-134 (1999).
124. Pereira-Neves A, Gonzaga L, Menna-Barreto RF, Benchimol M. Characterisation of 20S Proteasome in *Tritrichomonas foetus* and Its Role during the Cell Cycle and Transformation into Endoflagellar Form. *PLoS One* 10(6), e0129165 (2015).
125. Pereira-Neves A, Menna-Barreto RF, Benchimol M. The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and induces an irreversible pseudocystic transformation and cell death in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 115(8), 3057-3069 (2016).
126. O'donoghue AJ, Bibo-Verdugo B, Miyamoto Y *et al.* 20S Proteasome as a Drug Target in *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 63(11), (2019).
127. Scholze H, Frey S, Cejka Z, Bakker-Grunwald T. Evidence for the existence of both proteasomes and a novel high molecular weight peptidase in *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 271(11), 6212-6216 (1996).
128. González J, Frevert U, Corey EJ, Nussenzweig V, Eichinger D. Proteasome function is required for encystation of *Entamoeba invadens*. *Arch Med Res* 28 Spec No, 139-140 (1997).
129. Sánchez R, Alagón A, Stock RP. *Entamoeba histolytica*: intracellular distribution of the proteasome. *Exp Parasitol* 102(3-4), 187-190 (2002).
130. Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res* 88(5), 454-459 (2002).
131. Hellberg A, Sommer A, Bruchhaus I. Primary sequence of a putative non-ATPase subunit of the 26S proteasome from *Entamoeba histolytica* is similar to the human and yeast S2 subunit. *Parasitol Res* 85(5), 417-420 (1999).
132. Siddiqui R, Saleem S, Khan NA. The effect of peptidic and non-peptidic proteasome inhibitors on the biological properties of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Exp Parasitol* 168, 16-24 (2016).
133. Moon EK, Chung DI, Hong YC, Ahn TI, Kong HH. *Acanthamoeba castellanii*: gene profile of encystation by ESTs analysis and KOG assignment. *Exp Parasitol* 119(1), 111-116 (2008).
134. Schauer TM, Nesper M, Kehl M *et al.* Proteasomes from *Dictyostelium discoideum*: characterization of structure and function. *J Struct Biol* 111(2), 135-147 (1993).
135. Masson P, Lundin D, Soderbom F, Young P. Characterization of a REG/PA28 proteasome activator homolog in *Dictyostelium discoideum* indicates that the ubiquitin- and ATP-independent REG-gamma proteasome is an ancient nuclear protease. *Eukaryot Cell* 8(6), 844-851 (2009).
136. Robertson CD. The *Leishmania mexicana* proteasome. *Mol Biochem Parasitol* 103(1), 49-60 (1999).

137. Silva-Jardim I, Horta MF, Ramalho-Pinto FJ. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. *Acta Trop* 91(2), 121-130 (2004).
138. Dubessay P, Blaineau C, Bastien P *et al.* Cell cycle-dependent expression regulation by the proteasome pathway and characterization of the nuclear targeting signal of a *Leishmania major* Kin-13 kinesin. *Mol Microbiol* 59(4), 1162-1174 (2006).
139. Christensen CB, Jorgensen L, Jensen AT *et al.* Molecular characterization of a *Leishmania donovani* cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. *Biochim Biophys Acta* 1500(1), 77-87 (2000).
140. González J, Ramalho-Pinto FJ, Frevert U *et al.* Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J Exp Med* 184(5), 1909-1918 (1996).
141. De Diego JL, Katz JM, Marshall P *et al.* The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* 40(4), 1053-1062 (2001).
142. Cardoso J, Soares MJ, Menna-Barreto RF *et al.* Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis. *Parasitol Res* 103(4), 941-951 (2008).
143. Hua S, To WY, Nguyen TT, Wong ML, Wang CC. Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 78(1-2), 33-46 (1996).
144. Wang CC, Bozdech Z, Liu CL *et al.* Biochemical analysis of the 20 S proteasome of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 278(18), 15800-15808 (2003).
145. To WY, Wang CC. Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 404(2-3), 253-262 (1997).
146. Mutomba MC, To WY, Hyun WC, Wang CC. Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 90(2), 491-504 (1997).
147. Mutomba MC, Wang CC. The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. *Mol Biochem Parasitol* 93(1), 11-22 (1998).
148. Li H, Bogyo M, Da Fonseca PC. The cryo-EM structure of the *Plasmodium falciparum* 20S proteasome and its use in the fight against malaria. *FEBS J* 283(23), 4238-4243 (2016).
149. Gantt SM, Myung JM, Briones MR *et al.* Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 42(10), 2731-2738 (1998).
150. Li H, Ponder EL, Verdoes M *et al.* Validation of the proteasome as a therapeutic target in *Plasmodium* using an epoxyketone inhibitor with parasite-specific toxicity. *Chem Biol* 19(12), 1535-1545 (2012).
151. Wang L, Delahunty C, Fritz-Wolf K *et al.* Characterization of the 26S proteasome network in *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep* 5, 17818 (2015).

