



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio de Microbiología Ambiental

Proyecto de Investigación CyMA

**“DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS CON RESIDUOS DE
N-ACETILGALACTOSAMINA CON POTENCIAL
INMUNOGÉNICO PRESENTES EN *Naegleria fowleri*”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
ANDREA MARGARITA MEJÍA ANGEL

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. MARÍA MARICELA CARRASCO YÉPEZ

Los Reyes Iztacala

Tlalnepantla, Edo. de Méx., 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICADA CON MUCHO AMOR:

A mis padres: Emi y Ricardo. Por haberme brindado siempre su apoyo incondicional, particularmente durante esta etapa de formación, por haberme escuchado siempre y por darme herramientas y valiosos consejos para afrontar diversas situaciones, así como también por brindarme su amor, confianza y estímulo para seguir adelante.

A mi pareja: Mario. Por ser uno de los pilares más importantes de mi vida, porque siempre estuviste a mi lado sosteniéndome y apoyándome aun cuando eso implicaba un sacrificio también para ti. Gracias por todo, por tu paciencia, tiempo, confianza, amor, etc.

A mis hermanas: Nadia, entre otras cosas, porque siempre estuviste apoyándome con cada uno de mis logros viviéndolos conmigo como si fueran tuyos. Joanna, por haberme ayudado con algunas responsabilidades cuando yo no podía hacerlo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis: la Dra. Maricela Carrasco Yépez, por su valiosa aportación a este trabajo, por sus enseñanzas y su orientación pero también por su paciencia y dedicación.

A Diego y Gaby: por su apoyo, colaboración, motivación y persistencia, por su ejemplo y enseñanzas, por compartir conmigo sus conocimientos y por brindarme su amistad.

A mis sinodales: Dr. Ignacio Terrazas, Dra. Gloria Paniagua, Dra. Patricia Bonilla y Dra. Yadira Ledesma por su colaboración al enriquecimiento de mi tesis.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental y al Laboratorio de Inmunología por el uso de las instalaciones, material y equipo para llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos y compañeros de la carrera por su cooperación, apoyo y amistad, incluyendo las risas, los enojos, etc.

A los profesores por su enseñanza, ejemplo y experiencia obtenida estudiando con ellos.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2.1 Interacciones patógeno hospedero..... | 3 |
| 2.2 Generalidades de los carbohidratos..... | 4 |
| 2.3 Carbohidratos como ligandos para receptores..... | 5 |
| 2.4 Carbohidratos como ligandos en microorganismos..... | 5 |
| 2.5 Lectinas en el estudio de interacciones proteína carbohidrato | 7 |
| 2.6 Receptores de Lectinas tipo C..... | 10 |
| 2.7 <i>Naegleria fowleri</i> | 13 |
| 2.8 Glicoconjugados en <i>Naegleria</i> | 14 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 18 |
| 4. HIPOTESIS..... | 18 |
| 5. OBJETIVOS..... | 19 |
| 5.1 Objetivo general..... | 19 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 19 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 6.1 Cultivos de <i>Naegleria</i> | 20 |
| 6.2 Detección de los glicoconjugados sobre <i>N. fowleri</i> y <i>N. lovaniensis</i> por citoquímica..... | 20 |
| 6.3 Inmunización de ratones..... | 21 |

| | | |
|-----|---|----|
| 6.4 | Extractos amebianos proteicos | 21 |
| 6.5 | Análisis en el patrón de glicoconjugados por Lectin Blot..... | 22 |
| 6.6 | Análisis estadístico..... | 22 |
| 6.7 | Análisis en el patrón de glicoproteínas con potencial inmunogénico por Western Blot..... | 23 |
| 7. | RESULTADOS | 24 |
| 7.1 | Detección de los glicoconjugados sobre <i>N. fowleri</i> y <i>N. lovaniensis</i> por citoquímica..... | 24 |
| 7.2 | Análisis en el patrón de glicoconjugados por Lectin Blot y densitometría..... | 26 |
| 7.3 | Análisis en el patrón de glicoproteínas con potencial inmunogénico por Western Blot..... | 28 |
| 8. | DISCUSIÓN..... | 33 |
| 9. | CONCLUSIONES | 38 |
| 10. | BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |

1. RESUMEN

Naegleria fowleri es una ameba de vida libre termofílica que se encuentra en suelo y en cuerpos de agua dulce como lagos, lagunas, estanques y piscinas naturales o artificiales. *N. fowleri* causa la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), que es una infección del sistema nervioso central (SNC), adquirida por exposición nasal a agua contaminada por trofozoitos de *N. fowleri*. La MAP se caracteriza por ocasionar la muerte en un periodo corto de 3 a 7 días después de que se presentan los síntomas. Los antecedentes revelan que la presencia de glicoconjugados intervienen en la infección causada por *Naegleria fowleri*, sin embargo, glicoproteínas con residuos de carbohidratos como N-acetilgalactosamina no ha sido estudiado como factor de virulencia en esta ameba. La importancia de conocer este tipo de moléculas radica en el hecho de que muchas células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas tienen receptores para estos residuos, por lo tanto, las células al reconocer estas moléculas generan una respuesta contra la infección causada por este tipo de microorganismos, por lo cual este trabajo se enfocó en detectar las glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina con potencial inmunogénico presentes en *Naegleria fowleri*. Para ello se realizó una citoquímica en la que se demostró que *N. fowleri* presenta glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina sobre su superficie. Mediante lectin blot se estableció un patrón de comparación de reconocimiento de las glicoproteínas con una especie no patógena (*N. lovaniensis*) donde se determinaron ocho glicoproteínas reconocidas en ambas especies de *Naegleria* cuyos pesos moleculares fueron de 75, 60, 54, 50, 40, 37, 33 y 28 kDa y se evidenciaron dos glicoproteínas reconocidas únicamente en *N. fowleri* (30 y 20 kDa). Finalmente, mediante Western blot se identificaron 17 diferentes glicoproteínas así como su peso molecular con residuos de N-acetilgalactosamina, de las cuales las de 180, 120, 80, 75, 37, 33, 30, 20, 18, 16 y 13 kDa tienen potencial inmunogénico por lo que podrían participar en la infección por *Naegleria fowleri*.

2. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes tipos de infecciones atribuidas a una gran diversidad de patógenos tales como virus, bacterias, protozoarios, helmintos y hongos. Estas enfermedades infecciosas causadas por estos patógenos son establecidas por la colonización del microorganismo, la cual se inicia en la superficie de las mucosas (Liu *et al.*, 2009).

Es importante señalar que, particularmente la mucosa nasal constituye un sitio importante en la defensa contra microorganismos patógenos que invaden a través de esta (Kuper *et al.*, 1992) y es a menudo la primera interfaz entre el hospedero y el huésped ya que la mucosa constituye una barrera contra el sistema de propagación de los microorganismos (Liu *et al.*, 2009).

Tanto la microbiota como los patógenos están normalmente confinados a sitios de la mucosa por respuestas locales de inmunidad innata (Liu *et al.*, 2009), pero también existe una cooperación del sistema linfóide nasal con el sistema inmune sistémico el cual influye con las reacciones inmunes en sitios mucosales distantes tales como el tracto urogenital y gastrointestinal (Bergquist *et al.*, 1997).

Se han realizado varios estudios enfocados en aspectos moleculares y celulares involucrados en la interacción del microorganismo con las células del hospedero ya que se sabe que previamente se lleva a cabo la adhesión de éstos a las células epiteliales o a la superficie del moco y posteriormente se establece la colonización de los microorganismos patógenos (Liu *et al.*, 2009).

Algunos de estos estudios han sugerido que microorganismos como bacterias, virus y algunos protozoarios pueden emplear un repertorio de factores de virulencia que les permiten la penetración tales como adhesinas que se unen a sus receptores afines en la superficie de adherencia de las células de la mucosa

(Liu *et al.*, 2009). Existe una especificidad de unión entre las adhesinas de los microorganismos y los receptores de las células del hospedero que permite a estos microorganismos unirse firmemente a las superficies de las mucosas (Sharon & Lis, 1993).

Cabe mencionar que además de la adhesión también existen otros importantes eventos que les permiten a los microorganismos establecer una exitosa colonización sobre la superficie de las mucosas y posteriormente dar inicio a la infección (Liu *et al.*, 2009). Durante el proceso infeccioso se llevan a cabo eventos, tales como la proliferación de células epiteliales, el incremento en la secreción de moco y el incremento de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios dados por células de la mucosa y de la submucosa, así como la habilidad de los patógenos para acceder a los nutrientes en dicho contexto inflamatorio (Neutra *et al.*, 2001).

2.1 Interacciones patógeno hospedero.

Existen tres principales tipos de interacciones que se pueden aplicar a algunos microorganismos. El primer tipo de interacción es dado por el reconocimiento de lectinas-carbohidrato, en el cual la lectina (proteína de origen no inmune) puede estar tanto sobre la superficie del microorganismo o bien sobre la superficie de las células del hospedero. El segundo tipo involucra el reconocimiento de una proteína del microorganismo con una proteína complementaria de la célula del hospedero, es decir, interacción de proteína - proteína. El tercer tipo involucra la interacción entre motivos hidrofóbicos de proteínas y lípidos en el cual estos últimos se encuentran o bien sobre la superficie del microorganismo o sobre la superficie de las células mucosales (Madison *et al.*, 1994).

Dichas interacciones sugieren que hay una correlación entre la adhesina y el receptor con la patogénesis microbiana. En general, aislados virulentos y no virulentos de diferentes patógenos han manifestado una dependencia de las

interacciones de los carbohidratos con los ligandos del hospedero (Sharon & Lis, 2004).

