

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**Caracterización y análisis de la expresión de la
proteína de membrana de 23 kDa involucrada en la
virulencia de *Naegleria fowleri***

TESIS

Que presenta:

M. en C. NADIA GUADALUPE FLORES HUERTA

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

Directora de tesis:

Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas

CIUDAD DE MÉXICO

ENERO DEL 2020

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Antes que todo, agradezco profundamente a mi tutor la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas por todo el apoyo brindado. A mis asesores, la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, el Dr. José Luis Rosales Encina y el Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez del mismo Departamento. El Dr. José de Jesús Serrano Luna del Departamento de Biología Celular y la Dra. Virginia Sánchez Monroy de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, por toda su colaboración, observaciones y consejos realizados para la elaboración de este proyecto.

Agradezco también al CONACyT, ya que durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU/Becario: 560536/299941, y con el apoyo del fondo SEP-CONACYT 237523.

Dedicatorias

Mi profundo agradecimiento al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, particularmente al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en tan prestigiosa institución.

Agradezco a dios y a la virgen por darme la fortaleza e iluminar mi espíritu en aquellos momentos en que necesitaba mucha fuerza.

Con todo mi corazón agradezco y dedico todos estos años de trabajo a mi madre, todo lo que hago es pensando en ti, y lo que soy es por ti. Te amo madre mía, eres mi ejemplo y mi fuerza. A mi familia que amo, a mi tía Chave que es como otra madre, mis bebes y a mi princesita, agradezco por todo el amor y fuerza que me dan, en honor a todos esos momentos que no podemos pasar juntos. Recuerden que siempre los llevo en mi corazón y pensamientos.

A mi pareja, por estar ahí todos estos años dándome amor, apoyándome y estimulándome a seguir, gracias por darme tu hombro en esas noches-días cuando más te necesité. Te amo Jevit.

A todos mis amigos, los viejos y los nuevos. Gracias por esas palabras cuando no podía más, por su hombro y por todos los abrazos que me dan, aún en la distancia me fortalecen. Gracias a mi compañera de penas y alegrías, porque si tú no hubieras estado apoyando, no habría podido seguir luchando, te quiero Pau, y a ti amiga Vero, gracias por soportar todos mis dramas, por tus consejos y por todas esas palabras de aliento cuando más las necesité.

Gracias a mis compañeros-amigos de laboratorio y de generación, por enseñarme todo lo que saben y conocen, por su valioso tiempo, conocimiento, consejos, palabras de aliento y sobre todo por su amistad. Gracias a ti Angy, por todo lo que me enseñaste, por tu apoyo y amistad.

TODOS son parte importante de mi formación y siempre los llevaré en mi pensamiento y corazón.

Abreviaciones

| | |
|---------|--|
| AVL | Amibas de vida libre |
| MAP | Meningoencefalitis amibiana primaria |
| SNC | Sistema nervioso central |
| MDCK | Madin-Darby Canine Kidney |
| SH-SY5Y | Human neuroblastoma |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| PMN | Polimorfonuclear |
| PCR | Polimerase chain reaction |
| CHO | Chinese hamster ovary |
| GED | Gránulos electron densos |
| SFB | Suero fetal bovino |
| ETA | Extractos totales amibianos |
| MET | Microscopia electrónica de transmisión |
| PI | Pre-inmune |
| CTCF | Cell total corrected fluorescence |
| MTT | 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| WB | Western blot |
| ITS | Internal transcribed spacers |
| MEC | Matriz extracelular |

| Contenido | Pág. |
|---|-------------|
| Resumen | 6 |
| Abstract | 7 |
| 1. Introducción | 8 |
| 1.1 Amibas de vida libre | 8 |
| 1.3 <i>Naegleria</i> , morfología y ciclo de vida | 9 |
| 1.4 Fisiopatología de la MAP | 12 |
| 1.5 Epidemiología de la MAP | 13 |
| 1.6 Respuesta inmunológica durante la MAP | 14 |
| 1.7 Diagnóstico y tratamiento | 15 |
| 1.8 Mecanismos de patogenicidad y virulencia de <i>N. fowleri</i> | 16 |
| 1.9 Antecedentes directos | 18 |
| 2. Justificación | 21 |
| 3. Hipótesis | 22 |
| 4. Objetivo general | 23 |
| Objetivos específicos | 23 |
| 5. Estrategia experimental | 24 |
| 6. Material y métodos | 25 |
| 7. Resultados | 32 |
| 8. Discusión | 49 |
| 9. Conclusión | 57 |
| 10. Perspectivas | 58 |
| 11. Bibliografía | 59 |

Resumen

El género *Naegleria* pertenece al grupo de las amibas de vida libre (AVL), las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Sólo *Naegleria fowleri* es capaz de producir meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), una enfermedad aguda y fulminante que afecta el sistema nervioso central (SNC). Durante las etapas iniciales de la infección, el moco actúa como primera línea de defensa en la respuesta inmune innata. Sin embargo, algunas amibas son capaces de penetrar e invadir el neuroepitelio olfatorio, llegar a los bulbos olfatorios y producir una extensa reacción inflamatoria. Diversos factores de virulencia que involucran proteínas de membrana han sido descritos en *N. fowleri*, entre los cuales se mencionan las glicoproteínas de membrana, proteínas tipo integrina, proteasas y naeglerioporos; éstos participan en diversos procesos involucrados con la adherencia, fagocitosis y la citotoxicidad desarrollada por *N. fowleri*. Soportando la importancia de la membrana plasmática en los procesos de reconocimiento e interacción entre el parásito y el hospedero; por lo que el estudio de las proteínas de membrana plasmática de este protozoario es de gran interés. El objetivo del presente trabajo fue identificar y analizar la expresión de una proteína de membrana de 23 kDa (Nf23) en *N. fowleri* y en las especies no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*. Para ello se purificaron y se analizaron los perfiles de proteínas de membrana de trofozoítos de *Naegleria*. El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica y el diseño de un péptido inmunogénico para la producción de anticuerpos policlonales monoespecíficos se usaron para analizar la proteína Nf23. La detección y la localización de la proteína Nf23 fue desarrollada en los trofozoítos de *N. fowleri* y de las especies no patógenas. Adicionalmente, se realizó el análisis de la expresión del mensajero para Nf23, demostrando que es altamente expresada en trofozoítos de *N. fowleri* cultivados en condiciones axénicas y en amibas recién recuperadas de cerebro de ratón en comparación con *N. lovaniensis* y *N. gruberi*. Además, los ensayos de inhibición del efecto citopático en células MDCK y SH-SY5Y evaluaron el papel de la proteína Nf23. Los resultados en conjunto demostraron la sobreexpresión de la proteína Nf23 en *N. fowleri* en comparación con las especies no patógenas, sugiriendo su participación en la virulencia de la amiba.

Abstract

The genus *Naegleria* belongs to the free-living amoebas group (FLA), which are widely distributed in nature. However, only *Naegleria fowleri* is capable of causing primary amoebic meningoencephalitis (PAM), an acute and fulminant disease that affects the central nervous system (CNS). During the initial stages of infection, mucus act as the first line of defense in the innate immune response. However, some amoebae are able to penetrate and invade the olfactory neuroepithelium until reach the olfactory bulbs producing an extensive inflammatory reaction. *N. fowleri* has various virulence factors that can involve membrane proteins, among them membrane glycoproteins, integrin-like proteins, proteases and naeglerioporos are mentioned; which are actively participating in several processes involved with adhesion, phagocytosis and cytotoxicity. Supporting the importance of the plasma membrane in the recognition and interaction between the parasite and the host. So the study of plasma membrane proteins of this protozoan is of great interest. The objective of this work was to identify and analyze the expression of a 23 kDa (Nf23) membrane protein in *N. fowleri* and also in the non-pathogenic species *N. lovaniensis* and *N. gruberi*. For this purpose, the protein profiles of *N. fowleri* trophozoite membrane proteins were purified and analyzed, as well as the non-pathogenic species. Likewise, the bioinformatic analysis of the amino acid sequence of this protein and the design of an immunogenic peptide for the production of monospecific polyclonal antibodies against Nf23 was performed. The detection and localization of Nf23 protein was assayed in trophozoites of *N. fowleri* and of the non-pathogenic amoebae. Additionally, messenger expression analysis was performed for this protein. The results showed that Nf23 is highly expressed in trophozoites of virulent *N. fowleri* grown under axenic conditions and in freshly recovered amoebae from the infected mouse brain compared to those of *N. lovaniensis* and *N. gruberi*. In addition, the inhibition assays of the cytopathic effect in MDCK and SH-SY5Y cells evaluated the role of the Nf23 protein. The results as a whole demonstrated the overexpression of the Nf23 protein in *N. fowleri* compared to non-pathogenic species, suggesting its participation in the virulence of the amoeba.

1. Introducción

Las amibas de vida libre (AVL), comprenden un amplio grupo de protozoarios con una extensa distribución en la naturaleza (Siddiqui et al. 2016; Trabelsi et al. 2012). En comparación con otras enfermedades causadas por protozoarios de interés médico, las infecciones causadas por las AVL destacan por presentar una virulencia extrema y carencia de un tratamiento efectivo, lo que produce el desarrollo de una enfermedad agresiva y aguda (Martínez-Castillo et al. 2016).

Durante la primera mitad del siglo XX, las AVL se consideraban ubicuas en suelos y agua por lo que eran conocidas como "amibas del suelo" no patógenos. Culbertson en 1958, propuso el potencial patogénico de las AVL como causantes de infecciones humanas (Baig 2015). A partir de estos hallazgos sobre la patogenicidad de algunas especies de AVL se inició el estudio de estos protozoarios con énfasis en su capacidad de producir daño.

De manera particular, en el género *Naegleria* se han descrito más de cuarenta especies, de las cuales solo *N. fowleri* produce meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), cuya tasa de mortalidad es superior al 95% (De Jonckheere 2011; De Jonckheere 2014), por lo que en los últimos años, se ha incrementado el interés por estudiar los mecanismos de patogenicidad de este protozoario para poder evaluar el desarrollo de la enfermedad en los seres humanos.

1.1 Amibas de vida libre

Las AVL son protozoarios ubicuos, pueden encontrarse en suelo, polvo, aire, agua de mar y de ríos, agua potable, albercas, aguas residuales, soluciones de lavado de ojos y de lentes de contacto, unidades de diálisis y de lavado dental, etc. Debido a que estas amibas tienen la capacidad de existir como organismos de vida libre en la naturaleza, y ocasionalmente invadir un hospedero y producir daño en los tejidos

del hospedero, se les ha nombrado amibas anfizoicas (Visvesvara 2013; Visvesvara et al. 2007).

Cuatro géneros de AVL, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia* son responsables de infecciones oportunistas y no oportunistas en los seres humanos y en otros animales (Schuster y Visvesvara 2004a, Schuster y Visvesvara 2004b). En el presente proyecto se estudiaron las proteínas de membrana de *N. fowleri* agente etiológico de la MAP, que produce una enfermedad mortal no oportunista presente en niños y adultos jóvenes con historia reciente de natación. Adicionalmente, se realizará una comparación con las especies no patógenas más estudiadas, *N. lovaniensis*, la cual es la especie más relacionada filogenéticamente; y con *N. gruberi*, la cual es la más alejada y ha sido principalmente estudiada para el conocimiento de la biología celular y como modelo de transformación de fases morfológicas (Schuster y Visvesvara 2004a; Trabelsi et al. 2012; Visvesvara et al. 2007).

1.2 *Naegleria*, morfología y ciclo de vida

Naegleria fue estudiada principalmente como modelo de transformación morfológica por su capacidad de flagelar. El nombre de *N. fowleri*, surge después de que Malcolm Fowler, la reconoce por primera vez como agente causal de la MAP en Australia (Carter 1970).

N. fowleri es un protozooario patógeno no oportunista ampliamente distribuido en la naturaleza (Cateau et al. 2014; Marciano-Cabral 1988; Trabelsi et al. 2012); con capacidad anfizoica, ya que pueden ser de vida libre o actuar como microorganismo patógeno (Visvesvara et al. 2007). En la actualidad, más de 40 especies de *Naegleria* han sido descritas (De Jonckheere 2011; De Jonckheere 2014) , de las cuales solo *N. fowleri* es capaz de producir la MAP, una enfermedad aguda y fatal del sistema nervioso central (SNC) (Schuster y Visvesvara 2004a; Trabelsi et al. 2012); otras especies como *N. australiensis*, *N. itálica* y

N. philipinensis pueden ser patógenos para el modelo de ratón y producirles MAP; sin embargo, no han sido identificadas en casos humanos (Visvesvara et al. 2007).

N. fowleri es capaz de crecer a temperaturas de hasta 45°C y tolerar condiciones de crecimiento hostiles (Chang 1978; Lam et al. 2019); se alimenta de bacterias, algas, hongos y otras partículas orgánicas. Es un organismo principalmente aerobio, y la glucosa es esencial para su crecimiento. Además, en estudios *in vitro* se ha demostrado que puede soportar rangos de pH de 4.6 a 9.5 (Cateau et al. 2014; Lam et al. 2019; Marciano-Cabral 1988; Siddiqui et al. 2016). En su ciclo de vida presenta tres estadios, el flagelado, el quiste y el trofozoíto. Este último es el estado vegetativo que puede reproducirse; presenta un diámetro de 10-25 µm, tiene una forma pleomórfica, con su parte anterior ancha y la posterior estrecha. El extremo posterior presenta una estructura de 2 µm de largo llamada uroide (Carter 1970).

El trofozoíto se mueve mediante la formación de pseudópodos formados de ectoplasma hialino (John 1982; Marciano-Cabral 1988); se le observa claramente un gran núcleo redondeado, con un nucléolo de localización central electrodensos y muy evidente (González-Robles et al. 2009; Marciano-Cabral 1988). El citoplasma contiene numerosas mitocondrias, múltiples ribosomas, vacuolas digestivas, vacuolas contráctiles, retículo endoplásmico liso y rugoso, y un aparato primitivo similar al Golgi. También se han observado lisosomas primarios y secundarios; además, presentan bocas fagocíticas (amebostomas) que son extensiones citoplasmáticas de la superficie utilizadas para ingerir bacterias, levaduras y desechos celulares (Herman et al. 2018; Marciano-Cabral 1988). Los trofozoíto de *N. fowleri* se reproducen por fisión binaria. La división nuclear es inusual, ya que la membrana nuclear permanece intacta y el nucléolo persiste, dicho mecanismo se conoce como criptomitosis o promitosis (González-Robles et al. 2009).

El estadio de flagelado mide 10-16 µm de diámetro, por lo general presenta dos flagelos aunque pueden presentarse más de 2 flagelos; se le han observado numerosas vacuolas, gránulos densos, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y ribosomas (John 1982; Marciano-Cabral 1988; Patterson et al. 1981).

El quiste es la fase resistente, mide de 7-15 μm de diámetro, posee un retículo endoplásmico rugoso con cisternas que contienen material fibrilar denso y vesículas de 50-500 nm de diámetro que están frecuentemente asociadas a la membrana plasmática. El quiste es esférico y de doble pared con un endoquiste grueso y un ectoquiste delgado estrechamente unidos. Estudios con blanco de calcofluor sugieren que la pared del quiste está principalmente compuesta de beta polisacáridos (β -1-4) y de quitina. Además, posee poros u ostiolo; se han descrito cubiertas mucosas u opérculos que sellan cada ostiolo. Los quistes completamente formados tienen 10-15 μm de diámetro, y un pequeño espacio peritrófico entre la pared del quiste y la membrana plasmática. En muchos quistes el grosor de la pared es irregular con material fibrilar compacto (Chávez-Munguía et al. 2009; Chávez-Munguía et al. 2011; John 1982; Marciano-Cabral 1988; Martínez et al. 1971).

Cuando las personas están en contacto con agua contaminada con trofozoítos de *N. fowleri*, estos se adhieren a la mucosa nasal, penetran la mucosa olfatoria, llegan al plexo nervioso, lamina cribosa, penetran la fila olfatoria y a través de los nervios olfatorios llegan a los bulbos olfatorios, produciendo una extensa reacción inflamatoria que conduce a la MAP (Figura 1) (Jarolim et al. 2000; Martínez et al. 1973; Rojas-Hernández et al. 2004).

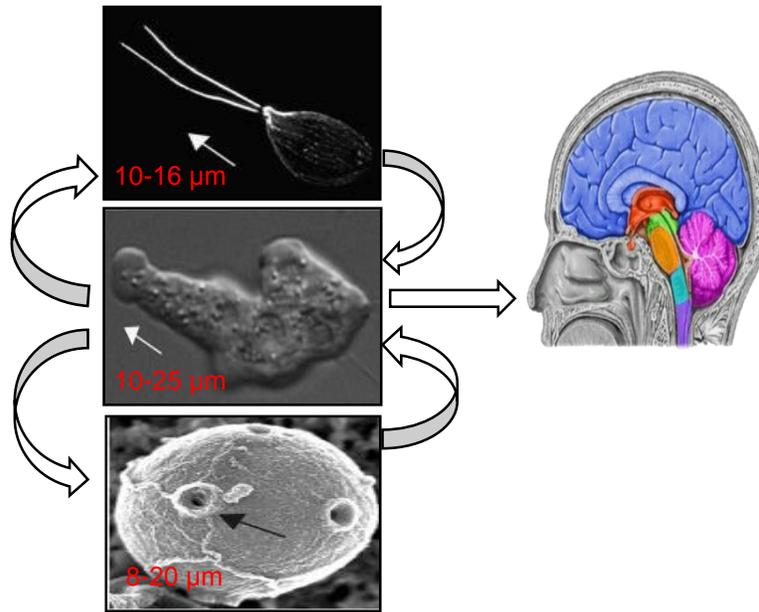


Figura 1. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*. El flagelado, trofozoíto y quiste; el trofozoíto se adhiere a la mucosa nasal, cruza el neuroepitelio olfatorio, migra a través de los nervios olfatorios y se instala en los bulbos olfatorios produciendo la MAP.