152. González-López L, Carballar-Lejarazú R, Arrevillaga Boni G *et al.* Lys48 ubiquitination during the intraerythrocytic cycle of the rodent malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*. *PLoS One* 12(6), e0176533 (2017).
153. Paugam A, Creuzet C, Dupouy-Camet J, Roisin MP. Evidence for the existence of a proteasome in *Toxoplasma gondii*: intracellular localization and specific peptidase activities. *Parasite* 8(4), 267-273 (2001).
154. Shaw MK, He CY, Roos DS, Tilney LG. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 121 ( Pt 1), 35-47 (2000).
155. Yun H-C, Park S-J, Kong H-H, Chung D-I. Isolation of genes induced in *Naegleria fowleri* during mouse brain passage. *Eur J Protistol* 38(2), 105-111 (2002).
156. Harshbarger W, Miller C, Diedrich C, Sacchettini J. Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with carfilzomib. *Structure* 23(2), 418-424 (2015).
157. Bradford MM. 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 (1976).
158. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10(5), 609-618 (2002).
159. Kikuchi J, Iwafune Y, Akiyama T *et al.* Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics* 10(15), 2769-2779 (2010).
160. Hirano H, Kimura Y, Kimura A. Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J Proteomics* 134, 37-46 (2016).
161. Kimura Y, Takaoka M, Tanaka S *et al.* N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J Biol Chem* 275(7), 4635-4639 (2000).
162. Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, Monaco JJ. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J* 16(17), 5363-5375 (1997).
163. Da Fonseca PC, He J, Morris EP. Molecular model of the human 26S proteasome. *Mol Cell* 46(1), 54-66 (2012).
164. Ng CL, Fidock DA, Bogyo M. Protein Degradation Systems as Antimalarial Therapeutic Targets. *Trends Parasitol* 33(9), 731-743 (2017).
165. Velichutina I, Connerly PL, Arendt CS, Li X, Hochstrasser M. Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast. *EMBO J* 23(3), 500-510 (2004).
166. Yao Y, Toth CR, Huang L *et al.* alpha5 subunit in *Trypanosoma brucei* proteasome can self-assemble to form a cylinder of four stacked heptamer rings. *Biochem J* 344 Pt 2, 349-358 (1999).
167. Rabl J, Smith DM, Yu Y, Chang SC, Goldberg AL, Cheng Y. Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol Cell* 30(3), 360-368 (2008).

168. Fort P, Kajava AV, Delsuc F, Coux O. Evolution of proteasome regulators in eukaryotes. *Genome Biol Evol* 7(5), 1363-1379 (2015).
169. Chen P, Hochstrasser M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86(6), 961-972 (1996).
170. Groll M, Ditzel L, Lowe J *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386(6624), 463-471 (1997).
171. Bernstein JM, Stokes CE, Fernie B. Comparative sensitivity of <sup>125</sup>I-protein A and enzyme-conjugated antibodies for detection of immunoblotted proteins. *J Clin Microbiol* 25(1), 72-75 (1987).
172. Fido RJ, Tatham AS, Shewry PR. Western blotting analysis. *Methods Mol Biol* 49, 423-437 (1995).
173. Vera-Cabrera L, Rendón A, Díaz-Rodríguez M, Handzel V, Laszlo A. Dot blot assay for detection of anti-diacyltrehalose antibodies in tuberculous patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(5), 686-689 (1999).
174. Knuehl C, Seelig A, Brecht B, Henklein P, Kloetzel PM. Functional analysis of eukaryotic 20S proteasome nuclear localization signal. *Exp Cell Res* 225(1), 67-74 (1996).
175. Liu CW, Corboy MJ, Demartino GN, Thomas PJ. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 299(5605), 408-411 (2003).
176. Sixt SU, Dahlmann B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta* 1782(12), 817-823 (2008).
177. Gutiérrez B, Osorio L, Motta MC *et al.* Molecular characterization and intracellular distribution of the alpha 5 subunit of *Trypanosoma cruzi* 20S proteasome. *Parasitol Int* 58(4), 367-374 (2009).
178. Dahlmann B. Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Arch Biochem Biophys* 591, 132-140 (2016).
179. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272(40), 25200-25209 (1997).
180. Li H, O'donoghue AJ, Van Der Linden WA *et al.* Structure- and function-based design of *Plasmodium*-selective proteasome inhibitors. *Nature* 530(7589), 233-236 (2016).