2.2 Generalidades de los carbohidratos

Los carbohidratos, constituyen una de las familias de macromoléculas de origen biológico más diversas y abundantes. En la naturaleza representan una extensa clase de biopolímeros distribuidos ampliamente ya que se encuentra en casi todos los animales y plantas y se producen como monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos o glicoconjugados. El reconocimiento de los carbohidratos juega un papel clave en la mediación de interacciones entre células y otros elementos del ambiente celular. Principalmente llevan a cabo un proceso de conjugación entre proteínas, lípidos y carbohidratos que da como resultado un complejo de moléculas tales como glicoproteínas, glicolípidos, o proteoglicanos. La glicosilación es considerada una de las más comunes modificaciones postraduccionales de proteínas y es responsable de modular funciones de las proteínas tanto en las superficies celulares como dentro de la célula. Por lo anterior están implicados en diversos procesos biológicos como: la adhesión celular donde intervienen interacciones célula-célula o reconocimiento ligando-receptor, la transferencia de información mediante el transporte de macromoléculas biológicas, reconocimiento de procesos inmunes, entre otras funciones por ejemplo la tipificación de grupo sanguíneo. De igual forma los oligosacáridos presentes en la superficie celular contribuyen a procesos biológicos críticos tales como la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, enfermedades mortales (trastornos congénitos de la glicosilación), la infección bacteriana y viral, y la biosíntesis de glicoproteínas, en donde la interacción carbohidrato-proteína puede ser de vital importancia para el funcionamiento celular (Zeng *et al.*, 2012).

2.3 Carbohidratos como ligandos para receptores

Las funciones biológicas conocidas de carbohidratos son numerosas. Una de ellas es que pueden actuar como receptores específicos para una gran variedad de microorganismos como virus, bacterias, parásitos e incluso para toxinas bacterianas y pueden servir como antígenos para las reacciones autoinmunes. Estos receptores pueden ser de origen microbiano o parasitario (hemaglutininas, adhesinas, toxinas, etc.) o puede estar implicado dentro de la lectina (Gagneux & Varki, 1999).

Por tanto, las lectinas han sido utilizadas como herramientas específicas para el estudio de la expresión de las cadenas de azúcar, ya que los azúcares que se encuentran presentes sobre las superficies celulares ya sea del hospedero o del microorganismo, una vez que se unen a su ligando, pueden proporcionar señales para ayudar a los microorganismos a entrar más fácilmente, o por otro lado, la adición de estos azúcares a las proteínas del hospedero pueden enmascarar secuencias reconocidas por el microorganismo y así evitar la colonización (Ohland & Macnaughton, 2010).

2.4 Carbohidratos como ligandos en microorganismos

Una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoarios y helmintos sintetizan estructuras de carbohidratos. Recientes estudios indican que las respuestas inmunes a parásitos en animales y humanos infectados son atribuidas a determinantes glicanos dentro de la superficie celular que a su vez secretan glicoconjugados que son importantes en las interacciones parasito-hospedero, ya que a menudo son antigénicas y necesarias para la invasión del huésped (Nyame *et al.*, 2004).

Los principales parásitos protozoos incluyen especies de *Plasmodium* (causante de malaria), *Entamoeba histolytica* (que causa disentería amibiana), las especies

de *Leishmania* (que causan leishmaniasis), especies de *Trypanosoma* (causantes de la enfermedad del sueño y la enfermedad de Chagas), algunas especies de *Acanthamoeba* (que causan la queratitis amebiana) y *Naegleria fowleri* (que causa la meningitis amebiana primaria) (MAP) (Nyame *et al.*, 2004).

Por otro lado, tenemos a la glicoproteína viral gp120 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), en donde aproximadamente el 50% de los 120KDa del peso molecular de la gp120 de la cubierta del virus se debe a los carbohidratos presentes en ella, los cuales son sintetizados por el hospedero (ya que el VIH no es capaz de producir sus propios carbohidratos) principalmente residuos de α -D-manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y L-fucosa (Helenius & Aebi, 2001). Los carbohidratos presentes en la superficie de la glicoproteína viral gp120 son reconocidos a través de la proteína DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Nonintegrin) presente en las células dendríticas y macrófagos a nivel de la mucosa (Geijtenbeek *et al.*, 2000).

Es evidente que el papel de los glicoconjugados así como de las proteínas de unión a éstos, es muy importante en la infección de una gran variedad de microorganismos. Por ejemplo, una de las principales glicoproteínas expresadas por *Entamoeba histolytica*, es una lectina que reconoce residuos de galactosa y N-acetilgalatosamina (Gal/GalNAc), teniendo como resultado la adhesión de los trofozoitos a las células del hospedero (Petri *et al.*, 2002).

Otro ejemplo es el de *Acanthamoeba* (protozooario anfizoico), la cual causa la queratitis amebiana en el que se ha encontrado que la adhesión de *Acanthamoeba polyphaga* a osteoblastos humanos depende en un 75% de los glicoconjugados presentes sobre la superficie de la amiba, específicamente residuos de α -D-manosa, y además se sabe de la posible intervención de una lectina que es capaz de mediar la adhesión a las células del hospedero la cual se

une a glicoproteínas del epitelio corneal con residuos de manosa (Rocha-Azevedo *et al.*, 2006).

También está el protozooario causante de encefalitis amebiana en humano, *Balamuthia mandrillalis*. Esta amiba reconoce carbohidratos de superficie presentes en el endotelio que le dan la capacidad de adherirse a las células endoteliales del cerebro humano, principalmente la unión se da a glicoproteínas con residuos de Galactosa (Matin *et al.*, 2007).

Así como en el caso de los patógenos mencionados anteriormente, hay evidencia de que la adhesión de *Naegleria fowleri* a las células del hospedero es un factor crítico durante el proceso de citopatogenicidad (Marciano-Cabral, 1988). Probablemente un factor importante en la progresión de la enfermedad es la capacidad de los trofozoitos de *N. fowleri* para adherirse a la mucosa nasal (Han *et al.*, 2004). Sin embargo, poco se sabe de las moléculas que están implicadas en la adhesión.

2.5 Lectinas en el estudio de interacciones proteína carbohidrato.

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que poseen la propiedad de unirse reversiblemente y con elevada afinidad a monosacáridos u oligosacáridos específicos que se encuentran en glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos. Este reconocimiento y unión puede ser en posición terminal o intermedia. Poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato de ahí su capacidad para aglutinar células, las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune (Ruiz-Gutiérrez, 2001).

Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como en vertebrados superiores. Aunque varias de estas proteínas poseen especificidad por estructuras sacarídicas semejantes, presentan actividades

biológicas diversas, como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies, la estimulación mitogénica, migración de linfocitos, inhibición de la fagocitosis y pueden tener efectos protectores en contra de la acción patogénica de ciertos microorganismos. En diversas especies animales se han reportado evidencias de que participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células envejecidas y microorganismos mediante un proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica. Las lectinas también participan en procesos de reconocimiento que permiten la diferenciación celular, la organogénesis, y como factores determinantes en la metástasis. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido (Hernández-Cruz *et al.*, 2005).

Las lectinas vegetales (Tabla I) (como la utilizada en este trabajo) se caracterizan por reconocer específicamente carbohidratos por enlaces no covalentes tipo puente de hidrógeno, iones, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals entre otras. Estructuralmente existen características comunes entre las lectinas de una familia determinada, lo que ha permitido el estudio de la interacción lectina-carbohidrato. Una de las características estructurales ampliamente estudiada es el dominio de reconocimiento a carbohidrato, el cual se puede dividir en dos subsitios, el primero de ellos corresponde al sitio donde se da la interacción con el monosacárido, mientras que el segundo, que se conoce como sitio extendido, permite una interacción con oligosacáridos más complejos. Esta característica permite explicar las diferencias en efectos biológicos que existen entre las lectinas con la misma especificidad hacia un monosacárido. La caracterización del sitio de reconocimiento hacia monosacáridos ha permitido encontrar algunos residuos de aminoácidos importantes para la interacción lectina-carbohidrato (Lee *et al.*, 2012).

Las lectinas pueden ser clasificadas en las que reconocen N-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetil-glucosamina y lectinas que reconocen a los O-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetilgalactosamina. Jacalina (*Artocarpus integrifolia*) es una lectina en forma de prisma β cuya estructura es tridimensional que reconoce a los O-glicanos. Es una lectina tetramérica glicosilada, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular (Arockia-Jeyaprakash, *et al.*, 2002).

Tabla I. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos.

| MONOSACARIDO | LECTINA | ABREVIATURA |
|--|--------------------------------|-------------|
| α -D-manosa, α -D-glucosa | <i>Canavalia ensiformis</i> | ConA |
| | <i>Lens culinaris</i> | LCA |
| β -galactosa, N-acetil- α -galactosamina | <i>Ricinus communis</i> | RCA |
| | <i>Glycine max</i> | SBA |
| | <i>Arachis hypogaea</i> | PNA |
| | <i>Amaranthus leucocarpus</i> | ALL |
| | <i>Artocarpus integrifolia</i> | JAC |
| N-acetil- β -glucosamina | <i>Triticum vulgare</i> | WGA |
| α -D-fucosa | <i>Lotus tetragonolobus</i> | LTA |
| | <i>Ulex europeus</i> | UEA |
| α -N-acetilneuramínico | <i>Limulus polyphemus</i> | LPA |

2.6 Receptores de lectinas tipo C

Las lectinas tipo C representan una gran familia de lectinas dependientes de Ca^{++} que comparten una estructura primaria homóloga en sus dominios de reconocimiento a carbohidratos. Esta familia incluye receptores endocíticos, proteoglicanos, colectinas y selectinas, que pueden encontrarse en todo el reino animal. Las lectinas tipo C están involucradas en muchas funciones de sistema inmune como inflamación, inmunidad a las células tumorales así como viralmente infectadas (Varki, *et al.*, 1999).

Los receptores de lectina tipo C (CLRs) comprenden una gran familia de receptores que se unen a carbohidratos, a través de uno o más dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRDs), o que poseen estructuras similares a los dominios de lectina tipo C (CTLDs) que no necesariamente reconocen los ligandos de carbohidratos (Hoving, *et al.*, 2014).