1.3 Fisiopatología de la MAP

La MAP es una enfermedad aguda y fatal que afecta el SNC (Martínez-Castillo et al. 2016; Siddiqui et al. 2016). Produce en el cerebro y las meninges una inflamación aguda, hemorragia y una extensa necrosis (Cervantes-Sandoval et al. 2008b; Jarolim et al. 2000; Martínez et al. 1973; Rojas-Hernández et al. 2004). La muerte regularmente ocurre dentro del décimo al catorceavo día (Movahedi et al. 2012; Schuster y Visvesvara 2004a). Dentro del cuadro clínico se presentan síntomas y signos que incluyen dolor de cabeza intenso, náusea, vómito en proyectil, fiebre elevada (38.5-41°C), anomalías en el comportamiento, incluyendo letargo, convulsiones, confusión, diplopía, comportamiento extraño y rigidez de la nuca con signos Kerning y Brudzinski positivos. La presión intracraneal generalmente se eleva a 600 mm H₂O o superior, el aumento de la presión intracraneal y herniación cerebral suelen ser la causa de la muerte (Heggie 2010; Heggie y Kupper 2017).

El líquido cefalorraquídeo (LCR) puede variar de un color grisáceo a blanco amarillento, puede ser rojo en las etapas avanzadas y el número de eritrocitos puede aumentar hasta 24,600 mm³ (Visvesvara et al. 2007). La cuenta de glóbulos blancos, con predominio de polimorfonucleares (PMN) puede variar de 300 células/mm³ hasta 26,000/mm³. La concentración de proteína cambia de 100 mg/100 ml hasta 1000 mg/100 ml (Trabelsi et al. 2012). La mayoría de las lesiones se encuentran en la base de los bulbos olfatorios, pero en las etapas avanzadas de la MAP se suelen encontrar prácticamente en todo el cerebro (Visvesvara 2013; Visvesvara et al. 2007).

Los bulbos olfatorios del paciente se caracterizan por tener una necrosis hemorrágica y generalmente están rodeadas por exudado purulento. Los hemisferios cerebrales son generalmente suaves, edematosos y congestionados. Las leptomeninges (aracnoides y piamadre) están muy congestionadas y la corteza cerebral también muestra numerosas áreas hemorrágicas superficiales (Schuster y Visvesvara 2004a; Visvesvara et al. 2007).

1.4 Epidemiología de la MAP

La mayoría de los casos de MAP causados por *N. fowleri* se adquieren generalmente por actividades recreativas en aguas frescas o calentadas artificialmente durante la temporada de verano (Cateau et al. 2014; Martínez-Castillo et al. 2016). Los más afectados son niños y adultos jóvenes con buena salud. Aunque la MAP todavía se considera un trastorno poco común, los reportes se incrementan cada año; se reportan de 250 (De Jonckheere 2011; De Jonckheere 2014) a más de 430 casos (Jahangeer et al. 2019 ; Trabelsi et al. 2012) en Australia, Estados Unidos, Gran Bretaña, Nueva Zelanda, Irán, Pakistán, India, Taiwán, México, Cuba, Japón, Tailandia, Hong Kong, etc.

Particularmente en México, se han reportado más de 25 casos confirmados, la mayoría en la región noroeste del país con sólo un caso tratado con éxito (Vargas-Zepeda et al. 2005).

Como prácticamente es una enfermedad mortal sólo alrededor del 5% de los pacientes sobreviven, se considera un problema serio de salud pública (De Jonckheere 2011; De Jonckheere 2014; Schuster y Visvesvara 2004a). Entre el 2008-2016, se han reportado 111-139 casos de MAP en Estados Unidos de Norteamérica (Jahangeer et al. 2019 ; Yoder et al. 2010). Sin embargo, es importante resaltar que no existe a nivel mundial o nacional estudios epidemiológicos rigurosos que puedan brindarnos cifras certeras de los casos de MAP.

1.5 Respuesta inmunológica durante la MAP

Por estudios inmunohistoquímicos de los eventos tempranos de la infección realizados en el modelo murino, se ha podido observar que las amibas quedan embebidas en el moco (Cervantes-Sandoval et al. 2008b; Rojas-Hernández et al. 2004). Sin embargo, esta barrera innata es insuficiente, ya que las amibas invaden el neuroepitelio olfatorio, cruzan la placa cribosa y se instalan en los bulbos olfatorios.

Experimentalmente, se ha demostrado que las mucinas tienen la capacidad de inhibir la adhesión de los trofozoítos a las células epiteliales (Cervantes-Sandoval et al. 2008a). Recientemente se demostró que los trofozoítos de *N. fowleri* presentan actividad de una glicosidasa que es capaz de degradar la mucina (Martínez-Castillo et al. 2017), lo que pudiera explicar la ineficiencia de la barrera mucosa.

Otros estudios han demostrado el papel fundamental de los neutrófilos y los macrófagos como los principales tipos celulares presentes en la infección (Carrasco-Yépez et al. 2019; Contis-Montes de Oca et al. 2016; Marciano-Cabral y Cabral 2007). Además, se ha descrito que la respuesta inflamatoria de tipo agudo participa activamente en el daño que se produce en el SNC (Cervantes-Sandoval et al. 2008b).

N. fowleri induce la expresión y secreción de MUC5AC y de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que corrobora que las mucinas son factores de resistencia a la infección al impedir la adhesión de las amibas al neuroepitelio olfatorio (Cervantes-Sandoval et al. 2009). Estos resultados sugieren que la inmunidad innata puede jugar un papel más importante que la inmunidad adquirida en la resistencia a la infección por *N. fowleri* (Marciano-Cabral y Cabral 2007).

Por otro lado, las AVL se encuentran entre los protozoos con los que los seres humanos están más expuestos, ya sea a través del contacto directo con el suelo o el agua, o bien por los quistes que por efecto del aire pueden llegar a la mucosa nasal (De Jonckheere 2011). La respuesta inmune humoral contra *N. fowleri* ha sido evaluada tanto en animales (roedores) como en humanos, reportando diversos títulos de anticuerpos específicos para *N. fowleri* en niños, y en calostro de mujeres aparentemente sanas, en muestras de suero y saliva de pacientes hospitalizados, así como, en muestras de suero de mamíferos silvestres y roedores (De Jonckheere 2011; Lares-Jiménez et al. 2018; Shibayama et al. 2003; Visvesvara et al. 2007).

1.6 Diagnóstico y tratamiento de la MAP

Debido a que no hay características clínicas distintivas que diferencian la MAP con otro tipo de meningoencefalitis incluyendo las piógenas (bacterias y virus), es imperioso que la comunidad médica tratante desarrolle una historia clínica completa y obtenga información sobre el contacto del paciente con el agua dulce, incluyendo aguas termales; además es trascendental que el diagnóstico diferencial se lleve a cabo rápidamente.

El diagnóstico oportuno se obtiene mediante un examen microscópico del LCR recién extraído, para visualizar las amibas móviles (Grace et al. 2015; Visvesvara et al. 2007) y mediante la prueba de enflagelación, que consiste en incubar los trofozoítos obtenidos por centrifugación del LCR en agua destilada estéril durante aproximadamente 2 h hasta poder observar por microscopia de campo claro a la fase de flagelado (Heggie 2010; Martínez-Castillo et al. 2016). Los trofozoítos se

pueden identificar también mediante tinciones como Giemsa o Wright a partir de muestras de LCR (Trabelsi et al. 2012). Actualmente, los métodos de diagnóstico basados en la biología molecular han sido incluidos, debido a su alta sensibilidad y especificidad, sumado con la rapidez del resultado. Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten la rápida detección y cuantificación del microorganismo (Grace et al. 2015; Jahangeer et al. 2019).

Por otro lado, debido a que no existe un tratamiento específico contra esta enfermedad se han realizado ensayos *in vitro* e *in vivo* que han demostrado que *N. fowleri* es sensible al antifúngico anfotericina B (AMB), por lo que es el fármaco de elección en el tratamiento de MAP solo o en combinación con otros antibióticos (Grace et al. 2015; Schuster y Visvesvara 2004a; Vargas-Zepeda et al. 2005).

1.7 Mecanismos de patogenicidad y virulencia de *N. fowleri*

La patogenicidad amibiana consiste en procesos complejos que incluyen mecanismos contacto dependiente e independiente, los cuales promueven el daño, invasión y la muerte celular de la célula blanco. Uno de los principales factores independientes de contacto analizados son las proteasas. Por ejemplo, las cisteína proteasas tienen un papel importante en la invasión y supervivencia intracelular en un gran número de parásitos patógenos y son críticas para la invasión intracelular. Por lo que desde hace tiempo, se ha investigado la participación de las proteasas en la capacidad citolítica y mucinolítica de *N. fowleri* (Cervantes-Sandoval et al. 2008a; Martínez-Castillo et al. 2017).

Recientemente se identificaron secuencias que codifican para dos cisteínas proteasas tipo catepsina B, que podrían estar involucradas en la invasión al tejido del huésped vía proteólisis de colágeno y fibronectina. Además, de participar en la evasión del sistema inmunológico del huésped por proteólisis de las inmunoglobulinas (Lee et al. 2014). También se ha identificado la presencia de fosfolipasas con actividad citolítica capaz de producir destrucción de la membrana celular, y mediante la actividad de elastasa le facilita la destrucción del tejido del

huésped (Ferrante y Bates 1988). Existen reportes de diversas proteasas y metaloproteasas con capacidad de degradar diferentes proteínas y células (Aldape et al. 1994; Lam et al. 2017; Lee et al. 2014; Serrano-Luna et al. 2007; Shibayama et al. 2013; Vyas et al. 2015).

A pesar de las investigaciones realizadas, el mecanismo citolítico de *N. fowleri* aún se conoce poco. Recientemente, se ha reportado que *N. fowleri* induce la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno, matando a las células blanco, por un mecanismo conocido como necroptosis (Song et al. 2011). Así mismo, se ha descrito la presencia de sistemas tripanotión y glutatión reductasa en *N. fowleri* que le ayudan a resistir los mecanismos de estrés oxidativo y la toxicidad del oxígeno intracelular (Ondarza et al. 2006; Ondarza et al. 2003).

Sin embargo, existen otros factores que juegan un papel importante en el daño que produce *N. fowleri* a la célula blanco. Dentro de éstos se encuentran los factores dependientes de contacto; se ha identificado y caracterizado una proteína de choque térmico 70 kDa en *N. fowleri* (Song et al. 2008). Se ha sugerido que esta proteína juega un papel importante en las respuestas de adaptación de los parásitos, pudiendo participar en una variedad de procesos esenciales, incluyendo el plegamiento de proteínas, así como su participación en la producción de efecto citopático. *N. fowleri* tiene una gran capacidad de producir efecto citopático y fagocitosis (Marciano-Cabral et al. 1982; Marciano-Cabral y Fulford 1986). Se ha observado que al ser co-cultivada *N. fowleri* con células de ovario de hámster chino (CHO) la proteína denominada Nfa1 se re-localiza en pseudópodos y en las bocas fagocíticas, sugiriendo un papel importante en la actividad fagocítica de la amiba (Kang et al. 2005; Sohn et al. 2010). También, las proteínas formadoras de poros (naeglerioporos A y B) participan en la lisis de las células blanco (Herbst et al. 2004; Herbst et al. 2002).

Dado que se ha reportado que *N. fowleri* resiste el daño a las proteínas del complemento, se ha investigado este fenómeno; se ha observado la formación de vesículas en la membrana de la amiba que atrapaban el complejo de ataque a la membrana, impidiendo de esta manera su eliminación (Toney y Marciano-Cabral

1994). Además, se ha identificado una proteína de membrana similar a la molécula CD-59 de humano que posiblemente tenga la capacidad de inhibir la formación del complejo de ataque a la membrana y así resistir a la lisis por complemento (Fritzinger et al. 2006).

Recientemente mediante estudios ultraestructurales, se han observado gránulos electrón-densos (GED) en trofozoítos altamente virulentos de *N. fowleri* que pudieran participar en eventos citopáticos y citolíticos sobre las células MDCK (Chávez-Munguía et al. 2014). Actualmente se conoce que las proteínas del citoesqueleto y GTPasas de la familia Rho se encuentra altamente relacionadas en el proceso de invasión de *N. fowleri* durante el desarrollo de la MAP (Jamerson et al. 2017). Todos estos estudios nos permiten conocer con más detalle los mecanismos y las herramientas moleculares que utiliza el patógeno para causar daño. Sin embargo, aún falta mucho por identificar e investigar posibles blancos amibianos que nos permitan combatir esta enfermedad aguda y mortal.

1.8 Antecedentes directos

Diversos estudios se han dirigido a conocer y comprender los mecanismos de patogenicidad que desarrollan los microorganismos patógenos para producir daño. La superficie celular de los protozoarios patógenos desempeña un papel fundamental al establecer contacto con la célula hospedera, permitiendo realizar diversos procesos como reconocimiento, adhesión, transporte celular, entre otros. En este sentido es de gran relevancia conocer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el daño producido por *N. fowleri* sobre el neuroepitelio olfatorio. En diversos trabajos se ha reportado la relevancia de las proteínas de membrana en la patogenicidad de diferentes microorganismos como virus, bacterias y protozoarios. La complejidad y la diversidad proteica pueden estar relacionadas con los mecanismos de daño que despliega *N. fowleri*.

En un trabajo se ha analizado las diferencias y similitudes de la superficie celular entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. Los autores observaron importantes diferencias

entre ambas especies a nivel de superficie de membrana; *N. fowleri* posee una superficie más gruesa, en comparación con *N. lovaniensis* cuya superficie es más compacta y de apariencia granular. Adicionalmente, a partir de las proteínas de superficie se observaron diferencias en el patrón protéico de las amibas; para *N. fowleri* se observaron bandas con pesos moleculares de 220, 25 y 20 kDa, mientras que para *N. lovaniensis* se observaron bandas de 120 y 96 kDa. Demostrando que existen diferencias a nivel de membrana entre ambas especies. Los autores concluyeron que posiblemente estas diferencias estén relacionadas con la patogenicidad de este protozooario (González-Robles et al. 2007).

Así mismo, se han realizado estudios sobre las diferencias en la cantidad de glicoconjugados de superficie en trofozoítos de *N. fowleri* y de *N. gruberi*; *N. fowleri* presenta en su superficie mayores niveles de residuos de α -D-manosa, α -D-glucosa y α -L-fucosa, en comparación con los trofozoítos de *N. gruberi* (Cervantes-Sandoval et al. 2010). Recientemente, se corroboró por ensayos *in vivo* que los glicoconjugados de superficie con residuos de α -D-manosa de *N. fowleri* participan en la adhesión de los trofozoítos a la mucosa nasal. Los autores concluyeron que la inhibición de la adhesión de los trofozoítos promueve la sobrevivencia de los ratones en un 40% (Carrasco-Yépez et al. 2013).

Por otro lado, a partir de los estudios de los mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* se ha identificado una proteína similar a integrina con importante participación en la adhesión y citotoxicidad amibiana (Han et al. 2004). Recientemente, se ha demostrado que *N. fowleri* y *N. lovaniensis* exhiben un patrón diferencial de invasión y adhesión a proteínas de la matriz extracelular; las amibas presentan un mayor nivel de adhesión a las glicoproteínas laminina 1, fibronectina y colágeno tipo I. Dichos resultados sugieren que las proteínas tipo integrina desempeñan un papel importante en el reconocimiento y en la adherencia de *N. fowleri* a la matriz extracelular (Jamerson et al. 2012). A la fecha, estos trabajos reportan la presencia de proteínas de membrana que posiblemente participen de forma directa o indirecta en el reconocimiento del tejido del hospedero.

Por estudios de proteómica se han comparado dos fenotipos de *N. fowleri*, cuya virulencia es regulada y dependiente del cultivo celular en el que se encuentran. Los trofozoítos altamente virulentos fueron cultivados en medio PYNFH y en medio Nelson, los trofozoítos débilmente virulentos fueron cultivados en medio PYNFH (Burri et al. 2012). Los resultados demostraron que los trofozoítos altamente virulentos tienen una mayor expresión de proteínas involucradas en la polimerización y despolimerización de los filamento de actina (formina, severina, vilina, y actina 1 y 2); así como en las proteína ciclofilina involucrada en la permeabilidad mitocondrial, la proteína de choque térmico 70 y la proteína de membrana Mp2CL5 (Reveiller et al. 2001; Zysset-Burri et al. 2014). Con todos estos trabajos realizados, es importante investigar y conocer de manera más detallada el proteoma celular de la amiba patógena *N. fowleri* con el objetivo de identificar y conocer las proteínas involucradas en los mecanismos de patogenicidad de la amiba. Las proteínas de membrana plasmática son una de las principales moléculas involucradas en el proceso de reconocimiento e invasión a las células blanco.

2. Justificación

En el estudio de los procesos de daño producidos por agentes infecciosos existe un elevado interés en conocer y comprender los mecanismos que utilizan los microorganismos patógenos para producir la enfermedad. La superficie celular de los protozoarios patógenos juega un papel importante en la interacción con el glicocalix y con las proteínas de membrana plasmática de la célula hospedera; permitiendo realizar diversos procesos como el reconocimiento, adhesión, señalización y transporte celular. Particularmente en *N. fowleri* se conoce muy poco sobre el proteoma de la membrana plasmática. Debido a esto es de gran interés analizar estas moléculas; ya que el estudio de las proteínas que pueden participar como factores de virulencia en esta amiba es de gran importancia. A partir del enriquecimiento de proteínas de membrana de trofozoítos de *N. fowleri*, se identificó una proteína de 23 kDa. Se desconoce el papel que desempeña dicha proteína en los mecanismos de patogenicidad que despliega este microorganismo. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue analizar la proteína para poder conocer su posible participación en la virulencia de *N. fowleri*.

3. Hipótesis

La proteína de membrana de 23 kDa presenta una mayor expresión en los trofozoítos de *N. fowleri* que en las especies no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*, la cual puede estar involucrada en la virulencia de *N. fowleri*.

4. Objetivos

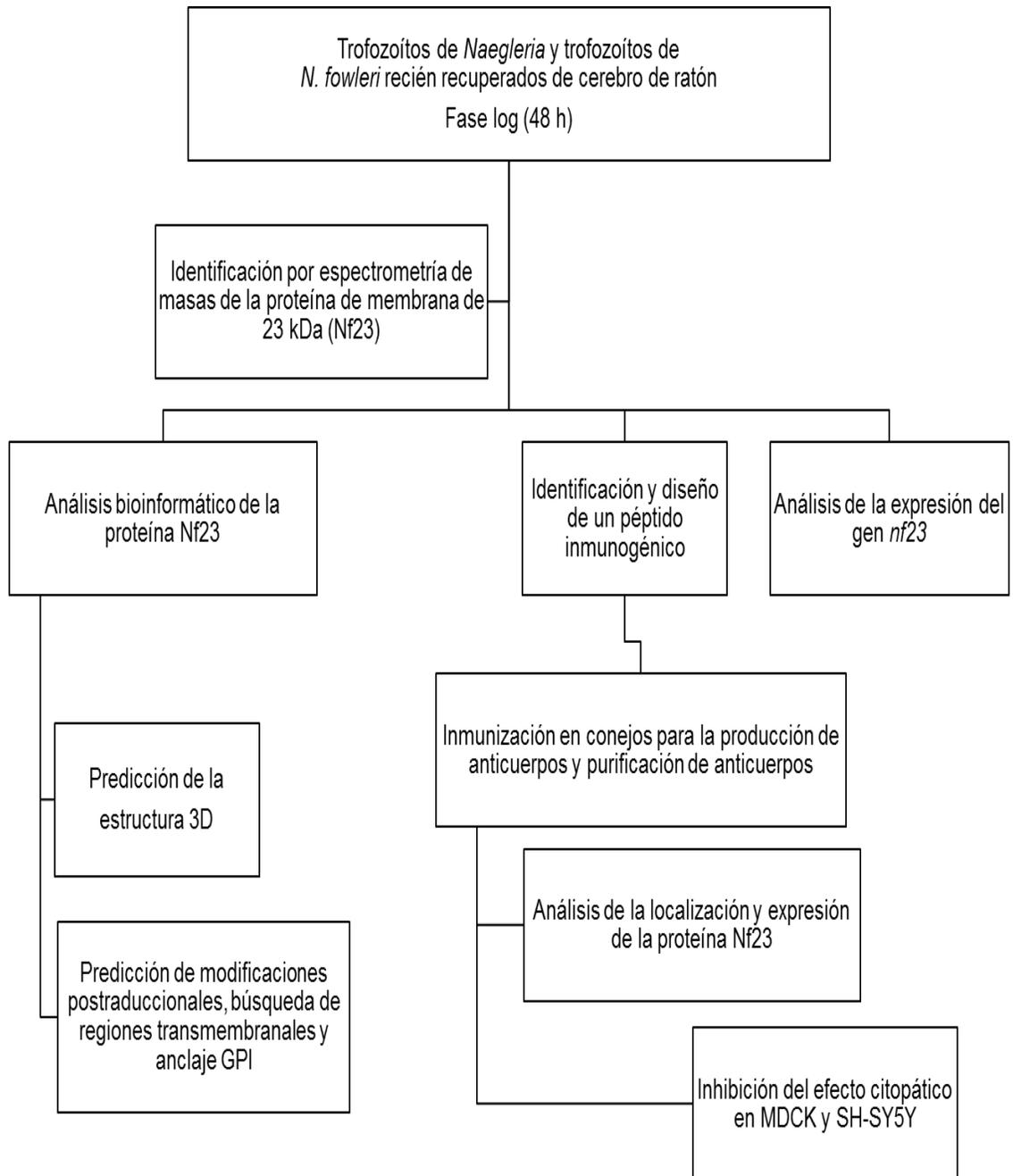
Objetivo general:

- Analizar la participación de la proteína membrana de 23 kDa y su posible papel en la virulencia de *N. fowleri*

Objetivos específicos:

- Realizar el análisis bioinformático de la proteína de 23 kDa de *N. fowleri*
- Analizar y comparar la expresión del mensajero de la proteína de 23 kDa en *N. fowleri* y las especies no patógenas *N. gruberi* y *N. lovaniensis*
- Evaluar la presencia y la localización celular de la proteína de 23 kDa en trofozoítos de *N. fowleri* y en las amibas no patógenas
- Analizar el papel de la proteína de 23 kDa en el daño celular producido por trofozoítos de *N. fowleri*

5. Estrategia experimental



6. Material y métodos

6.1 Cultivos amibianos

La cepa patógena *N. fowleri* (ATCC 30808) y las cepas no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi* fueron amablemente donados por el Dr. Govinda Visvesvara (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, Estados Unidos). Los trofozoítos fueron cultivados en condiciones axénicas en medio de bactocasitona al 2% (Becton Dickinson, NY, EUA.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Microlab, Ciudad de México, México) a 37°C para *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, mientras que *N. gruberi* se mantuvo a temperatura ambiente. Todas las cepas fueron cosechadas durante la fase logarítmica de crecimiento (48 h).

6.2 Líneas celulares

Las células MDCK fueron cultivadas en medio de crecimiento MEM, y las de neuroblastoma (SH-SY5Y) en medio DMEM/F12 (Gibco, Boston, MA), suplementadas con SFB al 10% al 37°C y mantenidas en una atmosfera de 5% de CO₂.

6.3 Protocolos experimentales de manejo de animales

El comité institucional IACUC aprobó los protocolos de manejo de animales; para la inmunización y la producción de anticuerpos, utilizamos un conejo macho Nueva Zelanda de 2 semanas de edad (Número de identificación 0414-08) (Martínez-Castillo et al. 2017). También se usaron ratones Balb/c de 3-4 semanas de edad para el análisis de la expresión de la proteína Nf23 a partir de amibas recuperadas del cerebro (número de identificación 0248-17) (Cervantes-Sandoval et al. 2008b). Nuestra institución cumple con todas las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, la cual está certificada por la ley nacional (NOM-062-ZOO-1999). Todos los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de ketamina/xilacina al final de los experimentos y fueron tratados de acuerdo el Panel de Eutanasia AVMA 2000.

6.4 Extracción de proteínas de membrana de los trofozoítos de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. gruberi*

Se obtuvieron extractos totales amibianos (ETA) como fue descrito previamente (Serrano-Luna et al. 2007). En resumen, los ETA se obtuvieron mediante ocho ciclos de congelación-descongelación en amortiguador de lisis (NaCl 150 mM, amortiguador Tris-base 50 mM pH 8.0 y Tritón X-100 2% en PBS) con inhibidores de proteasas (Roche, Basilea, Suiza). Para obtener las proteínas de membrana de cada especie de amiba se utilizó el Kit de extracción de proteínas de membrana Mem-PER Plus (Thermo Scientific, MA, EUA.). Se utilizaron 5×10^5 trofozoítos y se lavaron con solución de lavado celular y centrifugaron a 300 g durante 5 min. El paquete celular se re-suspendió en un amortiguador de permeabilización durante 15 min a 4°C y se centrifugó a 16,000 g durante 15 min. Los sobrenadantes que contenían las proteínas citosólicas fueron almacenados. El paquete celular fue incubado con el amortiguador de solubilización durante 30 min a 4°C y se centrifugó durante 15 min a 16,000 g a 4°C. Todas las fracciones obtenidas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.5 Microscopia electrónica de transmisión

Dicha herramienta metodológica se utilizó para corroborar que la purificación de las proteínas de membrana se realizará a partir de los fragmento de membrana obtenidos con el Kit mencionado anteriormente, antes de incubar con el amortiguador de solubilización, el paquete celular de las tres especies de *Naegleria* fue procesado por microscopía electrónica de transmisión (MET). Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.4). En seguida, las muestras fijadas se lavaron dos veces con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador. Las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se trataron con óxido de propileno y se incluyeron en resina epóxica. Los cortes semi finos se tiñeron con azul de toluidina. Las secciones finas (70 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Electron Microscopy

Sciences, PA, EUA.). Posteriormente fueron analizadas en el MET (ZEISS 910, Oberkochen, Alemania).

6.6 Perfil de proteínas por SDS-PAGE

Para evaluar el perfil diferencial de las proteínas de los ETA y las proteínas de membrana purificadas de las tres especies de *Naegleria* se realizaron SDS-PAGE. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976), y fue ajustada a una concentración de 50 µg de proteína para cada especie de amibas. Las muestras fueron resueltas en geles de SDS-PAGE al 12% y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie. Para la identificación de proteínas, las bandas de interés se enviaron para su identificación por espectrometría de masas (ESI-LC-MS/MS) (CINVESTAV-IPN, Irapuato, México). Los péptidos resultantes se analizaron y se buscaron en las bases de datos de *N. fowleri* y de *N. gruberi* para identificar a las proteínas mediante huellas peptídicas.

6.7 Análisis de secuencia aminoacídica

Del análisis de espectrometría de masas, se identificaron cuatro péptidos, los cuales empalmaron en una secuencia de 229 aminoácidos (NF0017140) del genoma de *N. fowleri* (<http://amoebadb.org/amoeba/>). Dicha secuencia se utilizó para realizar el análisis bioinformático de la proteína. Para estimar la estructura secundaria, utilizamos dos servidores web diferentes: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> y <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/> (Kelley et al. 2015; Yang and Zhang 2015). Para identificar las modificaciones pos-traduccionales potenciales, y la búsqueda de péptidos señal, pases transmembranales y/o anclaje tipo GPI utilizamos el Portal de Recursos de Bioinformática Expasy (<https://www.expasy.org/proteomics>). El análisis de la predicción de la función de la proteína de membrana se realizó con el servidor web COFACTOR, de acuerdo con los términos de ontología génica (GO). Dicho servidor utiliza las propiedades estructurales de las proteínas (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>), el CscoreGO es el puntaje de confianza del rango de predicción de valores (0-1), un valor más alto indica una mejor confianza en la función predicha (Roy et al. 2012; Zhang et al. 2017).

6.8 Expresión del mensajero de *Nf23* por ensayo qRT-PCR

Se utilizaron trofozoítos de las tres especies de *Naegleria* a partir de los cuales se realizó la extracción del ARN total por el método Trizol de acuerdo con el protocolo del fabricante (Ambion, Life Technologies, CA, EUA.). La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente usando Epoch (BioTek, VT, EUA.). La integridad del ARN fue verificada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los ARN aislados fueron tratados con DNasa I (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA.), para evitar la contaminación del ADN genómico. La síntesis de cADN se realizó utilizando el kit SuperScript First-Strand de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA.). El análisis y la comparación de los niveles de expresión del gen *Nf23* de las tres especies de *Naegleria* se realizó por qRT-PCR en el sistema de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, CA, EUA.), por el monitoreo del aumento de fluorescencia en tiempo real utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA.). Se realizaron protocolos de curva de fusión para garantizar la especificidad de los productos de amplificación. Los iniciadores específicos se diseñaron utilizando el software Primer3, se sintetizaron comercialmente (T4 OLIGO, Guanajuato, México) y la actina se utilizó como control interno. *Nf23* sentido: (5'GCACAATCAACAAGATGGAAG3'), *Nf23* antisentido: (5'GCTAAGAGGAATAGAGGCCAAA3'), *actina* sentido: (5'TGTTGCCATTCAAGCTGTCT3'), *actina* antisentido: (5'ACGACCAGCCAAATCCAAT3'). La cuantificación relativa de *Nf23*, se calculó utilizando el método CT, que utiliza la fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001). La significación estadística entre las tres especies de trofozoítos de *Naegleria* se calculó mediante la comparación de las medias utilizando la prueba t con el software GraphPad Prism 6.

6.9 Diseño del péptido inmunogénico y producción de anticuerpos

Las regiones inmunogénicas de la secuencia de 229 aminoácidos fueron identificadas utilizando servidores que buscan epítomos de células B en una secuencia antigénica (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) y

<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>) (Saha and Raghava 2006). La secuencia peptídica seleccionada comprendió los aminoácidos 159-174 (QVTASTPSSFVLHNQQ), la cual se sintetizó y conjugó a KLH (GL Biochem, Shanghai, China). Un conejo macho Nueva Zelanda fue inmunizado por vía subcutánea e intramuscular con 1 mg de péptido-KLH en presencia del adyuvante Titer-Max. Posteriormente, el conejo recibió dos refuerzos con el péptido-KLH durante un intervalo de 10 días entre cada inmunización. Al finalizar el periodo de inmunización, para la obtención del anticuerpo las gamma globulinas del suero se precipitaron con sulfato de amonio saturado, posteriormente se realizó la diálisis con un amortiguador de solución salina de boratos, la cual fue remplazada 3 veces al día durante 4 días consecutivos a 4°C y en agitación constante, dicho anticuerpo fue utilizado en los ensayos de WB, inmunofluorescencia indirecta y de Dot blot. El suero pre-inmune (PI) que se obtuvo antes de la inmunización se usó como control negativo en todos los experimentos. La titulación del anticuerpo se realizó mediante el método de ELISA y WB.

6.9. 1 Ensayos de Western blot y Dot blot

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976), y fue ajustada a una concentración de 50 µg de proteína para cada especie de amibas. Para los ensayos de detección de la proteína Nf23 por Western blot (WB), los ETA y las proteínas de membrana purificadas de las tres especies de *Naegleria* fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 12% y posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (Millipore, MA, EUA.). Para los ensayos de Dot blot, se absorbieron 10 µg de proteína en una membrana de nitrocelulosa. En ambos ensayos las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0.05% y posteriormente lavadas cuatro veces con TBS-Tween al 0.05%, al finalizar se incubaron con el anticuerpo primario conejo anti-NF23 diluido 1:2,000 durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente con el anticuerpo secundario IgG HRP cabra anti-conejo (Jackson Immuno Research, PA, EUA.) diluido 1:10,000 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La actina se utilizó como control de carga, el anticuerpo primario fue diluido 1:1, 000, y el anticuerpo

secundario IgG HRP chivo anti-ratón se diluyó 1:2,500 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando reactivo de luminol (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA.). El análisis de densidad óptica de las bandas y puntos se analizó utilizando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

6.9.2 Inmunolocalización de la proteína Nf23

Los trofozoítos de las especies de *Naegleria* fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% durante 15 minutos (Sigma-Aldrich, MO, EUA.). Los sitios inespecíficos se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% durante 1 h a 37°C. Los trofozoítos permeabilizados y no permeabilizados se incubaron con el anticuerpo anti-Nf23 diluido 1:50 en albúmina al 1% durante 2 h a 37°C, y posteriormente con un anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra conjugado con FITC diluido 1:100 en albúmina al 1% durante 1 h a 37 °C (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA.). El suero PI se usó como control negativo. Las muestras fueron montadas con medio Vectashield (Vector Laboratories, CA, EUA.), y examinadas por microscopía confocal (Carl Zeiss LSM 700, Oberkochen, Alemania). La fluorescencia se cuantificó como fluorescencia celular total corregida (CTCF). Brevemente, se dibujó un contorno alrededor de cada amiba, se midió el área y la fluorescencia media usando el software ImageJ. El CTCF se evaluó utilizando la siguiente fórmula: $CTCF = \text{densidad integrada (área de la celda seleccionada} \times \text{lecturas de fondo de fluorescencia media)}$ (McCloy et al. 2014). Los análisis gráficos y estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de dos vías con el software GraphPad Prism 6.

6.9.3 Inhibición del efecto citopático producido por *N. fowleri* sobre células utilizando los anticuerpos anti-Nf23

Con el objetivo de evaluar si los anticuerpos anti-Nf23 tenían la capacidad de inhibir el daño producido por *N. fowleri*, pre-incubamos los trofozoítos con el anticuerpo (60 µg/ml) durante 15 minutos en hielo. La concentración inhibitoria óptima del anticuerpo se determinó en base a ensayos de aglutinación de *N. fowleri* con

diferentes concentraciones de anticuerpos, la cual fue evaluada al observar la aglutinación de los trofozoítos mediante microscopía óptica. La inhibición del efecto citopático se realizó en diferentes tiempos de interacción, y el daño celular se evaluó por la capacidad de las células para metabolizar MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro) a 0,5 mg/ml (Sigma Aldrich, MO, EUA.). Brevemente, 6×10^5 células (MDCK y SH-SY5Y) fueron interaccionadas con *N. fowleri* y *N. lovaniensis* y *N. gruberi* pre-incubados con anticuerpo anti-Nf23 en una proporción 1:1 en medio de cultivo celular sin SFB durante 30, 60, 120, 180 y 360 min. Al final de cada tiempo de interacción, los sobrenadantes se eliminaron y las monocapas se lavaron con medio sin suero. En seguida, las células se incubaron con 500 μ l de MTT durante 2 h a 37°C, al finalizar dicho tiempo, los sobrenadantes se eliminaron, se incubaron con 400 μ l de DMSO durante 1 h a 37 °C. Los controles positivos y negativos de cada tiempo de interacción fueron células con y sin trofozoítos de *N. fowleri*, respectivamente. El suero PI se usó como control negativo. La absorbancia se cuantificó por espectrofotometría a 540 nm. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías con el software GraphPad Prism 6.

6.9.4 Expresión de Nf23 en amibas recuperadas de cerebros de ratones

Trofozoítos de *N. fowleri* (2.5×10^3 en 20 μ l de medio) fueron instilados en cinco ratones Balb/c machos de 1 mes de edad con un peso de 15-20 g. El grupo de control se instiló con 20 μ l de medio de cultivo fresco. Los ratones fueron monitoreados por hasta 5 días de infección; los animales fueron sacrificados con una sobredosis de ketamina/xilazina. Los cerebros se recuperaron y se incubaron en medio de bactocasitona suplementado con SFB al 2% a 37°C. Los trofozoítos recuperados de los cerebros y las amibas cultivadas axénicamente se usaron para la extracción de ARN y los ensayos posteriores de análisis y comparación de la expresión por qRT-PCR. La significancia estadística entre ambos cultivos de amibas se calculó mediante la comparación de las medias utilizando la prueba de Tukey con el software GraphPad Prism 6.