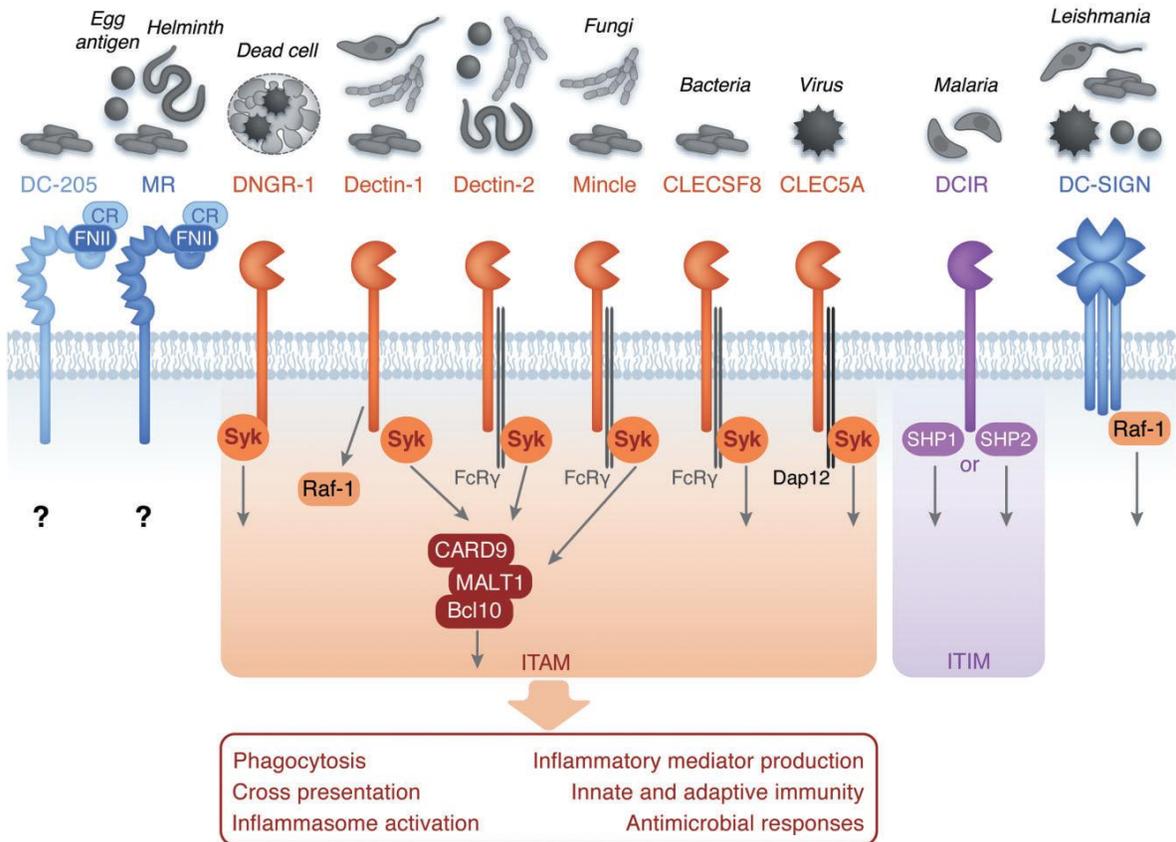


Fig. 1 Reconocimiento de microorganismos mediante señalización de CLR. Representación de algunos receptores de lectina de tipo C. Se muestran los microorganismos que reconocen, las principales vías de señalización intracelular utilizadas por estos receptores y las respuestas que inducen.

DC-SIGN es un CLR de tipo II que tiene un único dominio de lectina de tipo C y se expresa en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos. Posee la afinidad más alta para los glicanos que contienen manosa y fucosa que se encuentran en ciertas superficies microbianas y en los antígenos del grupo sanguíneo y posee preferencia por los oligosacáridos de unión unidos en una forma α -anomérica (De Leur, 2014). Modula la señalización de TLR al nivel del factor de transcripción NF- κ B, sin embargo, se requiere una activación previa de TLR de NF- κ B. DC-SIGN está implicada en el reconocimiento de varios virus como VIH-1, VHC, virus del dengue, CMV, virus ebola así como en otros microorganismos de las especies de *Leishmania* y *Candida*. Se ha demostrado

que *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *C. albicans*, virus del sarampión y VIH-1 interactúan con DC-SIGN para activar la vía de señalización dependiente de la activación de Raf-1 y modular la señalización de TLR. Por lo tanto, esta vía está implicada en la regulación de la inmunidad adaptativa por DC a patógenos bacterianos, fúngicos y virales (den Dunnen J. *et al.*, 2009).

El receptor de manosa (MR) es un CLR de tipo I que está presente en las células fagocíticas y poseen una composición única de ocho CRDs presentes en un esqueleto de polipéptido único, un dominio rico en cisteína N-terminal, un único dominio de fibronectina de tipo II (FNII) y un dominio complejo citoplasmático corto. Un motivo de señalización C-terminal concebible mejora las propiedades endocíticas que promueven la captación de ligandos en la célula mediante la interacción receptor-ligando. Después de la endocitosis, puede ocurrir el reciclado del receptor a la membrana celular. Posee la capacidad de unir manosa, fucosa y N-acetilglucosamina (GlcNac) de una manera dependiente de Ca^{2+} , MR vía CRD4 y CRD8 (De Leur, 2014).

A diferencia de los CLRs que reconocen manosa y fucosa, sólo se conoce en el sistema inmune una única lectina cuyo dominio de reconocimiento a carbohidrato (CRD) es afín a galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (GalNAc), la denominada lectina de unión a galactosa presente en macrófagos (MGL). El MGL humano es un CLR endocítico de tipo II que se expresa exclusivamente como un homooligómero en células dendríticas mieloides y macrófagos. MGL expresa únicamente la especificidad para los residuos terminales de GalNAc. Estos restos terminales de GalNAc de MGL están implicados en el control de la inmunidad adaptativa (De Leur, 2014). A diferencia del humano, en ratón existen dos MGL's distintas: MGL1 y MGL2; MGL1 tiene alta afinidad con los oligosacáridos que contienen un terminal Gal- (Fuc-) GlcNAc, es decir, la estructura de Lewis X (Le^X) mientras que MGL2 se une preferentemente a oligosacáridos con un residuo terminal de GalNAc (Yamasaki, 2016).

2.7 *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri es una amiba de vida libre termofílica cuya temperatura óptima es de 40 a 45°C, se encuentra en suelo y en cuerpos de agua dulce como lagos, lagunas, estanques y piscinas naturales o artificiales. Su ciclo de vida comprende tres estadios: forma flagelar, trofozoito y quiste, cuyo único estado infectivo de la amiba es el trofozoito. Los trofozoitos se replican por división binaria durante la cual la membrana nuclear permanece intacta (un proceso llamado promitosis). Esta amiba causa una infección del sistema nervioso central (SNC), conocida como meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) adquirida por exposición nasal a agua contaminada por trofozoitos de *N. fowleri* principalmente durante los meses de verano cuando la temperatura del agua se eleva, o en cuerpos de agua construidos por el hombre y donde esta se calienta con plantas de poder, tales como plantas termoeléctricas, lo que permite el crecimiento de este microorganismo. La MAP se caracteriza por ser aguda y fulminante ya que ocasiona la muerte en un periodo corto de 3 a 7 días después de que se presentan los síntomas (Schuster & Visvesvara, 2004).

Las víctimas en su mayoría son personas jóvenes y sanas con una reciente historia de actividades acuáticas. La ruta de entrada al hospedero por parte de *N. fowleri* es a través del neuroepitelio olfatorio. Los trofozoitos pueden ser observados dentro de las lesiones del sistema nervioso central, localizadas principalmente alrededor de los vasos sanguíneos (Martínez & Visvesvara, 1997).

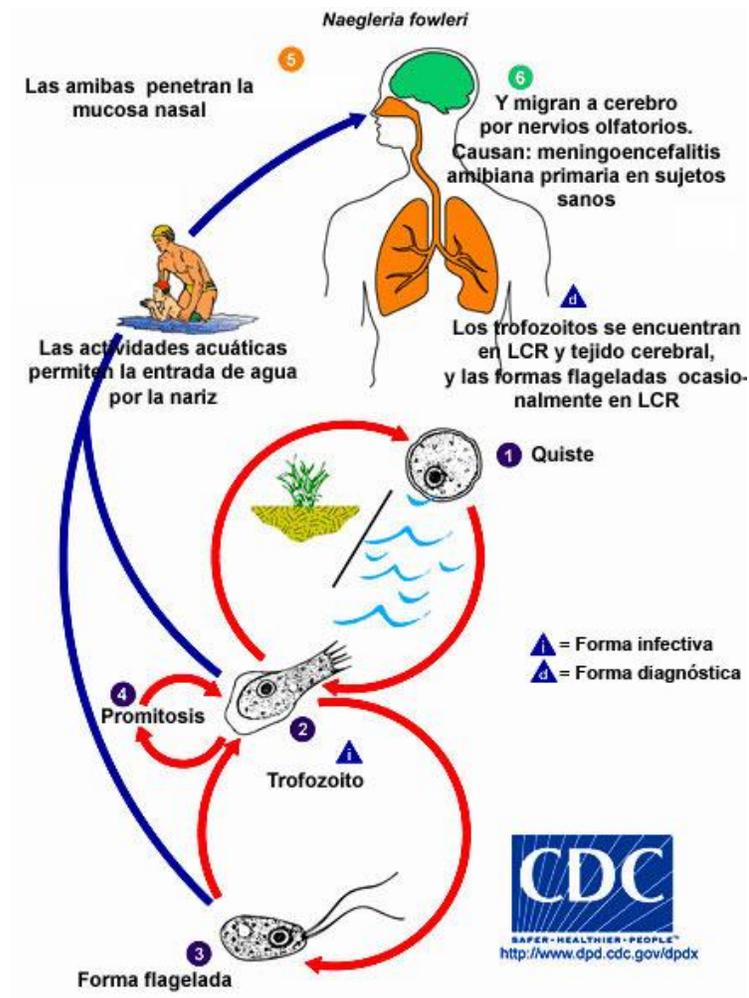


Fig. 2 Infección y ciclo de vida de *Naegleria fowleri*.

2.8 Glicoconjugados en *Naegleria*

Como ya se mencionó, algunos residuos de carbohidratos presentes sobre la membrana de los microorganismos parecen tener un papel importante durante el proceso de adhesión. Algunos estudios como los siguientes han demostrado que los carbohidratos son el principal constituyente de las superficies de membrana de *Naegleria*.

Bose *et al.*, (1989) realizaron un estudio comparativo de los carbohidratos presentes en la superficie de membrana de trofozoitos y quistes de

Acanthamoeba castellanii, *Naegleria fowleri* (patógenas) y *A. astronyxis* (no patógena). Utilizaron 8 lectinas diferentes y notaron que la PNA (aglutinina de maní) y la WGA (aglutinina del germen de trigo) diferenciaron entre *A. castellanii* como patógena y *A. astronyxis* como no patógena. Sin embargo UEA I (Ulex aglutinina I) fue la única lectina que dio positivo a ambas especies de amibas patógenas, *A. castellanii* y *N. fowleri*. Este trabajo sugiere que únicamente dos lectinas pueden reconocer los factores que dan a *Acanthamoeba* su estado patogénico (PNA) y no patogénico (WGA). Interesantemente, con UEA I únicamente se pudo diferenciar entre la amiba patógena y no patógena.

Se ha observado que cepas patógenas de *N.fowleri* activan la vía alternativa del complemento pero también son resistentes a la lisis mientras que cepas poco patógenas y especies no patógenas del género *Naegleria*, sí son lisadas aunque de igual forma activan la vía alternativa del complemento. Toney y Marciano-Cabral (1992) llevaron a cabo un estudio para determinar los componentes de superficie de la amiba que le confieren resistencia a la lisis por el complemento. Mediante un estudio electroforético proteínas de 89, 60, 44 y 28 kDa fueron detectadas en *N. fowleri* altamente patogénica. Al incubar el extracto de *N. fowleri* con lectinas (Concanavalina A y *Ulex europeus*) observaron que las proteínas detectadas presentaron residuos de carbohidratos específicamente de manosa y fucosa lo que sugiere que las glicoproteínas son importantes en la resistencia a la lisis por el complemento ya que estas están ausentes en la especie no patógena de *Naegleria*. Sin embargo el papel de estas glicoproteínas en la resistencia a la infección por *N. fowleri* en un modelo *in vivo* no ha sido determinado.

Por otro lado, González-Robles *et al.*, (2007) observaron que existen diferencias en la distribución de glicoconjugados en la superficie celular entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. Al teñir con dos colorantes catiónicos, azul alciano y rojo de rutenio, encontraron mayor marca en la superficie de *N. fowleri* en comparación con *N. lovaniensis* donde la marca es menor sugiriendo que la presencia de azúcares de tipo ácido se encuentran en mayor cantidad sobre *N. fowleri*. Por otro lado, la

presencia de manosa y glucosa fue revelada al incubar con Concanavalina A y observaron por microscopía electrónica marca para las dos especies de una forma distinta. Sin embargo, no identifican cuáles pudieran ser los posibles glicoconjugados que hacen la diferencia en la composición de las diferentes especies y si pudieran ser un factor de patogenicidad para *N. fowleri*.

Cervantes-Sandoval *et al.*, (2010) describieron cuáles son los glicoconjugados presentes sobre la superficie de los trofozoitos de dos especies de *Naegleria*, *N. fowleri* como patógena y *N. gruberi* como no patógena. Usaron un panel de lectinas biotiniladas donde demostraron que trofozoitos de *N. fowleri* presentan altos niveles de glicoconjugados sobre la superficie tales como α -D manosa, α -D-glucosa y residuos de α -L-fucosa. Encontraron que la expresión de estos glicoconjugados fue significativamente diferente entre las dos especies de amibas sugiriendo que los glicoconjugados con residuos de D-manosa and L-fucosa participan en la adhesión de *N. fowleri*.

Carrasco-Yépez, *et al.*, (2013) realizaron un estudio donde analizaron el posible papel de los glicoconjugados que contienen residuos de α -D-manosa y α -D-glucosa en la adherencia de los trofozoitos de *Naegleria fowleri* y la consecuente infección causada por esta amiba en el modelo de ratón. Los trofozoitos se incubaron con 20 μ g de cada una de las tres lectinas diferentes (*Pisum sativum*, *Canavalia ensiformis*, *Galanthus nivalis*) que reconocen preferentemente estos residuos y se inocularon por vía intranasal en ratones Balb/c. Encontraron que estos glicoconjugados sí participan impidiendo adhesión e infección, ya que cuando se inoculan a los ratones con los trofozoitos de *N. fowleri* preincubados con lectinas específicas para estos residuos de azúcar, las tasas de mortalidad se ven reducidas de una forma significativa (supervivencia de 20-40%) con respecto a aquellos que son inoculados con los trofozoitos sin interactuar con alguna de las lectinas (supervivencia de 0%). Posiblemente algunas de las glicoproteínas que se encuentran en *Naegleria fowleri* representan un importante factor de adherencia. En este estudio también se comparó con una especie no patógena, *N. lovaniensis*

y se observaron muy pocas diferencias en cuanto a las glicoproteínas reconocidas por las lectinas.

Hay evidencia de que los carbohidratos con residuos de manosa, fucosa y glucosa son factores de virulencia involucrados en la adhesión del patógeno. Sin embargo, otro residuo como el de N-acetilgalactosamina no ha sido estudiado en *Naegleria fowleri*.

También cabe mencionar que residuos tales como galactosa y N-acetilgalactosamina presentes en las glicoproteínas de diferentes microorganismos tales como hongos y parásitos son importantes en el reconocimiento a las células del huésped; ya que estas estructuras glicanas tienen la capacidad de unirse a los a Receptores de lectina tipo C (CLRs) los cuales se encuentran presentes en células como macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009). Estos receptores son importantes ya que están involucrados en la inmunidad innata cuya capacidad es desencadenar vías de señalización intracelular para modificar las respuestas celulares a diferentes patógenos, por lo que estas respuestas podrían estar induciendo resistencia contra los microorganismos, de ahí la importancia de identificar las glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina sobre la superficie de *N. fowleri*.

3. JUSTIFICACIÓN

Los carbohidratos son factores de virulencia involucrados en la adhesión de los patógenos con la célula del hospedero.

Los antecedentes revelan la presencia de glicoconjugados con residuos principalmente de manosa y los cuales intervienen en la infección causada por *Naegleria fowleri*, sin embargo, glicoproteínas con residuos de otros carbohidratos como es el caso de N-acetilgalactosamina no han sido estudiados como factores de virulencia en esta amiba.

La importancia de conocer este tipo de moléculas radica en el hecho de que muchas células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas tienen receptores para estos residuos, por lo tanto, las células al reconocer estas moléculas generen una respuesta contra la infección causada por este tipo de microorganismos.

4. HIPOTESIS

Naegleria fowleri tiene glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina con potencial inmunogénico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Detectar las glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina con potencial inmunogénico presentes en *Naegleria fowleri*.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la presencia de glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina sobre la superficie de *N. fowleri* por ensayos de citoquímica.
- Identificar los pesos moleculares de las glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina de *N. fowleri* a través de lectin blots.
- Comparar el patrón de reconocimiento de las glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina con una especie no patógena (*Naegleria lovaniensis*).
- Identificar las glicoproteínas con potencial inmunogénico con residuos de N-acetilgalactosamina presentes *N. fowleri*.

6. MATERIALES MÉTODOS

6.1 Cultivos de *Naegleria*

Se trabajó con las cepas de *Naegleria fowleri* ATCC 30808 y *Naegleria lovaniensis* ATCC 30569 (American Type Culture Collection, Manassas, Va). Ambas cepas fueron cultivadas axénicamente en medio Bactocasitona suplementado con suero fetal bovino a una temperatura de 37°C. Los trofozoitos de ambas especies fueron cosechados dos veces a la semana, para lo cual las cajas se colocaron en el congelador durante 15 minutos para favorecer el desprendimiento de estos, posteriormente se llevaron a la campana de extracción previamente limpia y estéril y se colocaron en tubos tipo Falcón. Los tubos se centrifugaron (Boeco Germany U-32) a 3500 rpm durante 15 minutos. Finalmente la pastilla fue resuspendida en PHMB (ácido p-hidroximercuriobenzoico) (SIGMA, No. 55540-5G) al 10 mM.

6.2 Detección de los glicoconjugados sobre *N. fowleri* y *N. lovaniensis* por citoquímica.

Trofozoitos de *N. fowleri* y *N. lovaniensis* fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los trofozoitos fueron lavados con PBS y bloqueados con suero bovino fetal (BSA) al 1% en PBS 1X a temperatura ambiente durante 1 hora. Después los trofozoitos fueron incubados con 5 µg de una lectina biotilada, *Artocarpus integrifolia*, JAC (PIERCE, No. 39906) por 24 horas a 4^o C. Los trofozoitos fueron lavados con PBS 1X e incubados con 1 µg de estreptavidina acoplada a peroxidasa (Thermo Scientific, No. TS-060-HR) a 4^o C durante 24 horas y finalmente la reacción fue evidenciada con H₂O₂-diaminobenzidina (DAB) en PBS 1X. Las muestras fueron examinadas por microscopía de luz para determinar el patrón de la marca (tinción) a nivel de la superficie de los trofozoitos.

6.3 Inmunización de ratones

Grupos de ratones Balb/c machos de seis semanas de edad fueron ligeramente anestesiados con éter etílico e inmunizados intranasalmente con diferentes tratamientos de acuerdo a la Tabla II. En total fueron 3 tratamientos: 1) extracto total de *Naegleria fowleri*, 2) extracto total de *N. fowleri* más toxina de cólera y 3) toxina de cólera en PBS 1X. Para cada tratamiento se utilizaron 4 grupos. El número de inmunizaciones administrado a cada grupo fue variado (Tabla II) y cada inmunización se realizó semanalmente. Transcurridas 24 horas después de la última inmunización, los ratones fueron retados con 5×10^4 trofozoitos de *N. fowleri* y sacrificados a las 24 horas. Posteriormente los sueros fueron recuperados.