7. Resultados

7.1 Perfil de las proteínas de membrana en las tres especies de *Naegleria*

El análisis de los patrones de proteínas por SDS-PAGE al 12% mostró un perfil diferencial entre las de proteínas en los ETA; así mismo, el perfil de proteínas de membrana presentó diferencias en las tres especies de amibas. Es importante mencionar que observamos mayor similitud en el patrón de proteínas entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis* pero no con *N. gruberi* tanto en los ETA y en la de proteínas purificadas de membranas (Figura 2 A). Sin embargo, es importante enfatizar que todas las bandas mostraron una elevada intensidad en el patrón de proteínas de *N. fowleri*. Cuando analizamos el perfil de proteína de membrana, observamos que las bandas de 250, 100, 75, 60, 50, 47, 35, 26 y 23 kDa fueron similares en *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. Por otro lado, *N. gruberi* mostró bandas que fueron más intensas a 75, 70, 55 y 51 kDa (Figura 2 A). Por otro lado, confirmamos la eficiencia de la purificación de membranas (enriquecimiento de la fracción de membrana) mediante análisis con MET para las tres especies de amibas (Figura 2 B). Estos resultados mostraron la presencia de fragmentos de membrana a partir de los cuales se realizó la purificación de las proteínas asociadas a la membrana (Figura 2 B).

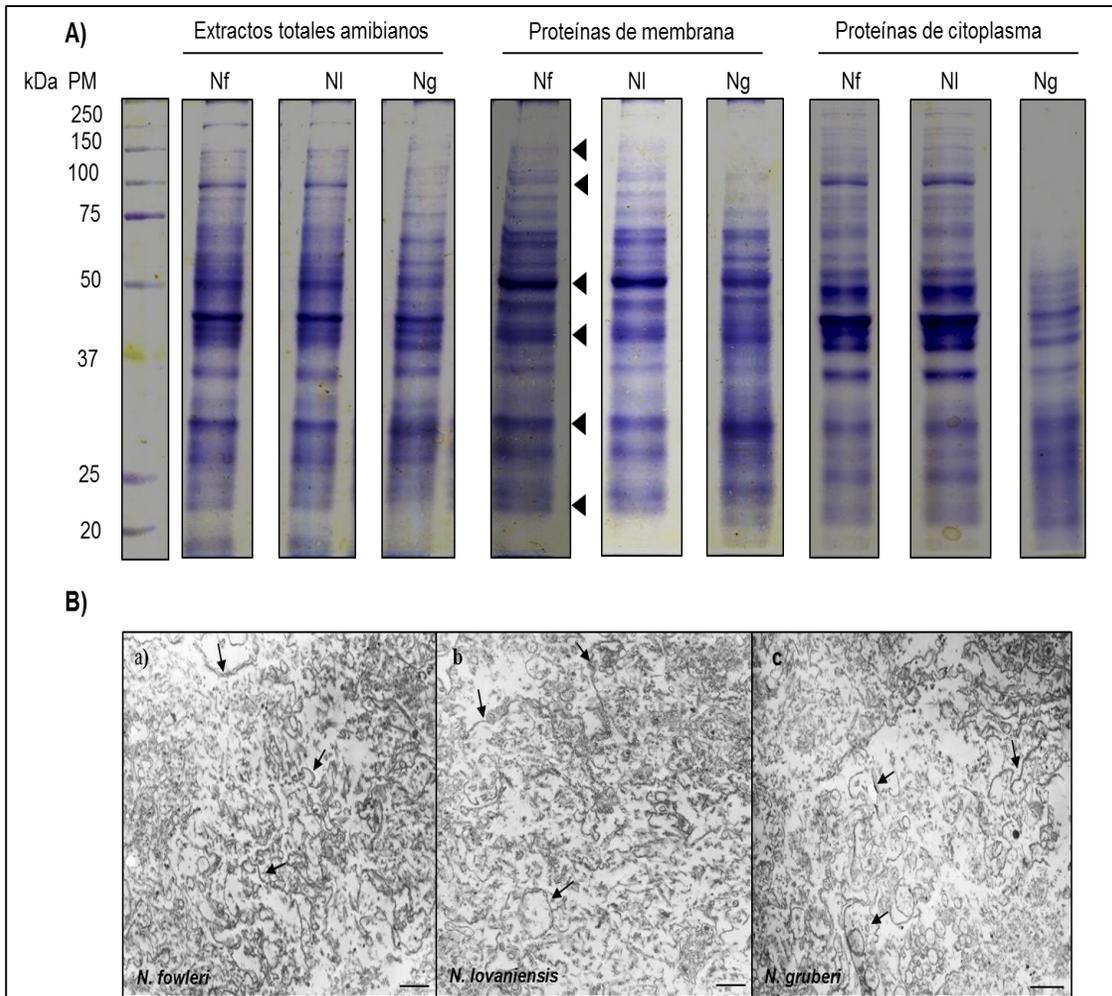


Figura 2. Perfil de proteínas comparativo entre las tres especies de *Naegleria*. A) Electroforesis de acrilamida al 12% de las proteínas totales y de membrana de las tres especies de *Naegleria*; *N. fowleri* (Nf), *N. lovaniensis* (NI) y *N. gruberi* (Ng). B) Análisis por microscopía electrónica de transmisión de los fragmentos de las membranas de los trofozoítos de las tres especies de *Naegleria*; a) *N. fowleri*, b) *N. lovaniensis* y c) *N. gruberi*. Fragmentos de membranas (puntas de flechas). Barra = 1 μ m.

7.2 Espectrometría de masas y análisis estructural de la proteína de membrana de 23 kDa

A partir de las proteínas de membrana de *N. fowleri*, elegimos algunas bandas para ser identificadas por espectrometría de masas. Los resultados mostraron la presencia de proteínas mitocondriales, metabólicas, chaperonas, proteínas de choque térmico, proteasas, proteínas predichas, proteínas estructurales y un producto no específico que correspondió a la proteína de membrana de 23 kDa (Tabla 1).

| Tabla 1. Identificación de proteínas de membrana purificadas de <i>N. fowleri</i> | | |
|---|---|-------|
| Número de acceso | Nombre designado | kDa |
| NF0017140 | Unspecified product membrane protein | 25.55 |
| NF0056430 | Cathepsin B-like protein | 25.46 |
| NF0068180 | Cysteine proteinase rd19a-like | 39.09 |
| NF0052090 | Dipeptidyl peptidase 1 | 68.10 |
| NF0023390 | hsp70 | 71.02 |
| NF0074040 | f0f1 atp synthase subunit beta | 62.33 |
| NF0101530 | Glutamate dehydrogenase | 56.0 |
| NF0126350 | Decarboxylase | 51.2 |
| YP_007890028.1 | Succinate:cytochrome c oxidoreductase subunit 2 (mitochondrion) | 41.7 |
| NF0023160 | Prohibitin-like protein | 30.9 |
| NF0131900 | Hypothetical protein NAEGRDRAFT 82392 | 33.85 |
| NF0060860 | Serine carboxypeptidase-like | 49.9 |
| NF0130370 | f0f1 atp synthase subunit alpha | 62.08 |
| NF0102130 | Serine mitochondrial-like | 56.02 |
| NF0035640 | s-adenosyl-L-homocysteine hydrolase | 52.1 |
| NF0122710 | Alanine transaminase | 58.3 |
| NF0102700 | Obtusifoliol 14alpha-demethylase | 55.42 |
| NF0059360 | Aconitate hydratase | 78.6 |
| NF0091330 | Clathrin heavy chain 1 | 193.0 |
| NF0074130 | Myosin ii heavy chain | 87.5 |

Del análisis de espectrometría de masas se identificaron cuatro péptidos que correspondieron a dicha proteína (Figura 3 A). El análisis *in silico* mostró similitudes con la secuencia de aminoácidos de la proteína con el número de acceso NF0017140 de 229 aminoácidos y un peso molecular de 25.5 kDa anotado en la base de datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>). Por lo tanto, analizamos la estructura de la proteína, el nivel de expresión y la ubicación de esta proteína en *N. fowleri* y se comparó con las de las especies no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*.

El análisis mostró que estructuralmente la proteína presentó de 48-55% de la secuencia, una conformación beta (indicada en amarillo) y 20-30% presentaba una conformación intrínsecamente desordenada (representada en rosa). La región antigénica que se utilizó para producir el anticuerpo policlonal corresponde a los aminoácidos 159-174 (marcada en azul) (Figura 3 B). No fue posible determinar la presencia de ningún dominio conocido de la proteína. Además, se analizó la presencia de modificaciones pos-traduccionales que ayudaran a explicar su posible localización membranar; dicho análisis mostró sitios potenciales de O-glicosilación en los aminoácidos 37, 39 y 132, N-glicosilaciones en las posiciones 46 y 101, y sitios de fosforilación en los residuos de treonina 88 y 164, en los residuos de serina 17, 35, 39, 123 y 220, y en el residuo de tirosina 4 (Figura 3 C). Sin embargo, la proteína no presentó pases transmembranales, péptido señal o anclaje tipo GPI.

La estructura de la proteína 3-D exhibió una similitud con las proteínas de tipo sortilina; sin embargo, se encontró una baja identidad (15%). Según el análisis *in silico* utilizando el servidor COFACTOR para dilucidar la función de esta proteína, los resultados mostraron un valor de 0.53 Cscore, y la predicción de la función estaba estrechamente relacionada con receptores transmembranales, receptores de señalización y moléculas de unión a lipoproteínas (Figura 3 D).

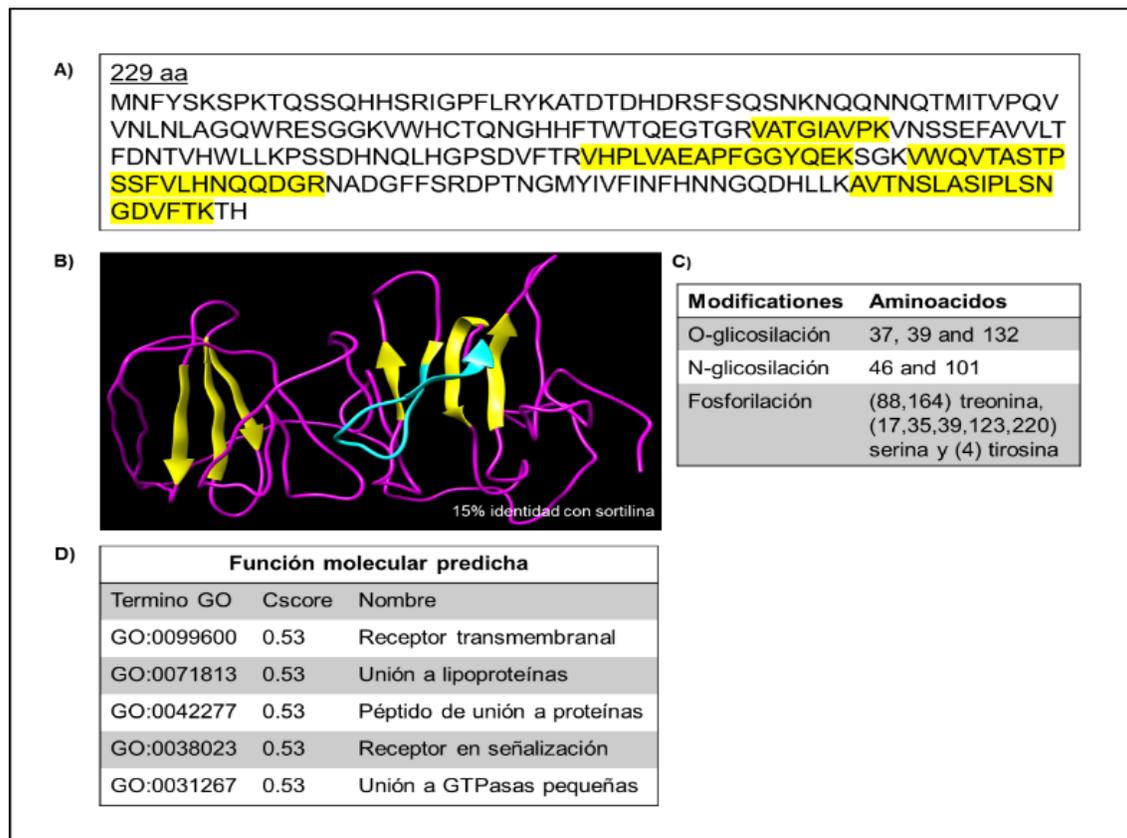


Figura 3. Análisis bioinformático de la secuencia proteica de la proteína Nf23. A) Secuencia de los 229 aminoácidos y los péptidos identificados por espectrometría de masas (amarillo). B) Modelo de la estructura 3D de la proteína Nf23, se utilizó el servidor Phyre2 para determinar el modelo de estructura de la proteína. El péptido inmunogénico se encuentra en color azul, el cual comprende los aminoácidos 159-174 (QVTASTPSSFVLHNQQ), la conformación de láminas beta aparece en amarillo. C) Las predicciones de las posibles modificaciones pos-traduccionales se realizaron mediante ExPASy. D) El análisis de la predicción de la función de las proteínas se realizó con el servidor COFACTOR (Cscore de 0.53).

7.3 Expresión génica de *Nf23* en trofozoítos de las tres especies de *Naegleria*

Para realizar un análisis comparativo de la expresión del mensajero de *Nf23*, se procedió a la extracción y a la posterior evaluación de la integridad del ARN de las tres especies de amibas (Figura 4 A). Se realizaron ensayos de PCR en punto final, los cuales mostraron la presencia del producto esperado de 390 pb en las tres especies de amibas. Interesantemente, se observó un amplificado con mayor densidad en el carril correspondiente para *N. fowleri* (Figura 4 B).

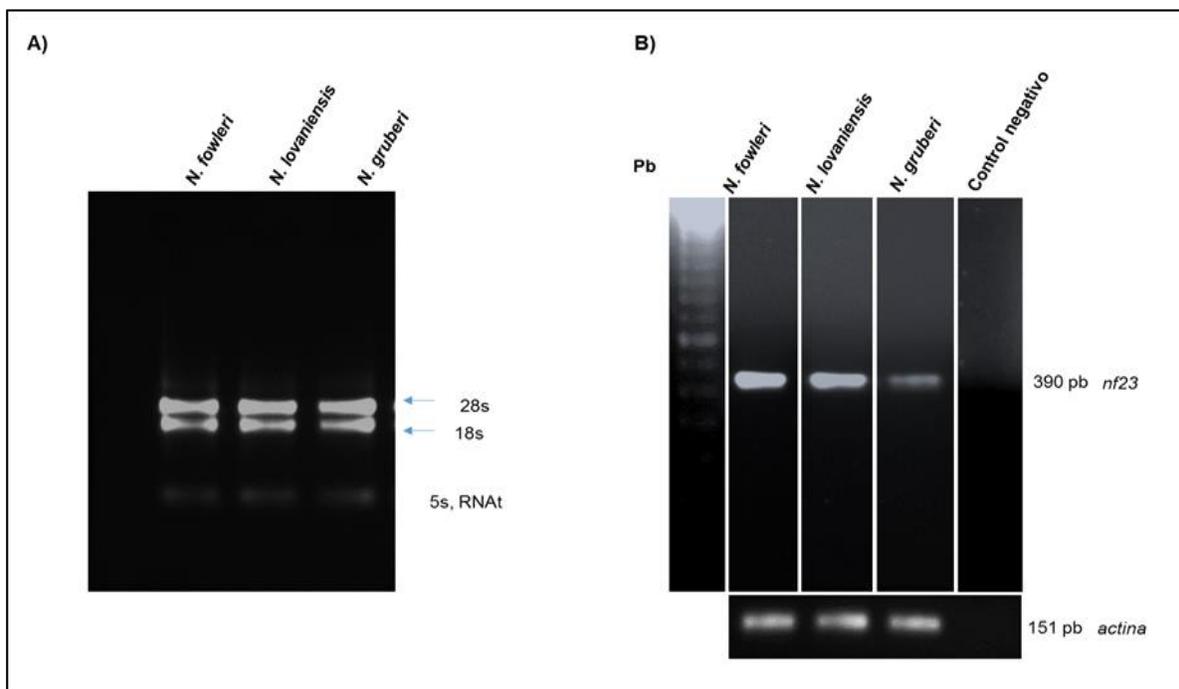


Figura 4. Análisis semi-cuantitativo de *Nf23* por PCR punto final.

A) Integridad del ARNm de las tres especies de *Naegleria* analizado en un gel de agarosa al 1%. B) PCR punto final, amplificación de un producto de 390 pb para *Nf23* en las tres especies de amibas, la *actina* fue utilizada como control endógeno. Se observa menos intensidad en *N. gruberi*.

La expresión relativa del ARNm de *Nf23* se evaluó por qRT-PCR. Se realizó la curva de disociación para la amplificación del gen blanco (*Nf23*) y el gen endógeno (*actina*); se observó la amplificación de picos únicos en la curva de fusión para cada gen analizado; lo que indica que se amplificaron productos únicos en cada reacción de PCR (Figura 5 A-B). Los análisis de expresión del mensajero de *Nf23* mostraron una sobreexpresión estadísticamente significativa en *N. fowleri* de 40,000 veces con respecto a *N. gruberi* y 4 veces con respecto a *N. lovaniensis* (** $p < 0.0001$) (Figura 5 C); se muestra el gel de agarosa representativo de los productos amplificados (Figura 5 D).