Tabla II. Esquema de Inmunización.

| Tratamientos | Grupos | | | |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| Ex. total de <i>N. fowleri</i> | 4 inmunizaciones | 3 inmunizaciones | 2 inmunizaciones | 1 inmunización |
| Ex. total de <i>N. fowleri</i> + CT | 4 inmunizaciones | 3 inmunizaciones | 2 inmunizaciones | 1 inmunización |
| CT + PBS 1X. | 4 inmunizaciones | 3 inmunizaciones | 2 inmunizaciones | 1 inmunización |

6.4 Extractos amebianos proteícos

Trofozoitos de *N. fowleri* y *N. lovaniensis* fueron lisados por medio de β -octyl-D-glucopyranosido para la obtención del extracto total. Los trofozoitos cosechados fueron suspendidos en PHMB (ácido p-hidroximercuriobenzoico) (SIGMA, No. 55540-5G) al 10 mM. A esta suspensión se agregó β -octyl-D-glucopyranosido (Thermo Scientific, No. 28310) en una proporción de 1 μ g por ml. Después, la suspensión fue agitada en vortex (Fisher Vortex Genie 2) durante 5 minutos y posteriormente se colocó en baño maría durante 1 minuto. El extracto resultante se cuantificó con un espectrofotómetro (UV/VIS Spectrophotometer).

6.5 Análisis del patrón de glicoconjugados por Lectin Blot

Para la detección de los carbohidratos en las membranas de nitrocelulosa, se siguió el protocolo propuesto por Thomas *et al.*, (2009) con algunas modificaciones. 20 μg de proteína de *N. fowleri* y *N. lovaniensis* fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, Bio Rad) (12 % poliacrilamida), y transferidos (400 mA por 1 h) a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche baja en grasa (Svelty) al 10% disuelta en PBS-Tween (buffer fosfato de sodio 10mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05%) e incubadas durante toda la noche a 4⁰C. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con la lectina biotinilada jacalina a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dilución 1:500) en PBS-Tween e incubadas durante toda la noche a 4⁰C. Al día siguiente las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con PBS-Tween e incubadas con estreptavidina acoplada a la peroxidasa a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1:1000) durante toda la noche a 4⁰C. De nuevo las tiras fueron lavadas con PBS-Tween y la actividad enzimática fue detectada con el sustrato (H₂O₂ 0.1%, metanol al 17.5%, 4-chloro- α -naphthol al 0.15% y 82.5% de PBS). Finalmente las proteínas que reaccionaron con las lectinas fueron identificadas en las tiras de las membranas de nitrocelulosa y los pesos moleculares fueron determinados.

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó una densitometría del lectin blot en la que se calculó el área de las bandas obtenidas por medio del software Image J. Las diferencias estadísticamente diferentes fueron determinados mediante pruebas no paramétricas utilizando el test de rangos de Wilcoxon de U de Mann-Whitney.

6.7 Análisis del patrón de glicoproteínas con potencial inmunogénico por Western Blot

Para la detección de las glicoproteínas en las membranas de nitrocelulosa, se siguió el protocolo propuesto por (Thomas *et al.*, 2009) con algunas modificaciones. 20 μg de proteína de *N. fowleri* fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, Bio Rad) (7% y 14% poliacrilamida), y transferidos (400 mA por 1 h) a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche baja en grasa (Svelty) al 10% disuelta en PBS-Tween (buffer fosfato de sodio 10mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05%) e incubadas durante toda la noche a 4⁰C. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con los sueros de los ratones previamente inmunizados a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dilución 1:100) en PBS-Tween e incubadas durante toda la noche a 4⁰C. Al día siguiente las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con PBS-Tween e incubadas con los antisueros peroxidados (αIgG) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1:1000) durante toda la noche a 4⁰C. De nuevo las tiras fueron lavadas con PBS-Tween y la actividad enzimática fue detectada con el sustrato (H_2O_2 0.1%, metanol al 17.5%, 4-chloro- α -naphthol al 0.15% y 82.5% de PBS). Finalmente las proteínas que reaccionaron fueron identificadas en las tiras de las membranas de nitrocelulosa y los pesos moleculares fueron determinados.

7. RESULTADOS

7.1 Detección de los glicoconjugados sobre *N. fowleri* y *N. lovaniensis* por citoquímica.

Glicoconjugados con residuos de N-acetilgalactosamina fueron identificados por una citoquímica (Fig. 3) usando una lectina biotinilada (*Artocarpus integrifolia*, JAC). Después de incubar los trofozoitos de *N. fowleri* y *N. lovaniensis* con la lectina y estreptavidina se observó un marcaje dado por una tinción homogénea en las amibas (Fig. 3 A y B). Mientras que en las que fueron incubadas con estreptavidina acoplada a peroxidasa solamente (grupo control) se observó una ligera marca (Fig. 3 C y D). Después de usar JAC se pudo observar mediante microscopía de luz que las marcas entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis* son muy similares en términos de intensidad (Fig. 3 A y B). Sin embargo, se observaron diferencias en cuanto a la distribución celular ya que en *N. fowleri* se observó un aglutinamiento de las amibas (Fig.3A), el cual no se observó en *N. lovaniensis* (Fig. 3B) ni en las amibas de ambas especies incubadas solamente con estreptavidina (Fig. 3 C y D).

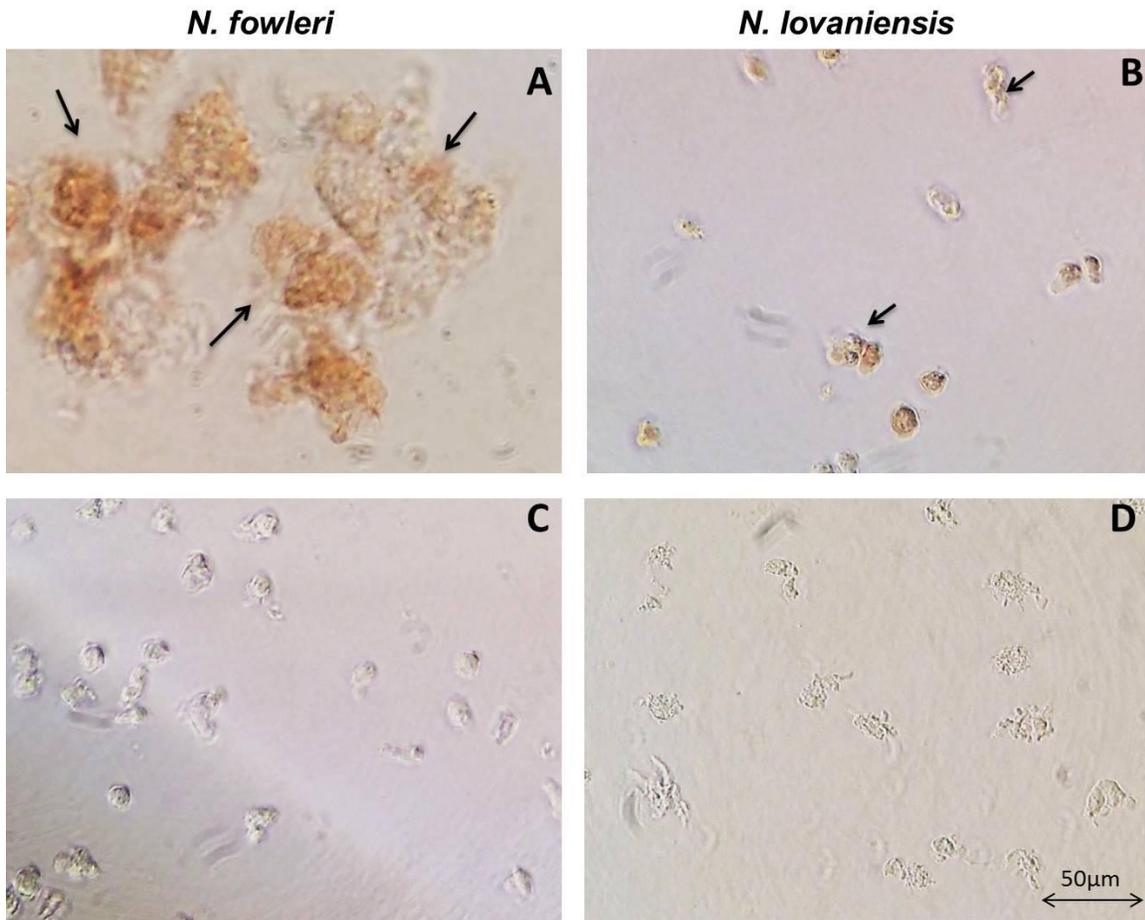


Fig. 3 Citoquímica de la interacción de los trofozoitos de *N. fowleri* y *N. lovaniensis* con las diferentes lectinas. Los trofozoitos de *N. fowleri* (A) y de *N. lovaniensis* (B) fueron incubados con lectina biotinilada (JAC). Posteriormente los trofozoitos fueron incubados con estreptavidina peroxidasa. Los grupos controles (C para *N. fowleri* y D para *N. lovaniensis*) fueron incubados solamente con la estreptavidina peroxidasa. Las lectinas respondieron a las glicoproteínas presentes sobre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. Las flechas señalan a los trofozoitos aglutinados. Escala 50 µm, 40x.

7.2 Análisis del patrón de glicoconjugados por Lectin Blot y densitometría

Al analizar los glicoconjugados de membrana de *N. fowleri* y *N. lovaniensis* mediante un Lectin blot en el que se incubaron las tiras con la lectina biotinilada JAC y posteriormente con la estreptavidina; se encontró que diferentes glicoconjugados fueron reconocidos en ambas especies (Fig. 4A). Algunos de estos glicoconjugados reconocidos por JAC fueron los mismos en ambas especies de *Naegleria* mientras que otros fueron diferentes. Ocho glicoconjugados fueron reconocidos en ambas especies, los de rMw (peso molecular relativo) de 75, 60, 54, 50, 40, 37, 33 y 28 kDa. Mientras que dos glicoconjugados fueron reconocidos únicamente en *N. fowleri*, los de 30 y 20 kDa (Fig. 4A).

También se realizó una densitometría (Fig. 4B) de las bandas encontradas en el Lectin blot (Fig. 4A) con la finalidad de conocer los valores semicuantitativos de las glicoproteínas. Se observó que aunque en el lectin blot se evidencian glicoproteínas del mismo peso, las bandas correspondientes a *N. fowleri* presentan valores más altos. Esto podría atribuirse a que hay una mayor cantidad de N-acetilgalactosamina como carbohidrato específico para jacalina en una amiba que en la otra, o bien, la conformación de dicho azúcar puede ser diferente en una especie y en otra debido a la forma en la que se une a *N. fowleri* confiriendo así un posible factor de virulencia para esta especie.

7.3 Análisis del patrón de glicoproteínas con potencial inmunogénico por Western Blot

Al analizar los glicoconjugados de *N. fowleri* en las membranas de nitrocelulosa para poder detectar glicoproteínas de alto (Fig. 5) y bajo peso molecular (Fig. 6) en el que se incubaron las tiras con los sueros de ratones sanos, infectados y previamente inmunizados, y posteriormente con α lgG de ratón acoplado a peroxidasa; se encontró que diferentes proteínas fueron reconocidas en las tiras (Fig. 5 y 6). Algunas de estas también fueron reconocidas en la tira incubada con la lectina biotinilada JAC y posteriormente con estreptavidina peroxidasa (lectin blot).

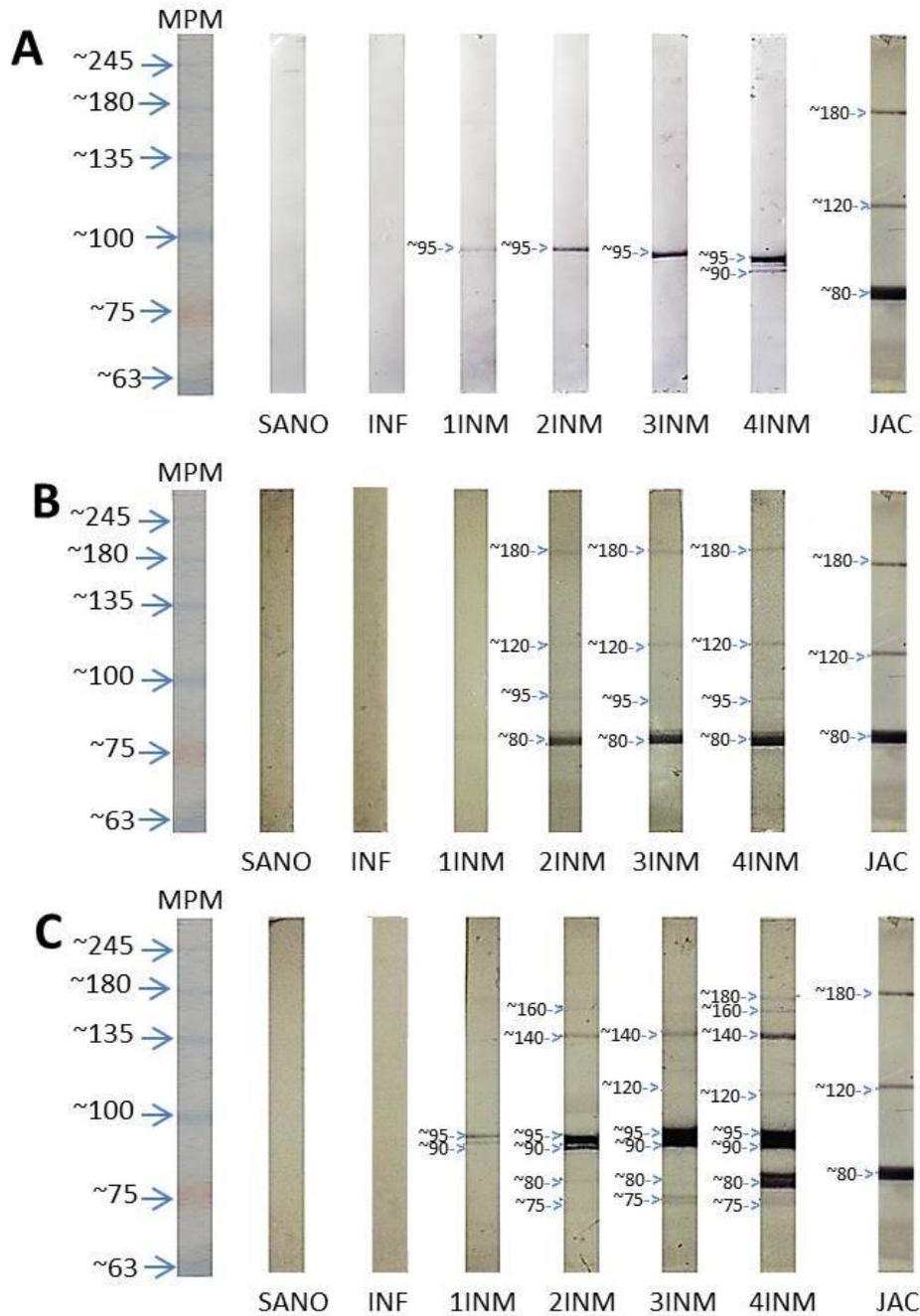


Fig. 5 Western blot que muestra la detección de proteínas de *N. fowleri* incubadas con suero de ratón previamente inmunizados de 1 a 4 veces con a) CT b) NF y c) NF+CT y posteriormente incubados con α lgG de ratón peroxidado. La última tira muestra la detección de glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina de *N. fowleri* reconocidas por medio de una lectina biotinilada (JAC) y estreptavidina peroxidasa (lectin blot). Se utilizó extracto total para cada muestra, todas fueron sometidas a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 7% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para ser probadas con los sueros. MPM, marcador de peso molecular.

Particularmente en el Western blot para proteínas de alto peso molecular (SDS-PAGE 7%) del extracto total de *N. fowleri* se observó que las de 95 y 90 kDa fueron reconocidas cuando los ratones fueron inmunizados solamente con toxina de cólera (Fig. 5A) y que estas no tienen residuos de N-acetilgalactosamina, ya que no fueron evidenciadas en la tira incubada con jacalina.

Por otro lado, se observó que en el caso del blot realizado con los sueros de los ratones que fueron inmunizados únicamente con extracto total de *N. fowleri* (Fig. 5B), se evidenciaron además de la proteína de 95 kDa que aparece cuando se inmunizan con toxina de cólera, otras proteínas cuyos pesos fueron 180, 120 y 80 kDa. Estas también son evidenciadas en la tira incubada con jacalina, por lo que se puede decir que tienen residuos de N-acetilgalactosamina. Sin embargo, se podría decir también, que estas glicoproteínas son inmunogénicas por ellas mismas, ya que son evidenciadas sin necesidad de actividad adyuvante.

Finalmente, se encontró que se evidencian otras proteínas cuando los ratones se inmunizan con extracto total de *N. fowleri* coadyuvado con toxina de cólera (Fig. 5C), tales como la de 160, 140 y 75 kDa, de las cuales, la de 75 kDa (Fig. 6C) tiene residuos de N-acetilgalactosamina, ya que es evidenciada en la tira incubada con jacalina. En el caso de las proteínas de 160 y 140 kDa, así como de la glicoproteína de 75 kDa, se puede decir que tienen potencial inmunogénico, ya que se puede observar como las bandas correspondientes a éstas (160, 140 y 75 kDa) se van tornando más intensas conforme aumenta el número de inmunizaciones. Por otro lado, se observa nuevamente la presencia de las glicoproteínas de 180, 120 y 80 kDa que ya habían sido evidenciadas cuando se inmuniza solo con extracto total de *N. fowleri*, y se observó igual la presencia de las proteínas de 90 y 95 kDa.