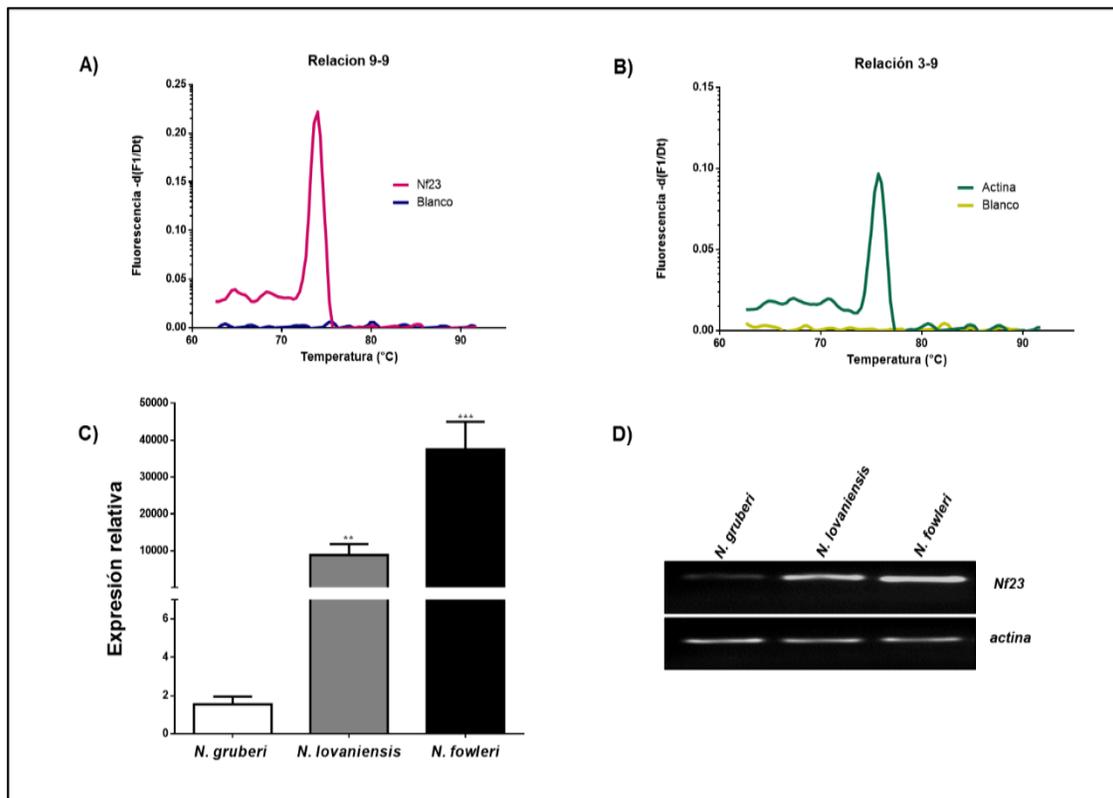


Figura 5. Análisis de la expresión de *Nf23* por PCR en tiempo real.

A) Curva de disociación para el gen problema *Nf23*. B) Curva de disociación para el control endógeno actina. C) Se realizó la expresión génica de *Nf23* en trofozoítos de las tres especies de *Naegleria*. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t (** $p = 0.0095$ y *** $p < 0.0001$) contra *N. gruberi*. D) Gel de agarosa representativo de los productos qRT-PCR, se utilizó actina como gen endógeno.

7.4 Análisis de la presencia de la proteína Nf23 en las tres especies de *Naegleria* y en *N. fowleri* recuperada de cerebro de ratón Balb/c

Como se describió en materiales y métodos, después de la inmunización y obtención del anticuerpo anti-Nf23. Se procedió a su titulación utilizando el método de ELISA y WB, arrojando títulos de hasta 1:8000 (Figura 6 A-B).

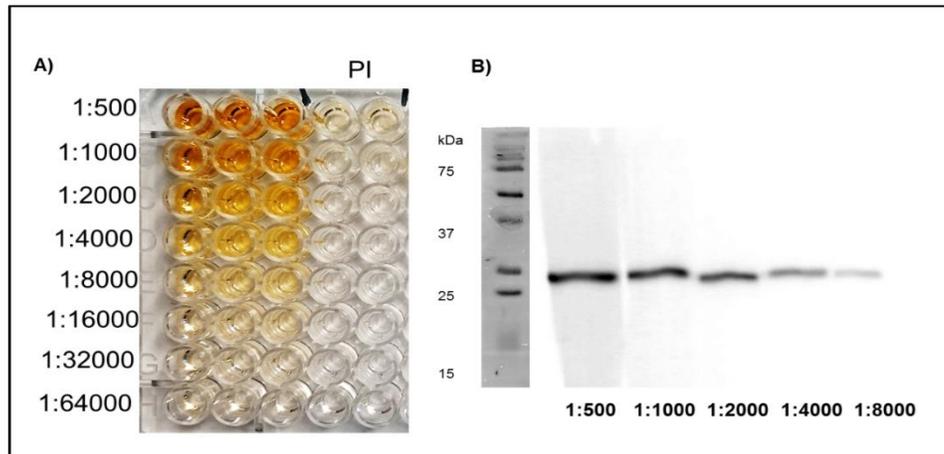


Figura 6. Titulación del anticuerpo policlonal anti-Nf23. A) Titulación por el método de ELISA. B) Titulación por Western blot. Por ambos métodos se alcanzaron títulos de hasta 1:8000.

Este anticuerpo se utilizó para la identificación de la proteína por Western blot; la actina se utilizó como control de carga. Los resultados mostraron una banda positiva que corresponde a la proteína Nf23 de aproximadamente 23 kDa en el ETA en *N. fowleri*, *N. fowleri* recuperados del cerebro y *N. lovaniensis*. Con el suero PI no se observó señal. Sin embargo, la banda de interés no pudo ser detectada en el ETA de *N. gruberi* (Figura 7 A).

Al analizar la presencia en las proteínas de membrana purificadas de las tres especies de amibas y de *N. fowleri* recuperadas del cerebro de ratón, los resultados mostraron la presencia de la proteína Nf23 en *N. fowleri*, *N. fowleri* recuperado del cerebro de ratón y *N. lovaniensis*, pero no en *N. gruberi* (Figura 7 A). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en las proteínas purificadas de membrana, observando una mayor expresión en los trofozoítos recién recuperados de los cerebros de ratones (Figura 7 B).

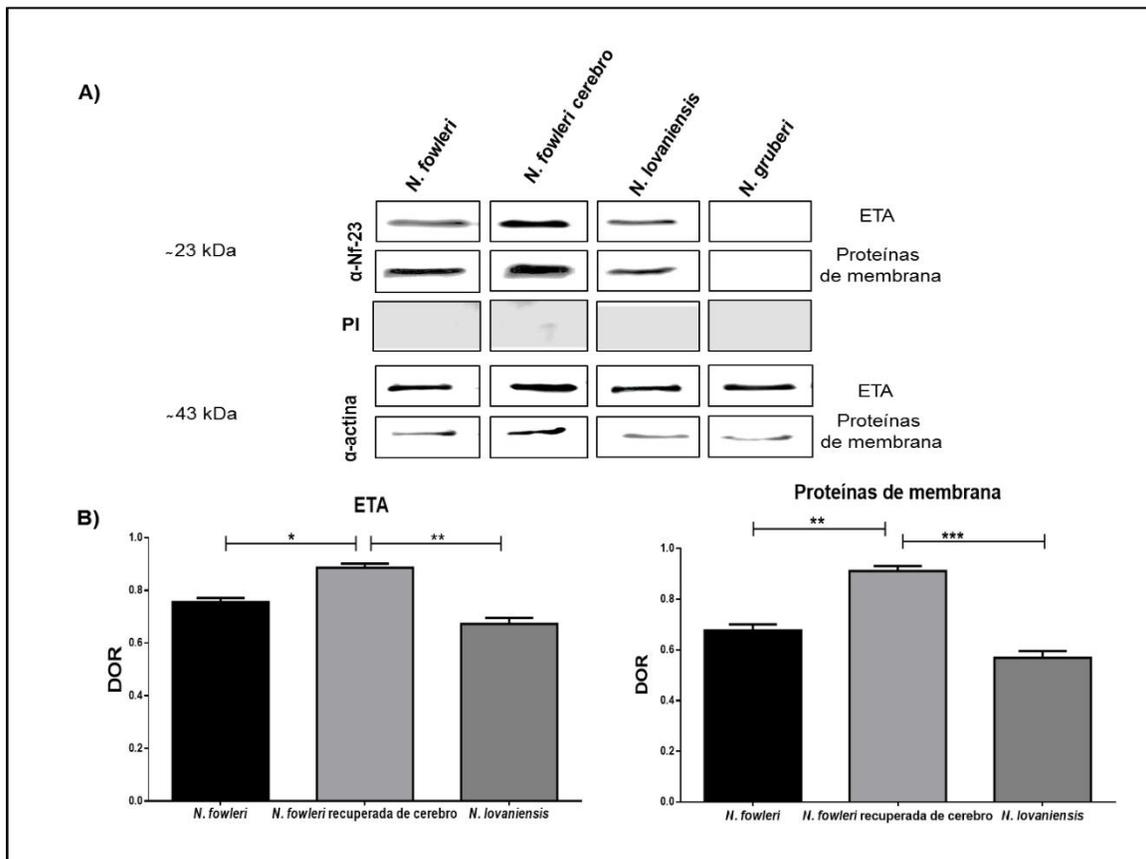


Figura 7. Identificación de la proteína Nf23 en *N. fowleri* y las amibas no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*. A) Análisis por Western blot de la presencia de la proteína Nf23 a partir de ETA y de proteínas de membrana purificadas de *N. fowleri*, *N. fowleri* recuperadas del cerebro, *N. lovaniensis* y *N. gruberi*, la actina se utilizó como control de carga. El suero pre-inmune (PI) no mostró ninguna señal. B) Se realizó un análisis densitométrico de la proteína Nf23 detectada en ETA (* $p=0.0144$, ** $p=0.082$), y de las proteínas de membrana (** $p=0.0090$, *** $p=0.0048$).

Para corroborar este resultado, se realizaron ensayos de Dot blot a partir de los ETA y de las proteínas de membrana purificadas de las tres especies de *Naegleria* y de *N. fowleri* recién recuperada de cerebro; los resultados mostraron tanto en ETA como en las proteínas de membrana la presencia de la proteína nativa Nf23 en las tres especies de *Naegleria* (Figura 8 A). Se identificaron diferencias significativas en ETA y en las proteínas de membrana purificadas (Figura 8 B).

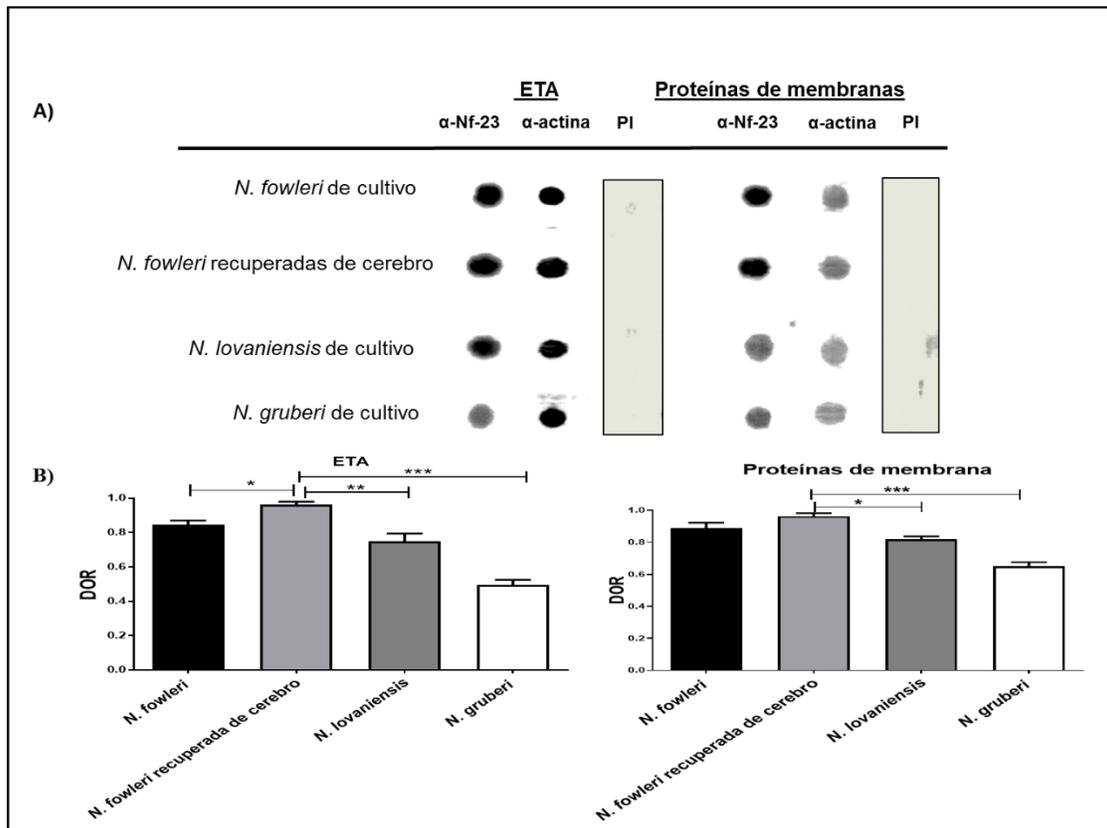


Figura 8. Análisis y detección de la proteína en trofozoítos de *N. fowleri*, *N. fowleri* recuperado de cerebro, *N. lovaniensis* y *N. gruberi*. A) Ensayos de Dot blot para la detección de la proteína Nf23 en ETA y en proteínas de membrana de *N. fowleri*, *N. fowleri* recuperadas de cerebro, *N. lovaniensis* y en *N. gruberi*. Se usó el suero PI como control negativo y la actina como control de carga. B) Análisis densitométrico de ETA y de proteínas de membrana (* $p=0.0421$, ** $p=0.0052$, *** $p=0.0003$, y * $p=0.0115$, *** $p=0.0006$) respectivamente.

7.5 Expresión diferencial de *Nf23* en amibas recuperadas de cerebros de ratones

La expresión del gen *Nf23* fue evaluada mediante qRT-PCR a partir de las amibas recuperadas de los cerebros de ratones de la cepa Balb/c. Nuestros resultados mostraron sobreexpresión del gen en 5 veces más en los trofozoítos de *N. fowleri* recuperados de cerebros de ratones en comparación con los trofozoítos de *N. fowleri* cultivados axénicamente (Figura 9); los resultados mostraron significancia estadística (**** $p < 0,0001$).

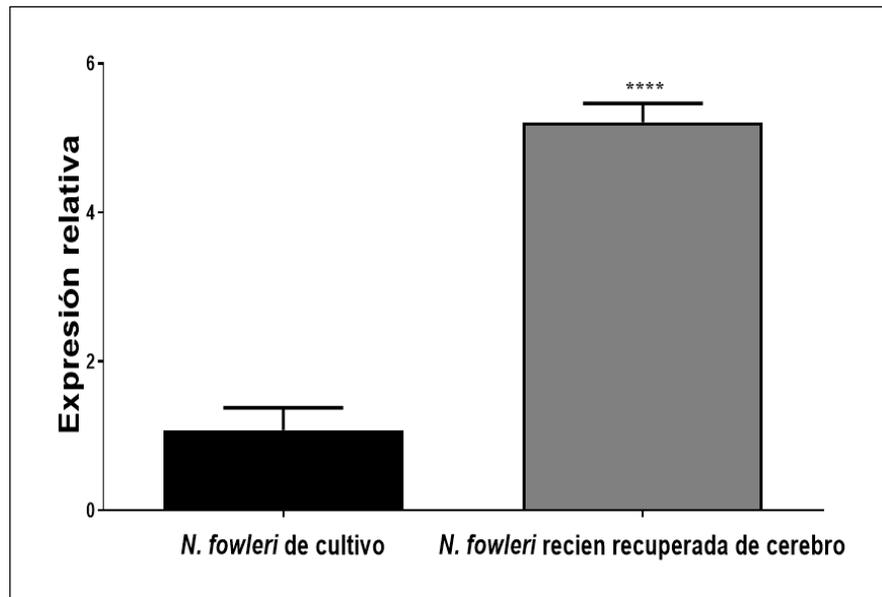


Figura 9. Análisis comparativo por qRT-PCR. La expresión de *Nf23* en trophozoites of *N. fowleri* recuperados de cerebros de ratones es 5 veces mayor en comparación con las amibas cultivadas axénicamente (**** $p < 0.0001$).

7.6 Inmunolocalización de la proteína Nf23 en las tres especies de *Naegleria*

Para demostrar la localización de la proteína se utilizaron los anticuerpos generados para la proteína de membrana Nf23. En los trofozoítos no permeabilizados de las tres especies, la fluorescencia de la proteína se distribuyó en "parches" en algunas áreas de la membrana citoplasmática (Figura 10 A, B, D, E G, y H). No se observó marca en las amibas que se incubaron con el suero PI (Figura 10 C, F, y I). La fluorescencia fue cuantificada como CTCF, los resultados no mostraron diferencias significativas (Figura 10 J).