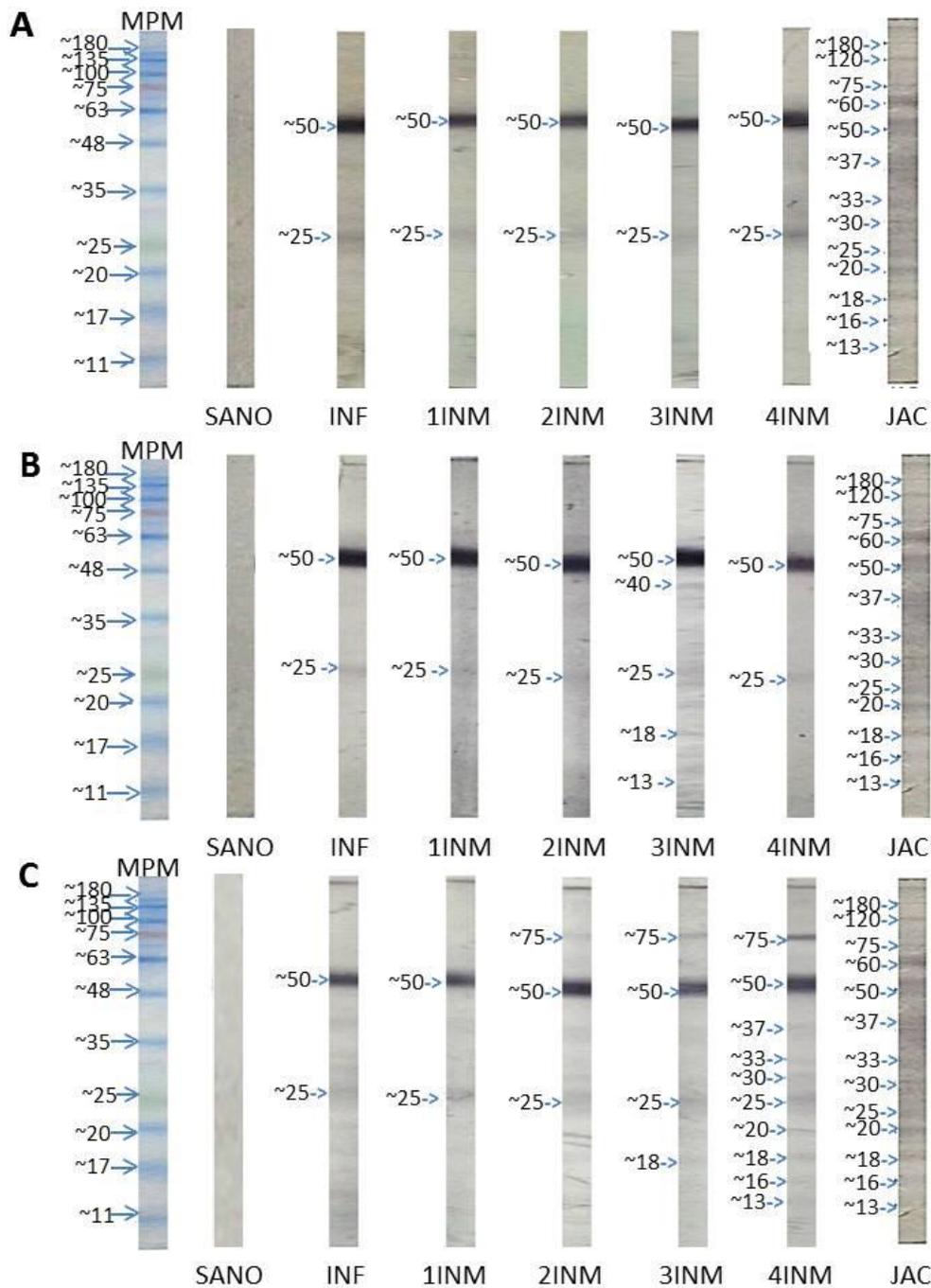


Fig. 6 Western blot que muestra la detección de proteínas de *N. fowleri* incubadas con suero de ratón previamente inmunizados de 1 a 4 veces con a) CT b) NF y c) NF+CT y posteriormente incubados con algG de ratón peroxidado. La última tira muestra la detección de glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina de *N. fowleri* reconocidas por medio de una lectina biotinilada (JAC) y estreptavidina peroxidasa (lectin blot). Se utilizó extracto total para cada muestra, todas fueron sometidas a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 14% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para ser probadas con los sueros. MPM, marcador de peso molecular.

En cuanto al Western blot realizado para proteínas de bajo peso molecular (SDS-PAGE 14%) del extracto total de *N. fowleri* se observó que las de 50 y 25 kDa fueron reconocidas cuando los ratones fueron inmunizados solamente con toxina de cólera (Fig. 6A) de las cuales la de 50 kDa tiene residuos de N-acetilgalactosamina, mientras que la de 25 kDa no los tiene, esto de acuerdo a la tira incubada con jacalina.

También se observó que en el caso del blot realizado con los sueros de los ratones que fueron inmunizados únicamente con extracto total de *N. fowleri* (Fig. 6B), se observaron además de la glicoproteína de 50 kDa y la proteína de 25 kDa que aparecen cuando se inmuniza con toxina de cólera, otras proteínas cuyos pesos fueron 40, 18 y 13 kDa, las que son evidenciadas en la tira incubada con jacalina, por lo que se puede decir que poseen residuos de N-acetilgalactosamina. Sin embargo, al igual que en el caso de las glicoproteínas de alto peso molecular, se podría decir que estas glicoproteínas son inmunogénicas por ellas mismas, ya que son evidenciadas sin necesidad de la intervención de un adyuvante.

Por último, se observaron otras proteínas evidenciadas cuando los ratones se inmunizaron con extracto total de *N. fowleri* coadyuvado con toxina de cólera (Fig. 6C), tales como la de 75, 37, 33, 30, 20 y 16 kDa, las cuales tienen residuos de N-acetilgalactosamina, ya que están presentes en la tira incubada con jacalina, y además son inmunogénicas ya que las bandas se pueden observar en la tira correspondiente a 4 inmunizaciones. Por otro lado, se observa nuevamente la presencia de las glicoproteínas de 18 y 13 kDa que ya habían sido evidenciadas cuando se inmuniza solo con extracto total de *N. fowleri*, y se observó también la presencia de la glicoproteína de 50 kDa y de la proteína de 25 kDa.

8. DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó en encontrar diferencias en cuanto a la cantidad y distribución de los carbohidratos de superficie con residuos de N-acetilgalactosamina de dos especies de *Naegleria*, *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, así como determinar el peso molecular de estas glicoproteínas con el fin de determinar si algunas son específicas en la especie patógena. Por otro lado, también estuvo enfocado en identificar las glicoproteínas de *N. fowleri* con potencial inmunogénico que además tuvieran residuos de N-acetilgalactosamina, así como sus respectivos pesos moleculares.

Mediante un ensayo citoquímico, se obtuvo un resultado cualitativo empleando la lectina biotilada (JAC), la cual proporcionó información comparativa sobre la distribución de los carbohidratos de superficie sobre los trofozoitos de *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. Aunque no se encontraron diferencias en cuanto a la cantidad de los carbohidratos de superficie (marcas), sí se encontraron en cuanto a la distribución puesto que se observó un efecto de aglutinamiento sobre *N. fowleri*, mientras que en *N. lovaniensis* no hubo éste efecto (Fig. 3). Probablemente este fenómeno se deba a que JAC esté reconociendo más sitios con residuos de carbohidratos en *N. fowleri* que en *N. lovaniensis*. Se sabe que las lectinas poseen por lo menos dos sitios de reconocimiento a carbohidratos lo que les confiere la capacidad de aglutinar células (Hernández-Cruz, *et. al*, 2005), además de que la jacalina tiene actividad aglutinante en eritrocitos humanos debido a su afinidad por los residuos terminales de N-acetilgalactosamina presentes en las inmunoglobulinas A y D y por su afinidad para D-galactosa (Moreira y Aïnouz, 1978).

Por otro lado, es posible que la aglutinación presente únicamente en *N. fowleri* se deba a la presencia de glicoproteínas evidenciadas en *N. fowleri* y ausentes en *N. lovaniensis* como es el caso de la gp de 20kDa. De igual forma cabe mencionar que existen otros factores que pueden intervenir en la aglutinación tales como el pH, la concentración de células, cantidad de agitación y la temperatura, pueden

variar su condición de aglutinación (Huet, 1975).

Cuando los trofozoitos fueron incubados solamente con estreptavidina peroxidasa (como control) no mostraron aglutinación y se observó una ligera marca en ambas especies (Fig. 3) esto puede deberse a que ambas presentan proteínas biotiniladas las cuales son reconocidas cuando solamente se usa estreptavidina (Carrasco-Yépez, *et al.*, 2013).

En cuanto al lectin blot, se demostró que jacalina se une a una diversa cantidad de glicoproteínas con pesos moleculares entre 100 y 20 kDa (Fig. 4A) varios de ellos con una fuerte reacción y puesto que el patrón de glicoproteínas fue muy similar en ambas especies, este podría indicar de manera indirecta que existen pocas diferencias en la estructura del sacárido entre las dos especies de *Naegleria* ya que cuando se compara el patrón de reconocimiento se observa que algunos glicoconjugados se expresan de la misma forma en ambas especies de *Naegleria*, mientras que otras (las de 30 y 20 kDa) sólo fueron reconocidos en *N. fowleri*.

Respecto a la densitometría de bandas correspondiente al lectin blot, se puede apreciar que hay una diferencia entre ambas especies. Aunque en el lectin blot se evidencian glicoproteínas del mismo peso tales como gp28, gp33, gp40, gp50, gp54, gp60 y gp75 (Fig. 4B) las bandas correspondientes a *N. fowleri* presentan valores más altos que los valores de *N. lovaniensis*, (Fig. 4B) esto podría deberse a que hay una mayor cantidad de N-acetilgalactosamina como carbohidrato específico para jacalina, en una amiba que en la otra. También pudiera atribuirse a que la conformación de N-acetilgalactosamina puede ser distinta en cada una de las especies debido al tipo y forma de unión con cada una, esto pudiera deberse a que jacalina tiene diversos sitios de unión con los antígenos lo cual a su vez pudiera estar funcionando como un factor de virulencia en el caso de *N. fowleri* (Arockia-Jeyaprakash *et al.*, 2002).

De igual forma es interesante resaltar que en el caso de la gp20 y gp30 expresadas únicamente en *N. fowleri* (Fig. 4A), se puede observar que presentan valores semicuantitativos entre 25000 y 30000 (unidades arbitrarias), lo cual pudiera indicar que la cantidad de N-acetilgalactosamina es alta. Estas

glicoproteínas pudieran intervenir como factores de virulencia, ya sea como factores que intervienen en la adhesión a epitelios, o bien para favorecer el reconocimiento de los macrófagos y las células dendríticas que tienen receptores para N-acetilgalactosamina, proponiéndose por estas razones como candidatos para vacunas o terapias anti adhesión (Montero-Barrera, *et al.*, 2015).

Es importante señalar que los receptores de lectina tipo C (CLRs) podrían intervenir en el reconocimiento de *Naegleria fowleri*, ya que estos receptores están involucrados en muchas funciones del sistema inmune y además pueden activar vías de señalización intracelular implicadas en la regulación de la inmunidad adaptativa por células dendríticas a patógenos (DC-SIGN) así como en el caso del receptor de manosa (MR) cuyo motivo de señalización C-terminal concebible mejora las propiedades endocíticas que promueven la captación de ligandos en la célula mediante la interacción receptor-ligando y en el caso de MGL al tratarse de un CRL endocítico podría favorecer el reconocimiento y por tanto la eliminación de los patógenos, como *Naegleria fowleri* (De Leur, 2014).

En cuanto a la identificación de proteínas con potencial inmunogénico de *Naegleria fowleri* así como la determinación de su peso molecular se demostró mediante Western blot que existen diferentes proteínas con potencial inmunogénico que fueron evidenciadas progresivamente en las tiras, las cuales se fueron intensificando conforme mayor era el número de inmunizaciones. Tal es el caso de la proteínas de 180, 140, 120, 90, 80, y 75 kDa para el blot de alto peso molecular (SDS-page 7%) (Fig. 5) de las cuales las de 180, 120 y 80 kDa tienen residuos de N-acetilgalactosamina (Fig. 5C), esto debido a que estas glicoproteínas también fueron evidenciadas en la tira incubada con jacalina (Lectin blot) (Fig. 5C). En el caso del blot de bajo peso molecular (SDS-page 14%) (Fig. 6) fueron identificadas proteínas inmunogénicas de 75, 37, 33, 30, 25, 20, 18, 16 y 13 kDa, la mayoría presentes en la tira correspondiente a la cuarta inmunización y de las cuales las de 75, 37, 33, 30, 20, 18, 16 y 13 están presentes en la tira correspondiente al lectin blot (Fig. 6C), lo que indica que estas glicoproteínas tienen residuos de N-acetilgalactosamina.