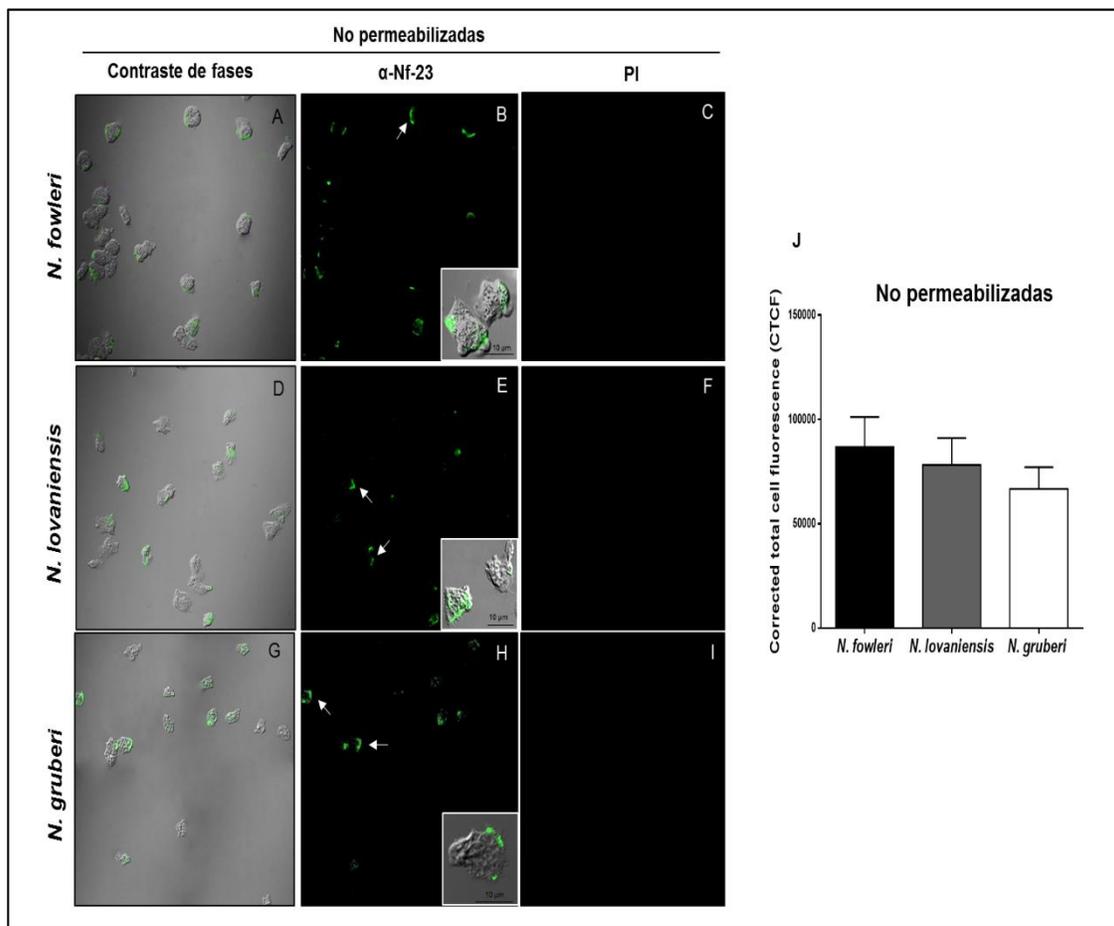


Figura 10. Inmunolocalización de la proteína de membrana Nf23 en trofozoítos de *Naegleria* no permeabilizados. A) Microscopía confocal de la proteína Nf23 en trofozoítos de las tres especies de *Naegleria* no permeabilizados, *N. fowleri* (A, B), *N. lovaniensis* (D, E) y *N. gruberi* (G, H). El suero PI se usó como control negativo en las tres especies de amibas (C, F y I). La señal aparece en la membrana de las amibas no permeabilizadas en forma de parches (flechas). 40x. La fluorescencia celular total corregida (CTCF) de trofozoítos no permeabilizados no mostró diferencias significativas (J).

En los trofozoítos permeabilizados, se observó la marca fluorescente en la periferia de las amibas; sin embargo, la marca fue más intensa en los trofozoítos de *N. fowleri* en comparación con los trofozoítos de las especies no patógenas (Figura 11 A, B, D, E G, y H). No se observó marca en las amibas que fueron incubadas con el suero PI (Figura 11 C, F, y I). La fluorescencia fue cuantificada como CTCF; detectamos que la intensidad de la fluorescencia mostró un aumento en los trofozoítos de *N. fowleri* en comparación con las amibas no patógenas (Figura 11 J). Con diferencias significativas respecto a *N. gruberi* (**** $p < 0,0001$).

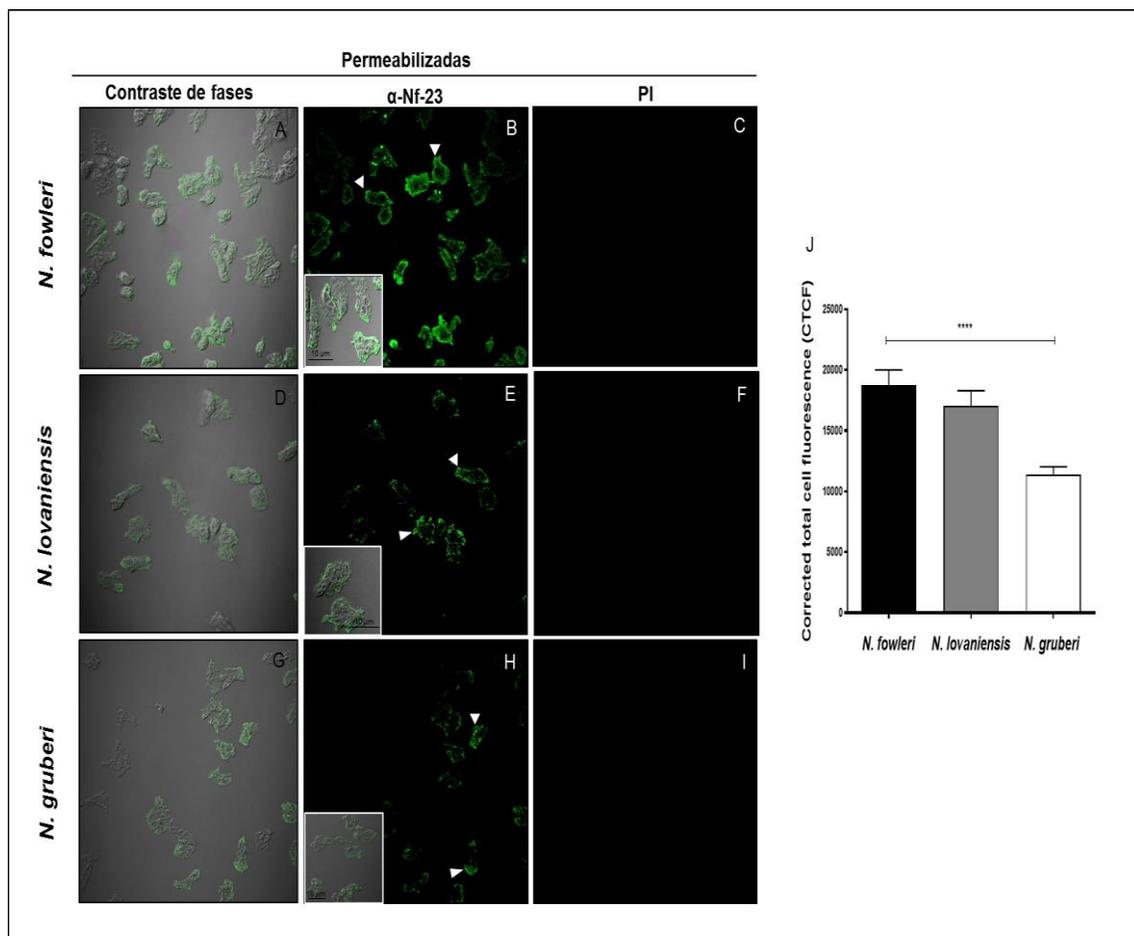


Figura 11. Inmunolocalización de la proteína de membrana Nf23 en trofozoítos de *Naegleria* permeabilizados. A) Microscopía confocal de la proteína Nf23 en trofozoítos permeabilizados, *N. fowleri* (A, B), *N. lovaniensis* (D, E) y *N. gruberi* (G, H). El suero PI se usó como control negativo en las tres especies de amibas (C, F y I). La fluorescencia aparece en la superficie de las amibas permeabilizados (puntas de flecha). 40x. La fluorescencia celular total corregida (CTCF) de los trofozoítos permeabilizados mostró diferencias significativas (**** $p < 0,001$) (J).

7.7 Inhibición del efecto citopático de la proteína Nf23 con anticuerpos

Para evaluar la capacidad *in vitro* de los anticuerpos anti-Nf23 para prevenir o retrasar el daño causado por los trofozoítos de *N. fowleri*; se utilizaron células MDCK y la línea celular neuroblastoma SH-SY5Y. Previamente se realizó el ensayo de aglutinación, las amibas fueron incubadas con 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo anti-Nf23. Los trofozoítos sin anticuerpos permanecieron con su morfología ameboidea típica (Figura 12 A); sin embargo, los trofozoítos que fueron incubados con el anticuerpo se aglutinaron (Figura 12 B-C), sin afectar su viabilidad celular.

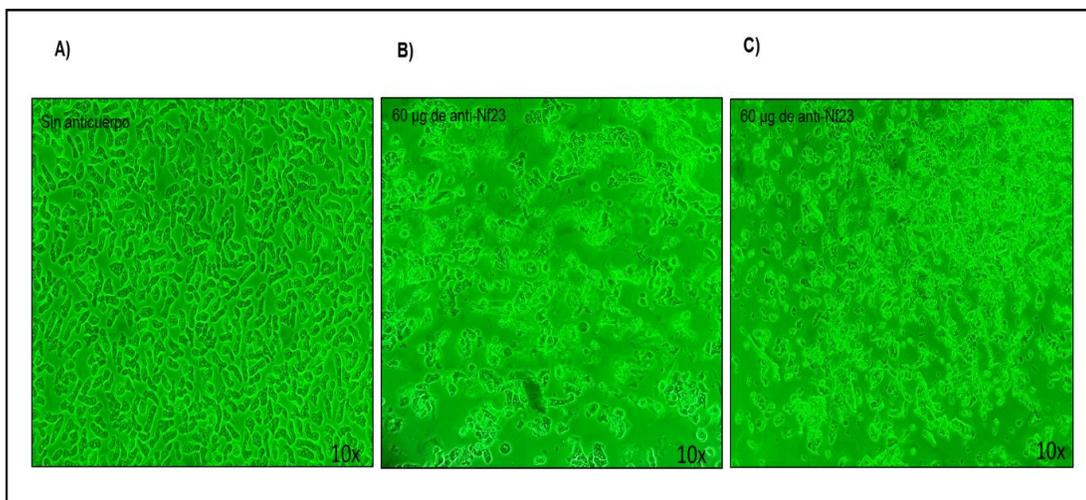


Figura 12. Análisis de la aglutinación de los trofozoítos de *N. fowleri* por microscopía óptica. A) Trofozoítos sin anticuerpo anti-Nf23. B-C) Trofozoítos incubados con 60 μg de anti-Nf23. 10x.

Posteriormente, para los ensayos de inhibición del efecto citopático, las amibas se pre-incubaron con los anticuerpos en hielo durante 15 min. Después de este tiempo, las células se interaccionaron con trofozoítos durante diferentes tiempos de co-incubación y el daño se evaluó mediante el ensayo de MTT. Adicionalmente, se evaluó el daño y la inhibición de éste en células MDCK que interactuaron con los trofozoítos de las cepas no patógenas. *N. lovaniensis* y *N. gruberi* con y sin anticuerpo anti-Nf23. Los resultados demostraron que no se presentó ningún daño significativo sobre la monocapa de células MDCK (Figura 13).

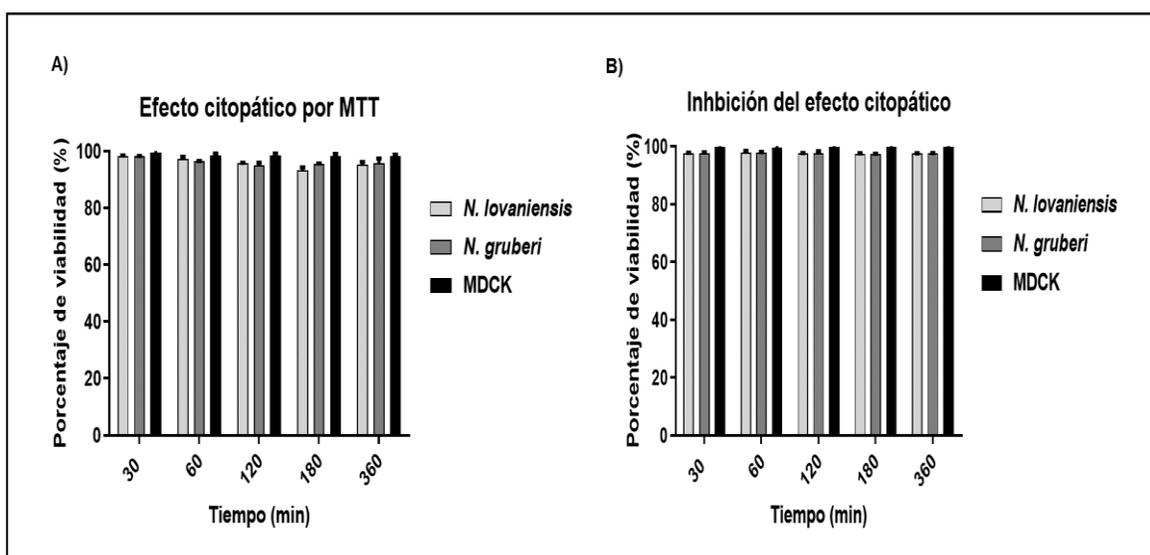


Figura 13. Evaluación del efecto citopático de las especies no patógenas sobre células MDCK. A) Efecto citopático producido por *N. lovaniensis* y *N. gruberi* sobre una monocapa de células MDCK determinado por ensayos de MTT. B) Porcentaje de inhibición del efecto citopático de *N. lovaniensis* y *N. gruberi* en presencia de anticuerpo anti Nf23.

Para los ensayos de inhibición del efecto citopático, los trofozoítos de *N. fowleri* incubados con y sin anticuerpo Nf23 que fueron interactuados sobre la monocapa de MDCK, los resultados demostraron que los anticuerpos anti-Nf23 disminuyeron y retrasaron el efecto citopático, produciendo un efecto significativo sobre la reducción de la viabilidad de las células MDCK de 120 a 360 min (95-87%, respectivamente). En contraste, los trofozoítos sin anticuerpos causaron daño a la monocapa, y la viabilidad disminuyó en todos los tiempos de interacción (30 a 360 minutos); con valores del 90-63% de la viabilidad celular, respectivamente (Figura 14 A). Con el suero PI utilizado como control negativo, no se observó protección de la monocapa celular. En base a estos resultados, sugerimos un efecto inhibitor y parcialmente protector de los anticuerpos ya que el daño se redujo significativamente en un 5%, 14% y 24% a los 120, 180 y 360 min, respectivamente (**** $p<0,0001$) (Figura 14 B).

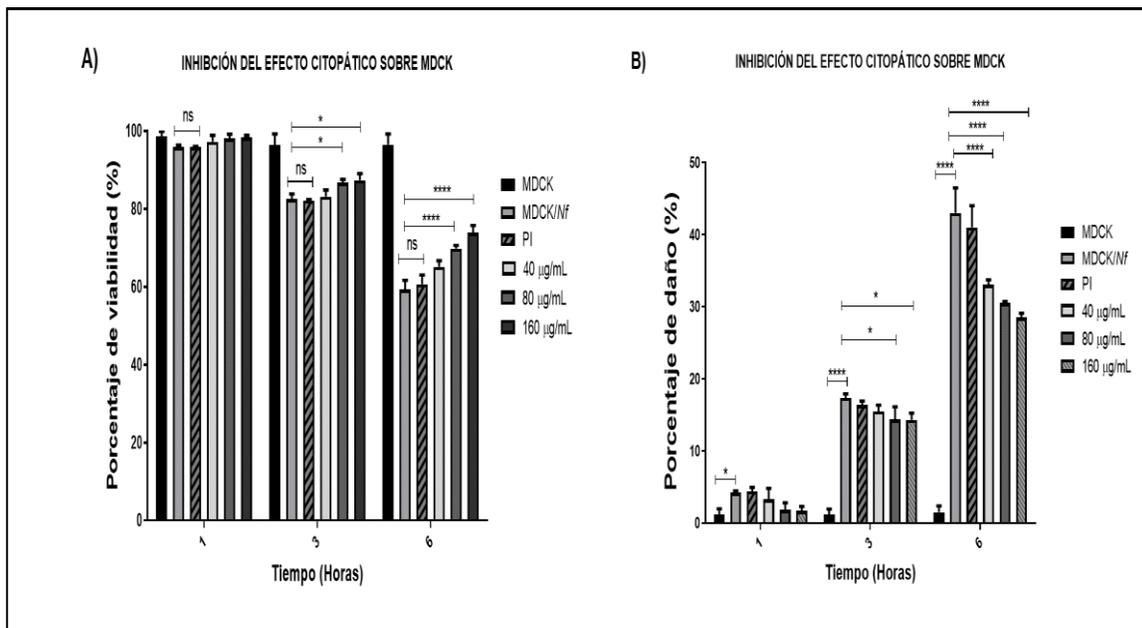


Figura 14. Efecto de la inhibición de la proteína de membrana Nf23 en el daño a células MDCK. A) Viabilidad celular de MDCK en interacción de *N. fowleri* con y sin anticuerpos. B) Porcentaje de daño celular de MDCK por ensayos de MTT. Las monocapa de células sin amibas fue utilizada como control negativo de daño y el suero pre- inmune se utilizó como control negativo, mostrando diferencias significativas (**** $p<0,0001$).

De manera similar se realizó el mismo ensayo utilizando la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y utilizando concentraciones crecientes del anticuerpo. Los resultados mostraron que la amiba produce un daño citopático a las células de manera tiempo dependiente, afectando la viabilidad celular de manera significativa (Figura 15 A). Este efecto se ve retrasado significativamente y dependiente de la concentración de anticuerpos utilizada, disminuyendo y retrasando el daño a la monocapa celular (Figura 15 B). Estos resultados sugieren que esta proteína podría estar involucradas en el mecanismo de virulencia de la amiba y en el daño celular.

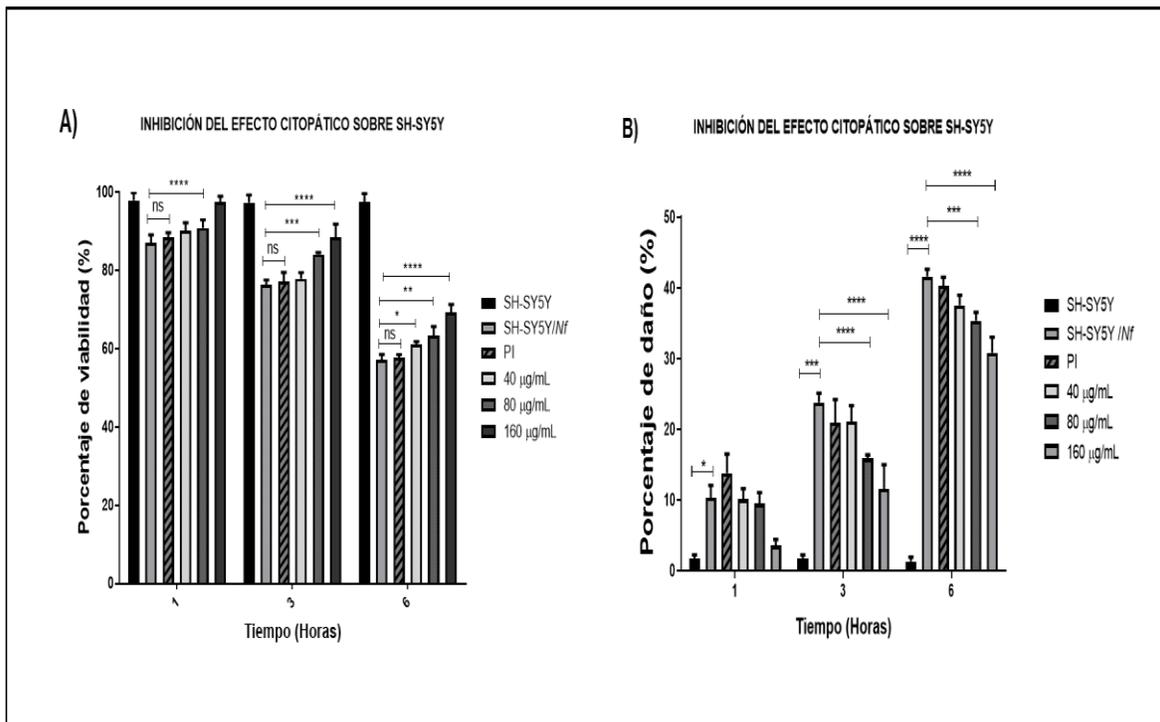


Figura 15. Efecto de la inhibición de la proteína de membrana Nf23 en el daño a las células SH-SY5Y. A) Viabilidad celular de SH-SY5Y en interacción de *N. fowleri* con y sin anticuerpos. B) Porcentaje de daño celular a la línea celular SH-SY5Y por ensayos de MTT. Las monocapa de células sin amibas fue utilizada como control negativo de daño y el suero pre-inmune se utilizó como control negativo, mostrando diferencias significativas (**** $p < 0,0001$).

8. Discusión

El protozoo patógeno *N. fowleri* pertenece al grupo de las AVL, el cual presenta una distribución cosmopolita. Este patógeno produce en los humanos una infección aguda y mortal denominada MAP que afecta el SNC (Martínez-Castillo et al. 2016). *N. fowleri* desarrolla diferentes mecanismos de patogenicidad para producir daño en las células del neuroepitelio olfatorio y en el SNC, principalmente en los bulbos olfatorios (Jarolim et al. 2000; Lee et al. 2007; Marciano-Cabral y John 1983; Martínez et al. 1973). Además, se ha reportado que la respuesta inmune innata, promueve una agresiva reacción inflamatoria, la cual es un factor importante que impacta en la gravedad de la enfermedad (Cervantes-Sandoval et al. 2008a; Cervantes-Sandoval et al. 2008b; Rojas-Hernández et al. 2004).

Las proteínas de la amiba que participan como factores de virulencia se encuentran involucradas en múltiples procesos que repercuten la patogenicidad amibiana, tales como el reconocimiento, la adhesión, la invasión y la citotoxicidad. Entre las proteínas de membrana que han sido estudiadas se encuentran las glicoproteínas y las integrinas (Cervantes-Sandoval et al. 2010; Han et al. 2004; Jamerson et al. 2012). Las proteasas y metaloproteasas también son importantes factores de virulencia de los trofozoítos de *N. fowleri* (Aldape et al. 1994; Lam et al. 2017; Martínez-Castillo et al. 2017; Vyas et al. 2015). En este sentido, existe un gran interés en estudiar la capacidad de *N. fowleri* de inducir una infección mortal y de rápido progreso. Por esta razón, el interés en el presente estudio y la comprensión de los factores o proteínas involucradas en la virulencia amibiana.

En este trabajo nos interesamos en evaluar la presencia, localización, así mismo, comparar la expresión de una proteína de membrana a la cual denominamos Nf23. Con el objetivo de tener una mejor comprensión de las proteínas de membrana de la amiba y realizar un estudio comparativo con las especies no patógenas, para así analizar su posible papel en la virulencia de *N. fowleri*. Para este propósito, analizamos las diferencias en el perfil de las proteínas de membrana de *N. fowleri*, y de las especies no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*. Nuestros resultados mostraron algunas similitudes en los perfiles de proteínas de membrana entre

N. fowleri y *N. lovaniensis*. Estos resultados podrían explicarse por la gran relación filogenética entre ambas amibas (Moura et al. 2015; Stevens et al. 1980). *N. lovaniensis* difiere de *N. fowleri* en solo 16 pb (0.8%) de la subunidad pequeña (SSU) de la secuencia de ADN. *N. lovaniensis* y *N. fowleri* difieren en un solo pb (0.6%) en la ubicación 166 de 5.8S ADN. Se ha reportado que algunas cepas de *N. fowleri* son idénticas a *N. lovaniensis* porque solo tienen una transición de una C a una T, y en el ITS1, la secuencia M2 es idéntica en ambas especies. Para *N. lovaniensis*, la secuencia M1 difiere en transiciones de 4 pb y una delección de 1 pb en comparación con la secuencia M1 de *N. fowleri*. Debido a estas características, es muy probable que *N. fowleri* haya evolucionado de *N. lovaniensis* (De Jonckheere 2011; Johan 2002).

Los estudios genómicos del ITS y de la subunidad pequeña mitocondrial del ARNm (mtSSU del ARNm) han demostrado una gran similitud entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. La amiba patógena *N. fowleri* presenta una alta homología de la secuencia de la mtSSU del ARNm con *N. lovaniensis*, en el que solo difiere en cuatro cambios de nucleótidos y una delección en el ITS (Zhou et al. 2003).

Sin embargo, a pesar de todas estas similitudes solo *N. fowleri* puede producir MAP, por lo cual es importante analizar las proteínas clave que participan en el desarrollo de su patogenicidad. La regulación de los mecanismos de transcripción y de la traducción podría desempeñar un papel importante en la virulencia de *N. fowleri*. Por ejemplo, a pesar de que entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis* existen grandes similitudes; hay estudios que demostraron diferencias en la estrategia de invasión y de su capacidad de interacción con diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC). *N. fowleri* reconoce de manera específica motivos de unión a diversas proteínas de la MEC, y exhibe un alto nivel de unión en comparación con *N. lovaniensis* (Jamerson et al. 2012). En este contexto, recientemente se ha descrito que la membrana citoplasmática es uno de los organelos celulares principales donde se ha enfocado los estudios de la patogenicidad de *N. fowleri* (Liechti et al. 2018; Zysset-Burri et al. 2014).

Posteriormente, se realizó la identificación de diversas proteínas de membrana por espectrometría de masas. Los resultados mostraron la presencia de una proteína de membrana no específica, enzimas mitocondriales, proteínas tipo chaperonas, proteínas de choque térmico, proteasas y varias proteínas involucradas en vías metabólicas, así como proteínas hipotéticas. A partir de la identificación por espectrometría de masas de la proteína de membrana candidato Nf23 (NF0017140), se analizó su producción y expresión en trofozoítos de *N. fowleri* y en las especies no patógenas. El análisis de expresión génica mostró una sobreexpresión de Nf23 en *N. fowleri* en comparación con *N. lovaniensis* y *N. gruberi* (4 y 40,000 veces, respectivamente).

Por análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos, los resultados obtenidos no arrojaron dominios conservados conocidos, mientras que por análisis de homología estructural se encontró que la proteína presentaba una conformación de láminas beta.

Por otro lado, los anticuerpos producidos contra el péptido reconocieron la proteína Nf23 en ETA y en las proteínas de membrana purificadas en las especies de *Naegleria*; sin embargo, por ensayos de WB se detectó a la proteína en *N. fowleri* y en *N. lovaniensis*, pero no en *N. gruberi*. Estos resultados podrían explicarse y en su conjunto con el nivel de expresión génica, los cuales mostraron que la proteína se expresa aproximadamente 10,000 y 40,000 veces más en *N. lovaniensis* y *N. fowleri* respectivamente, comparadas con *N. gruberi*. Adicionalmente, es posible que el ARNm sea inestable, que junto con la baja expresión la proteína no pueda ser detectada por WB. Otra posible explicación es que el anticuerpo anti-Nf23 reconozca únicamente una secuencia en la conformación nativa de la proteína de *N. gruberi*. Esta explicación es altamente probable debido a que por ensayos de inmunofluorescencia indirecta para microscopía confocal, observamos la marca fluorescente en la superficie de las tres especies de *Naegleria*, lo cual confirmamos por ensayos de Dot blot en el que la proteína en forma nativa también pudo ser detectada.

Curiosamente, los análisis *in silico* mostraron la probable presencia de modificaciones postraduccionales, sugiriendo diversos sitios potenciales de O-glicosilación, N-glicosilación y de fosforilación en la proteína. Estas modificaciones podrían explicar la presencia de la proteína Nf23 a nivel de membrana, las cuales también pudieran estar involucradas o estar permitiendo posibles asociaciones con otras proteínas de membrana; en diversos estudios se ha observado que este tipo de modificaciones están vinculadas a proteínas que se localizan en la membrana celular (Green y Garneau-Tsodikova 2010; Seo y Lee 2004). Adicionalmente, el análisis *in silico* de las funciones de la proteína Nf23 mostró que ésta podría participar como receptor transmembranal, como proteína de unión a lípidos y/o como receptor involucrado en señalización celular, esto pudo ser posible de acuerdo con las propiedades estructurales de Nf23 utilizando un algoritmo bioinformático denominado COFACTOR (Beg et al. 2018; Zhang et al. 2017).

Durante mucho tiempo, se ha descrito que la virulencia de *N. fowleri* puede restaurarse y/o aumentarse mediante varios pases por cerebro de ratón (John y Howard 1993; Wong et al. 1977). Con este antecedente, evaluamos mediante qRT-PCR la expresión de Nf23 de las amibas recuperadas de los cerebros de ratones y observamos un aumento de 5 veces en comparación con la de los trofozoítos cultivados axénicamente. Estos resultados fueron similares a los reportados por Zysset-Burri et al. (2014). Los autores realizaron un estudio proteómico comparativo de una cepa altamente virulenta en comparación con un cultivo débilmente virulento; demostraron un incremento en la expresión de hsp70, actina, Mp2CL5 y proteínas de unión a actina, concluyendo que dichas proteínas están involucradas con la patogenicidad de las amibas altamente virulentas (Zysset-Burri et al. 2014). De manera similar, se han descrito diferencias en la expresión génica entre la cepa HM1:IMSS altamente virulenta de *Entamoeba histolytica* y la cepa avirulenta *Rahman*. Los autores observaron una expresión dos veces mayor del ARNm correspondiente a la subunidad de 35 kDa de la lectina Gal/GalNac en *E. histolytica*, y una menor expresión en la cepa avirulenta *E. rahman*. Así mismo, los autores evaluaron la expresión a nivel de proteína; la subunidad de 35 kDa de la lectina se

incrementó tres veces en *E. histolytica* en comparación con *E. rahman* (Ankri et al. 1999).

En este sentido, es importante analizar las diferencias y similitudes presentadas en la especie patógena *N. fowleri* cuando se compara con las no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*. En diversos estudios se aborda el papel fundamental de las proteínas de membrana en los procesos de daño, las cuales podrían conferir o participar en ciertos comportamientos patógenos. En los parásitos *E. histolytica* y en la no patógena *Entamoeba dispar*, los cuales son morfológicamente indistinguibles y comparten glicoproteínas que se conoce que están involucradas en la virulencia de *E. histolytica*, por ejemplo la lectina Gal/GalNac. Dodson y col. (1997) describieron que el carbohidrato GalNac inhibe la adherencia a las células CHO en una alta proporción en *E. histolytica* en comparación con *E. dispar*. Los autores demostraron una alta identidad en las subunidades pesadas y ligeras de la lectina en la especie *E. dispar* con 86% y 79% de identidad, respectivamente (Dodson et al. 1997).

El análisis comparativo del genoma entre las tres especies de *Naegleria* muestra que el genoma de *N. gruberi* tiene un tamaño de 41 Mb con un contenido de GC del 33%; además *N. gruberi* posee aproximadamente 15,727 genes que codifican proteínas (Fritz-Laylin et al. 2010). Del mismo modo, el genoma nuclear de *N. fowleri* tiene un tamaño de 29,619 Mb con un contenido de GC del 35.4% y 17,252 genes codificantes para proteínas (Zysset-Burri et al. 2014). *N. lovaniensis* tiene un tamaño total de 30.8 Mb y un contenido de GC del 37% con 15,195 genes codificantes de proteínas (Liechti et al. 2018). Por otro lado, otros autores también han analizado las diferencias en el genoma mitocondrial de las tres especies de *Naegleria*; *N. lovaniensis* presenta un tamaño de 48.553 pb la cual tiene un genoma mitocondrial pequeño en comparación con *N. fowleri* con 49.519 pb y *N. gruberi* con 49.842 pb.

Así mismo, por un análisis comparativo de la agrupación en familias de genes indica que, 2,406 familias de genes se comparten entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, mientras que *N. gruberi* solo comparte 267; *N. lovaniensis* únicamente comparte 410 familias de genes con *N. gruberi*. *N. fowleri* comparte 9,547 genes con *N.*

lovaniensis, mientras que solo 5,831 se comparte con *N. gruberi*. Específicamente se conoce que 191, 323 y 626 familias de genes son específicos de *N. lovaniensis*, *N. fowleri* y *N. gruberi*, respectivamente (Liechti et al. 2018; Zysset-Burri et al. 2014).

Esta información sugiere una estrecha relación filogenética entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, las cuales pudieron evolucionar de un ancestro común, mientras que *N. gruberi* se encuentra más distante (De Jonckheere 2011; De Jonckheere 2014; Liechti et al. 2018). A pesar de todas estas características genómicas tan similares, a la fecha se desconocen los factores que confieren la patogenicidad de *N. fowleri*. Por lo que muy probablemente existe un sofisticado sistema de regulación transcripcional, lo que resulta en la sobreexpresión de proteínas en la especie patógena *N. fowleri* y no en *N. lovaniensis*. Además, la membrana citoplasmática, los mecanismos de transporte vesicular, las proteínas del citoesqueleto y las proteínas de secreción se expresan altamente en *N. fowleri* en comparación con *N. lovaniensis* (Liechti et al. 2018; Zysset-Burri et al. 2014).

Es por estos puntos que en los parásitos que muestran un comportamiento patogénico, existe un gran interés en analizar la expresión diferencial de diferentes genes y proteínas probablemente implicados en la patogenicidad. Por ejemplo, la evidencia demuestra que en las cepas no patógenas del género *Entamoeba*, algunas proteínas que están involucradas en la virulencia de las especies patógenas están presentes en las especies no patógenas, pero con niveles de expresión génica disminuidos (MacFarlane y Singh 2006).

N. fowleri ejerce efecto citopático hacia diferentes tipos celulares, con un tropismo particular por células de neuroblastoma; sin embargo, este mecanismo puede ser modulado por diferentes factores tales como nutrientes, el tipo de células y la temperatura. En este proyecto, analizamos la inhibición del efecto citopático por los anticuerpos específicos contra la proteína Nf23 en las líneas celulares MDCK y SH-SY5Y. Observamos una inhibición parcial y retardo del daño producido en las células, lo que sugiere un papel importante de esta proteína en la patogenicidad de *N. fowleri*, qué en conjunto con los ensayos *in silico* de la función de la proteína, podrían sugerir que Nf23 ejerce la función de tipo receptor o estar participando en

vías de señalización que probablemente participan en el efecto citopático producido por la amiba. En este sentido, se ha informado que las glicoproteínas en la membrana citoplasmática de *N. fowleri* están involucradas en la interacción y adherencia de las amibas. Las diferencias de los gliconjugados de las células hospedero también participan ya sea favoreciendo o impidiendo un correcto reconocimiento e interacción. Estudios comparativos han informado que *N. fowleri* presenta altos niveles de gliconjugados de membrana de α -D-manosa, α -D-glucosa y α -L-fucosa en comparación con *N. gruberi* (Cervantes-Sandoval et al. 2010). Por otro lado, se ha demostrado que *N. fowleri* reconoce motivos de unión a la MEC (Jamerson et al. 2012). Todas estas diferencias en la expresión de proteínas y genes podrían afectar el fenotipo de virulencia de estas amibas, y repercutir en la capacidad de determinada amiba de producir la enfermedad, que junto con las condiciones ambientales y la susceptibilidad por parte del hospedero conducen al desarrollo de la MAP.

En este trabajo a partir de los resultados obtenidos, se observan diferencias y *similitudes* entre las especies del género *Naegleria*. Como se ha reportado, *N. fowleri* tiene una gran similitud con *N. lovaniensis* y se encuentra más distante con *N. gruberi*. Sin embargo, posiblemente la producción y expresión de proteínas están reguladas en muchos niveles, por varios elementos reguladores de expresión genética y de proteínas. Además, se ha mencionado el entorno, incluidos los factores como nutrientes, la temperatura o las moléculas con las que se están estableciendo interacciones moleculares, que puede regular el metabolismo y comportamiento de la amiba y, por lo tanto, aumentar o disminuir la producción y expresión de proteínas que pueden o no estar involucradas en los procesos de daño. En este sentido, es necesario investigar las posibles interacciones entre proteínas claves, lo que nos dará información sobre su probable función. En este sentido, se necesitan más estudios para analizar la función de la proteína de 23 kDa.