Según un estudio realizado por Rojas-Hernández *et al.* (2004), cuando se inmuniza a los ratones 4 veces a los 1, 7, 14, y 21 días por la ruta intranasal con extractos totales de *Naegleria fowleri* coadministrados con Cry1Ac o toxina de cólera y posteriormente los ratones son retados con trofozoitos vivos de *N. fowleri* se logra inducir un 100% de protección. Lo anterior se podría atribuir a que los sueros correspondientes al grupo de ratones inmunizados 4 veces con extracto total de *N. fowleri* más toxina de cólera, evidencien un mayor número de proteínas que además tienen residuos de N-acetilgalactosamina.

Es posible que las glicoproteínas que presentan residuos de N-acetilgalactosamina representen un importante factor en la adhesión a las células epiteliales del hospedero por lo que sería importante detectar si estas glicoproteínas tienen papel importante en la adhesión de *N. fowleri* y consecuente infección en un modelo *in vivo*, así como determinar si las glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina con potencial inmunogénico pueden mediar dicho proceso de adhesión, por lo que uno de los siguientes pasos en el desarrollo de este trabajo, sería la purificación de glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina identificadas en *N. fowleri*, lo cual permitirá desarrollar una caracterización bioquímica, inmunológica y probablemente también funcional de una forma más detallada de estas glicoproteínas. Esto es importante ya que el bloqueo o inhibición de estas glicoproteínas mediante el uso de lectinas como inhibidores de carbohidratos microbianos o sus análogos, podría ser una estrategia eficaz para la prevención y el tratamiento no sólo de la meningitis causada por *N. fowleri*, sino también para otras enfermedades infecciosas, debido a que como ya se mencionó, una gran variedad de microorganismos y toxinas se unen a los tejidos de los mamíferos mediante el reconocimiento de ligandos de glicoproteínas. Por lo tanto, las lectinas pueden ser utilizadas para bloquear la unión inicial de microbios y toxinas a las superficies celulares, y por lo tanto prevenir o suprimir la infección.

De igual forma, la identificación de glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina, en los trofozoitos de *N. fowleri* principalmente, sirve como base para poder realizar caracterizaciones adicionales de las glicoproteínas como factores de virulencia, tales como crear estrategias que permitan manipular la maquinaria de síntesis de las enzimas encargadas de la glicosilación para este tipo de azúcar en las glicoproteínas de interés.

9. CONCLUSIONES

Naegleria fowleri presenta glicoproteínas con residuos de N-acetilgalactosamina sobre su superficie.

Se determinaron ocho glicoproteínas reconocidas en ambas especies de *Naegleria* cuyos pesos moleculares fueron de 75, 60, 54, 50, 40, 37, 33 y 28 kDa.

Se estableció un patrón de comparación de reconocimiento de las glicoproteínas con una especie no patógena (*N. lovaniensis*) donde se evidenciaron glicoproteínas reconocidas solo en *N. fowleri* (30 y 20 kDa).

Se identificaron 17 diferentes glicoproteínas así como su peso molecular con residuos de N-acetilgalactosamina, de las cuales las de 180, 120, 80, 75, 37, 33, 30, 20, 18, 16 y 13 kDa tienen potencial inmunogénico por lo que podrían participar en la infección por *Naegleria fowleri*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Arockia-Jeyaprakash, A., Geetha-Rani, P., Banuprakash-Reddy, G., Banumathi, S., Betzel, C., Sekar, C., Surolia, A & Vijayan, M. 2002. Crystal Structure of the Jacalin–T-antigen Complex and a Comparative Study of Lectin–T-antigen Complexes. *J. Mol. Biol*, 321:637–645.
- Bergquist, C., E. L. Johanson, T. Lagergard, J. Holmgren, & A. Rudin. 1997. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun*, 65:2676-84.
- Bose, K., D. K. Gosh & A. Bhattacharya. 1989. Membrane carbohydrate characterization of *Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii* and *Naegleria fowleri* by fluorescein-conjugated lectins. *Int J Parasitol*, 19: 737-41.
- Carrasco-Yépez. M., R. Campos-Rodríguez, M. Godinez-Victoria, M. A. Rodríguez-Monroy, A. Jarillo-Luna, P. Bonilla-Lemus, A. Contis-Montes de Oca & S. Rojas-Hernández. 2013. *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of α -D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitol Res*, 112: 3615-3625.
- Cervantes-Sandoval, I., J. Serrano-Luna, J. Pacheco-Yépez, A. Silva-Olivares, V. Tsutsumi & M. Shibayama. 2010. Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitol Res*, 106:695-701.
- De Leur, K. 2014. C-type lectin receptors: pioneers in carbohydrate recognition on microbes. Tesis de maestría. Utrecht University.
- Den Dunnen J., S. I. Gringhuis. & T.B. Geijtenbeek. 2009. Innate signaling by C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. 26:605-610.
- Gagneux, P. & A. Varki. 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 9: 747-55.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. Van Vliet, G. C. Van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. Kewalramani, D.

- R. Littman, C. G. Figdor & Y. Van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 100: 587-97.
- González-Robles, A., G. Castanon, A. R. Cristobal-Ramos, V. I. Hernández-Ramírez, M. Omana-Molina & A. Martínez-Palomo. 2007. Cell surface differences of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* exposed with surface markers. *Exp Parasitol*, 117: 399-404.
- Geijtenbeek, T. B & Gringhuis, S. I. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9:465-479.
- 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.
- Helenius, A. & M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-9.
- Hernández-Cruz. P., E. Pérez-Campos, L. Martínez-Martínez, B. Ortiz & G. Martínez. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB*, 24 (1): 21-27.
- Hoving, J. C., G. J. Wilson & G.D. Brown. 2014. Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol*. 16(2): 185–194.
- Huet, M. 1975. Factors affecting the molecular structure and the agglutinating ability of concanavalin A and other lectins. *Eur J Biochem*, 59: 627-32.
- Kuper, C. F., P. J. Koornstra, D. M. Hameleers, J. Biewenga, B. J. Spit, A. M. Duijvestijn, P. J. Van Breda Vriesman & T. Sminia. 1992. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today*, 13: 219-24.
- Lee, M. R., S. Park, & I. Shin. 2012. Carbohydrate microarrays for enzymatic reactions and quantification of binding affinities for glycan-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 808, 103-16.
- Liu, J. Z., M. Pezeshki & M. Raffatellu. 2009. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine*, 48: 156-60.

- Madison, B., I. Ofek, S. Clegg & S. N. Abraham. 1994. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. *Infect Immun*, 62: 843-8.
- Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev*, 52, 114-33.
- Martínez, A. J. & G. S. Visvesvara. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*, 7: 583-98.
- Matin, A., R. Siddiqui, S. Y. Jung, K. S. Kim, M. Stins & N. A. Khan. 2007. *Balamuthia mandrillaris* interactions with human brain microvascular endothelial cells in vitro. *J Med Microbiol*, 56, 1110-5.
- Montero-Barrera, D., H. Valderrama-Carbajal, C. A. Terrazas, S. Rojas-Hernández, Y. Ledesma-Soto, L. Vera-Arias, M. Carrasco-Yépez, L. Gómez-García, D. Martínez-Saucedo, M. Becerra-Díaz, & L. I. Terrazas. 2015. The Macrophage Galactose-Type Lectin-1 (MGL1) Recognizes *Taenia crassiceps* Antigens, Triggers Intracellular Signaling, and Is Critical for Resistance to This Infection. *BioMed Research International*, 1-16.
- Moreira, R.A. & I.L. Aïnouz. 1981. Lectins from seeds of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*): isolation and purification of two isolectins from the albumin fractions. *Biol. Plant*, 23(3):186-192.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis & J. P. Kraehenbuhl. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*, 2, 1004-9.
- Nyame, A. K., Z. S. Kwar & R. D. Cummings. 2004. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Arch Biochem Biophys*, 426: 182-200.
- Ohland, C. L. & W. K. Macnaughton. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298: G807-19.
- Petri, W. A., Rashidul-Haque & B. J. Mann. 2002. The Bittersweet Interface of Parasite and Host: Lectin-Carbohydrate Interactions During Human Invasion by the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual Review of Microbiology*, 56: 39-64.

- Rocha-Azevedo, B., G. C. Menezes & F. C. Silva-Filho. 2006. The interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and human osteoblastic cells in vitro. *Microb Pathog*, 40: 8-14.
- Rojas-Hernández, S., M. A. Rodríguez-Monroy, R. López-Revilla, A. A. Reséndiz-Albor y L. Moreno-Fierros. 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun*, 72:4368-4375.
- Ruíz-Gutierrez, N. M. 2001. Las lectinas en las investigaciones del SIDA. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 32:15-18.
- Sharon, N. & H. Lis. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am*, 268: 82-9.
- Sharon, N. & H. Lis. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53R-62R.
- Schuster, F.L. & G. S. Visvesvara. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*, 34: 1001-27.
- Thomas, S., N. Thirumalapura, E. C. Crossley, N. Ismail & D. H. Walker. 2009. Antigenic protein modifications in Ehrlichia. *Parasite Immunol*, 31, 296-303.
- Toney, D. M. & F. Marciano-Cabral. 1992. Alterations in protein expression and complement resistance of pathogenic *Naegleria amoebae*. *Infect Immun*, 60: 2784-90.
- Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart & J. Marth. 1999. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 651.
- Yamasaki, S. 2016. C-type lectins receptors in immunity. Springer. Japan. 214.
- Zeng, X., C. A. Andrade, M. D. Oliveira, & X. L. Sun. 2012. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. *Anal Bioanal Chem*, 402, 3161-76.