Sin embargo, es importante recalcar que el hecho de que existan las mismas proteínas en microorganismos patógenos y no patógenos, no significa que no

cumplan funciones clave en la patogenicidad. A este respecto, se necesitan más estudios para analizar el aumento o disminución de la expresión de este gen y la producción a nivel de proteína en diferentes condiciones. Además, indirectamente al conocer con que proteínas se estarían dando las interacciones, esto nos brindará evidencia molecular de los mecanismos en los que estaría participando activamente. Con estos resultados, podemos ver la similitud entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*; sin embargo, la diferencia en la patogenicidad puede radicar en que incluso cuando se produce la misma proteína, el aparato de regulación transcripcional y traduccional juega un papel fundamental, que pueden estar impactando en la virulencia de *N. fowleri*

9. Conclusión

- ✓ *N. fowleri* presenta en su membrana plasmática la proteína de membrana Nf23, la cual se encuentra sobre-expresada en *N. fowleri* así como en amibas recién recuperadas de cerebro de ratón en comparación con las especies no patógenas *N. lovaniensis* y *N. gruberi*. La inhibición de la proteína Nf23 con anticuerpos policlonales específicos produjo la disminución del efecto citopático producido por *N. fowleri* sobre células SY-H5S5 y MDCK, lo que sugiere una posible participación en la virulencia.

10. Perspectivas

- Analizar la localización de la proteína Nf23 por ensayos de marcaje por microscopía electrónica de transmisión.
- Identificar y analizar las asociaciones de la proteína de membrana Nf23 con otras proteínas de membrana o citosólicas.
- Analizar el efecto biológico y/o molecular del silenciamiento de la proteína Nf23 en trofozoítos de *N. fowleri*.

11. Bibliografía

1. Aldape, K., Huizinga, H., Bouvier, J., McKerrow, J. (1994). *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp. Parasitol.*, 78, 230-241.
2. Ankri, S., Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L., Katz, U., Mirelman, D. (1999). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol. Microbiol.*, 33, 327-337.
3. Baig, A.M. (2015). Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebae being credited to an 'inside job' done by the host immune response? *Acta Tropica*, 148, 72-76.
4. Beg, M.A., Shivangi, Thakur, S.C., Meena, L.S. (2018). Structural Prediction and Mutational Analysis of Rv3906c Gene of *Mycobacterium tuberculosis* H(37)Rv to Determine Its Essentiality in Survival. *Adv. Bioinformatics*, 2018, 1-12.
5. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
6. Burri, D.C., Gottstein, B., Zumkehr, B., Hemphill, A., Schurch, N., Wittwer, M., Muller, N. (2012). Development of a high- versus low-pathogenicity model of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology*, 158, 2652-2660.
7. Carrasco-Yépez, M., Campos-Rodríguez, R., Godínez-Victoria, M., Rodríguez-Monroy, M.A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., De Oca, A.C., Rojas-Hernández, S. (2013). *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of alpha-D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitol. Res.*, 112, 3615-3625.
8. Carrasco-Yépez, M.M., Contis-Montes de Oca, A., Campos-Rodríguez, R., Falcon-Acosta, D., Pacheco-Yépez, J., Rodríguez-Mera, I.B., Bonilla-Lemus, P., Rosales-Cruz, E., López-Reyes, I., Rojas-Hernández, S. (2019). Mouse neutrophils release extracellular traps in response to *Naegleria fowleri*. *Parasite Immunol.*, 41, 9.

9. Carter, R.F. (1970). Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, 100, 217-244.
10. Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., Rodier, M.H. (2014). Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J. Hosp. Infect.*, 87, 131-140.
11. Cervantes-Sandoval, I., J., S.-L., Garcia-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2008a). Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology*, 154, 3895-3904.
12. Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna J de, J., Meza-Cervantez, P., Arroyo, R., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2009). *Naegleria fowleri* induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation. *Microbiology*, 155, 3739-3747.
13. Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2010). Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitol. Res.*, 106, 695-701.
14. Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.d.J., García-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2008b). Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol. Int.*, 57, 307-313.
15. Contis-Montes de Oca, A., Carrasco-Yépez, M., Campos-Rodríguez, R., Pacheco-Yépez, J., Bonilla-Lemus, P., Pérez-López, J., Rojas-Hernandez, S. (2016). Neutrophils extracellular traps damage *Naegleria fowleri* trophozoites opsonized with human IgG. *Parasite Immunol.*, 38, 481-495.
16. Chang, S.L. (1978). Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Applied and Environ. Microbiol.*, 35, 368-375.
17. Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., Castañon, G., Bonilla, P., González-Lázaro, M., Hernández-Martínez, D., Salazar-Villatoro, L., Esparza-García, A., Martínez-Palomo, A., Guadalupe, O.-P. (2009).

- Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. J. Eukaryot. Microbiol., 56, 66-72.
18. Chávez-Munguía, B., Segovia-Gamboa, N., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A. (2011). *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. J. Eukaryot. Microbiol., 58, 463-468.
 19. Chávez-Munguía, B., Villatoro, L.S., Omaña-Molina, M., Rodríguez-Monroy, M.A., Segovia-Gamboa, N., Martínez-Palomo, A. (2014). *Naegleria fowleri*: contact-dependent secretion of electron-dense granules (EDG). Exp. Parasitol., 142, 1-6.
 20. De Jonckheere, J.F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. Infect. Genet. Evol., 11, 1520-1528.
 21. De Jonckheere, J.F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? Exp. Parasitol., 145, 6.
 22. Dodson, J.M., Clark, C.G., Lockhart, L.A., Leo, B.M., Schroeder, J.W., Mann, B.J. (1997). Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitol. Int., 46, 225-235.
 23. Ferrante, A., Bates, E.J. (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. Infect. Immun., 56, 3320-3321.
 24. Fritz-Laylin, L.K., Prochnik, S.E., Ginger, M.L., Dacks, J.B., Carpenter, M.L., Field, M.C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grigoriev, I.V., Cande, W.Z., Fulton, C., Rokhsar, D.S., Dawson, S.C. (2010). The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. Cell., 140, 631-642.
 25. Fritzinger, A.E., Toney, D.M., MacLean, R.C., Marciano-Cabral, F. (2006). Identification of a *Naegleria fowleri* membrane protein reactive with anti-human CD59 antibody. Infection and immunity, 74, 1189-1195.

26. González-Robles, A., Castañón, G., Cristóbal-Ramos, A.R., Hernández-Ramírez, V.I., Omaña-Molina, M., Martínez-Palomo, A. (2007). Cell surface differences of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* exposed with surface markers. *Exp. Parasitol.*, 117, 399-404.
27. González-Robles, A., Cristóbal-Ramos, A.R., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M., Martínez-Palomo, A. (2009). *Naegleria fowleri*: Light and electron microscopy study of mitosis. *Exp. Parasitol.*, 122, 212-217.
28. Grace, E., Asbill, S., Virga, K. (2015). *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrob. Agents chemother.*, 59, 6677-6681.
29. Green, K.D., Garneau-Tsodikova, S. (2010). Posttranslational Modification of Proteins. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 5, 433-468.
30. Han, K.L., Lee, H.J., Shin, M.H., Shin, H.J., Im, K.I., Park, S.J. (2004). The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol. Res.*, 94, 53-60.
31. Heggie, T.W. (2010). Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis*, 8, 201-206.
32. Heggie, T.W., Kupper, T. (2017). Surviving *Naegleria fowleri* infections: A successful case report and novel therapeutic approach. *Travel Med Infect Dis*, 16, 49-51.
33. Herbst, R., Marciano-Cabral, F., Leippe, M. (2004). Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 25955-25958.
34. Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., Leippe, M. (2002). Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 22353-22360.
35. Herman, E.K., Yiangou, L., Cantoni, D.M., Miller, C.N., Marciano-Cabral, F., Anthonyrajah, E., Dacks, J.B., Tsoulos, A.D. (2018). Identification and

- characterisation of a cryptic Golgi complex in *Naegleria gruberi*. J Cell Sci, 131, 213306.
36. Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U.-e.-A., Tahir, I.M., Akram, M., Ali Shah, S.M., Zulfqar, A., Zainab, R. (2019). *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, n/a.
37. Jamerson, M., da Rocha-Azevedo, B., Cabral, G.A., Marciano-Cabral, F. (2012). Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins. Microbiology, 158, 791-803.
38. Jamerson, M., Schmoyer, J.A., Park, J., Marciano-Cabral, F., Cabral, G.A. (2017). Identification of *Naegleria fowleri* proteins linked to primary amoebic meningoencephalitis. Microbiology, 163, 322-332.
39. Jarolim, K.L., McCosh, J.K., Howard, M.J., John, D.T. (2000). A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. J. Parasitol., 86, 50-55.
40. Johan, F. (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. Acta Protozool., 41, 309-342.
41. John, Howard, J.D.T.M. (1993). Virulence of *Naegleria fowleri* affected by axenic cultivation and passage in mice. Folia Parasitol., 40, 187-191.
42. John, D.T. (1982). Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. Annu Rev Microbiol, 36, 101-123.
43. Kang, S.-Y., Song, K.-J., Jeong, S.-R., Kim, J.-H., Park, S., Kim, K., Kwon, M.-H., Shin, H.-J. (2005). Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 12, 873-876.
44. Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature prot., 10, 845-858.

45. Lam, C., He, L., Marciano-Cabral, F. (2019). The Effect of Different Environmental Conditions on the Viability of *Naegleria fowleri* Amoebae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 13, 12719.
46. Lam, C., Jamerson, M., Cabral, G., Carlesso, A.M., Marciano-Cabral, F. (2017). Expression of matrix metalloproteinases in *Naegleria fowleri* and their role in invasion of the central nervous system. *Microbiology*, 163, 1436-1444.
47. Lares-Jiménez, L.F., Borquez-Roman, M.A., Lares-García, C., Otero-Ruíz, A., Gonzalez-Galaviz, J.R., Ibarra-Gamez, J.C., Lares-Villa, F. (2018). Potentially pathogenic genera of free-living amoebae coexisting in a thermal spring. *Exp. Parasitol.*, 195, 54-58.
48. Lee, J., Kim, J.-H., Sohn, H.-J., Yang, H.-J., Na, B.-K., Chwae, Y.-J., Park, S., Kim, K., Shin, H.-J. (2014). Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory–secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitology Research*, 113, 2765-2776.
49. Lee, Y.-J., Kim, J.-H., Jeong, S.-R., Song, K.-J., Kim, K., Park, S., Park, M.-S., Shin, H.-J. (2007). Production of Nfa1-specific monoclonal antibodies that influences the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* trophozoites on microglial cells. *Parasitology Research*, 101, 1191-1196.
50. Liechti, N., Schurch, N., Bruggmann, R., Wittwer, M. (2018). 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, 018-4994.
51. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
52. MacFarlane, R.C., Singh, U. (2006). Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis. *Infect. and Immun.*, 74, 340-351.
53. Marciano-Cabral, F. (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological reviews*, 52, 114-133.

54. Marciano-Cabral, F., Cabral, G.A. (2007). The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51, 243-259.
55. Marciano-Cabral, F., John, D.T. (1983). Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study. *Infect. and Immun.*, 40, 1214-1217.
56. Marciano-Cabral, F., Patterson, M., John, D., Bradley, S. (1982). Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *J. Parasitol.*, 1110-1116.
57. Marciano-Cabral, F.M., Fulford, D.E. (1986). Cytopathology of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 51, 1133-1137.
58. Martínez-Castillo, M., Cárdenas-Guerra, R.E., Arroyo, R., Debnath, A., Rodríguez, M.A., Sabanero, M., Flores-Sanchez, F., Navarro-García, F., Serrano-Luna, J., Shibayama, M. (2017). Nf-GH, a glycosidase secreted by *Naegleria fowleri*, causes mucin degradation: an *in vitro* and *in vivo* study. *Future Microbiol.*, 12, 781-799.
59. Martínez-Castillo, M., Cárdenas-Zúñiga, R., Coronado-Velázquez, D., Debnath, A., Serrano-Luna, J., Shibayama, M. (2016). *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J. Med. Microbiol.*, 65, 885-896.
60. Martínez, A.J., Nelson, E.C., Jones, M.M., Duma, R.J., Rosenblum, W.I. (1971). Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. An electron microscope study. *Lab. Invest.*, 25, 465-475.
61. Martínez, J., Duma, R.J., Nelson, E.C., Moretta, F.L. (1973). Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscope study. *Lab. Invest.*, 29, 121-133.
62. McCloy, R.A., Rogers, S., Caldon, C.E., Lorca, T., Castro, A., Burgess, A. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*, 13, 1400-1412.

63. Moura, H., Izquierdo, F., Woolfitt, A.R., Wagner, G., Pinto, T., del Aguila, C., Barr, J.R. (2015). Detection of biomarkers of pathogenic *Naegleria fowleri* through mass spectrometry and proteomics. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 62, 12-20.
64. Movahedi, Z., Shokrollahi, M.R., Aghaali, M., Heydari, H. (2012). Primary amoebic meningoencephalitis in an Iranian infant. *Case Rep Med*, 782854, 26.
65. Ondarza, R.N., Hurtado, G., Tamayo, E., Iturbe, A., Hernandez, E. (2006). *Naegleria fowleri*: a free-living highly pathogenic amoeba contains trypanothione/trypanothione reductase and glutathione/glutathione reductase systems. *Exp. Parasitol.*, 114, 141-146.
66. Ondarza, R.N., Iturbe, A., Hernandez, E., Hurtado, G. (2003). Low-molecular-mass thiol compounds from a free-living highly pathogenic amoeba, *Naegleria fowleri*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37, 195-204.
67. Patterson, M., Woodworth, T.W., Marciano-Cabral, F., Bradley, S.G. (1981). Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. *Journal of Bacteriology*, 147, 217-226.
68. Reveiller, F.L., Suh, S.J., Sullivan, K., Cabanes, P.A., Marciano-Cabral, F. (2001). Isolation of a unique membrane protein from *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48, 676-682.
69. Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R. (2004). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol. Res.*, 94, 31-36.
70. Roy, A., Yang, J., Zhang, Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res.*, 40, 8.
71. Saha, S., Raghava, G.P. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 65, 40-48.

72. Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. (2004a). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.*, 34, 1001-1027.
73. Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. (2004b). Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat*, 7, 41-51.
74. Seo, J., Lee, K.J. (2004). Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 37, 35-44.
75. Serrano-Luna, J., Cervantes-Sandoval, I., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2007). A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 54, 411-417.
76. Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gomez, S., Navarro-García, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi, V., Serrano-Luna, J. (2013). Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology*, 159, 392-401.
77. Shibayama, M., Serrano-Luna Jde, J., Rojas-Hernandez, S., Campos-Rodriguez, R., Tsutsumi, V. (2003). Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Can J Microbiol*, 49, 164-170.
78. Siddiqui, R., Ali, I.K.M., Cope, J.R., Khan, N.A. (2016). Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Trop.*, 164, 375-394.
79. Sohn, H.-J., Kim, J.-H., Shin, M.-H., Song, K.-J., Shin, H.-J. (2010). The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitology Research*, 106, 917-924.
80. Song, K.-J., Jang, Y.S., Lee, Y.A., Kim, K.A., Lee, S.K., Shin, M.H. (2011). Reactive oxygen species-dependent necroptosis in Jurkat T cells induced by pathogenic free-living *Naegleria fowleri*. *Parasite Immunol.*, 33, 390-400.
81. Song, K.-J., Song, K.-H., Kim, J.-H., Sohn, H.-J., Lee, Y.-J., Park, C.-E., Shin, H.-J. (2008). Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and in vitro cytotoxicity. *Parasitology Research*, 103, 313.

82. Stevens, A.R., De Jonckheere, J., Willaert, E. (1980). *Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. Int. J. Parasitol., 10, 51-64.
83. Toney, D.M., Marciano-Cabral, F. (1994). Membrane vesiculation of *Naegleria fowleri* amoebae as a mechanism for resisting complement damage. The Journal of Immunology, 152, 2952-2959.
84. Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A. (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. Pathol. Biol., 60, 399-405.
85. Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A.V., Vázquez-Morales, J.A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J.F., Lares-Villa, F. (2005). Successful Treatment of *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis by Using Intravenous Amphotericin B, Fluconazole and Rifampicin. Arch. Med. Res., 36, 83-86.
86. Visvesvara, G.S. (2013). Infections with free-living amebae. Handb Clin Neurol, 114, 153-168.
87. Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol, 50, 1-26.
88. Vyas, I.K., Jamerson, M., Cabral, G.A., Marciano-Cabral, F. (2015). Identification of peptidases in highly pathogenic vs. weakly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae. J. Eukaryot. Microbiol., 62, 51-59.
89. Wong, M.M., Karr, S.L., Chow, C.K. (1977). Changes in the Virulence of *Naegleria fowleri* Maintained *In vitro*. J. of Parasitol., 63, 872-878.
90. Yang, J., Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. Nucleic Acids Res., 43, W174-W181.
91. Yoder, J.S., Eddy, B.A., Visvesvara, G.S., Capewell, L., Beach, M.J. (2010). The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. Epidemiol Infect, 138, 968-975.

92. Zhang, C., Freddolino, P.L., Zhang, Y. (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Res.*, 45, W291-W299.
93. Zhou, L., Sriram, R., Visvesvara, G.S., Xiao, L. (2003). Genetic variations in the internal transcribed spacer and mitochondrial small subunit rRNA gene of *Naegleria spp.* *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50, 522-526.
94. Zysset-Burri, D.C., Muller, N., Beuret, C., Heller, M., Schurch, N., Gottstein, B., Wittwer, M. (2014). Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC Genomics*, 15, 1471-2164.