



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
LICENCIATURA EN ENFERMERÍA



Laboratorio de Microbiología Ambiental

Proyecto de investigación CyMA

**Identificación parcial de la proteína Gliceraldehído – 3 – fosfato
deshidrogenasa (de la banda de 37 kDa) de *Naegleria fowleri* y su
posible implicación en la virulencia de la Meningoencefalitis
Amebiana Primaria.**

Tesis para obtener el título de:

Enfermero

Presenta:

Ramos de Dios Miguel Angel

Directora de Tesis:

Dra. Maricela Carrasco Yépez

Los Reyes Iztacala, Estado de México

Tlalnepantla, Edo. de Méx. 2021



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.

Índice

AGRADECIMIENTOS	4
1 Introducción	6
2 Marco teórico referencial	7
2.1 Meningitis por microorganismos	7
2.1.1 Metodologías y procedimientos para la vigilancia epidemiológica.....	7
2.1.2 Situación Epidemiológica.	8
2.2 Amibas de vida libre	10
2.3 <i>Naegleria fowleri</i> y Enfermedad.....	10
2.4 Proteínas asociadas a la virulencia de <i>N. fowleri</i>	11
2.5 GAPDH como factor de virulencia	13
2.6.1 Composición del ADN.....	15
2.6.2 Función del ADN.....	16
2.6.3 El ARN y sus funciones.....	16
3 Antecedentes generales	17
4 Antecedentes directos	24
5 Justificación del proyecto	26
6 Objetivos	27
6.1 Objetivo General:.....	27
6.2 Objetivos específicos:.....	27
7 Hipótesis.....	28
8 Materiales y Método	28
8.1 Diseño de los cebadores/primers del gen que codifica para la Gliceraldehído – 3 – Fosfato Deshidrogenasa.	28
8.2 Selección de los cebadores/primers	29
8.3 Diseño de los cebadores/primers.....	29
8.4 Síntesis de los Cebadores/Primers seleccionados.	29
8.5 Cultivo de las amibas	30
8.6 Cultivos de <i>Naegleria fowleri</i> , <i>Naegleria lovaniensis</i> y <i>Naegleria gruberi</i>	30
8.7 Extracción de ADN en las amibas <i>N. fowleri</i> , <i>N. lovaniensis</i> y <i>N. gruberi</i>	31
8.8 Extracción de ARN de las amibas <i>N. fowleri</i> , <i>N. lovaniensis</i> y <i>N. gruberi</i>	32
8.9 Amplificación del ADN de <i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i> y <i>N. lovaniensis</i> por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	33

8.10 Amplificación de ARN de <i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i> y <i>N. lovanienses</i> por Reacción en Cadena de Polimerasa con Retro Transcriptasa en un solo paso (RT/PCR)	34
8.11 Análisis de proteínas de <i>N. fowleri</i> , <i>N. lovaniensis</i> y <i>N. gruberi</i> por electroforesis unidimensional en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE 1D).....	35
8.12 Identificación de la banda de 37 kDa por espectrometría de masas	35
8.13 Inmunolocalización de la proteína GAPDH con microscopía confocal	36
8.14 Reto Intranasal con Trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	37
9 Resultados	38
9.1 Recolección de nucleótidos reportados del Gliceraldehído – 3 – Fosfato Deshidrogenasa y selección de secuencias para diseño de primers.	38
9.2 Diseño de primers a través del programa de la base de datos NCBI	40
9.3 identificación de proteínas de <i>N. fowleri</i> , <i>N. lovaniensis</i> y <i>N. gruberi</i> por Western Blot	52
9.4 Secuencia identificadas en nucleótidos por espectrometría de masas	54
9.5 Identificación de la proteína GAPDH en aminoácidos en <i>Naegleria fowleri</i> por masas.....	55
9.6 ARN de <i>N. fowleri</i> y producto de PCR.....	58
9.7 Inmunohistoquímica	59
9.8 Sobrevida de ratones.....	62
10. Discusión	64
11. Conclusión	68
11. Bibliografía	70
ANEXO I	74

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos de laboratorio les agradezco el haberme enseñado las técnicas necesarias para la realización de esta tesis, a mi muy querida maestra, tutora y mi guía en el laboratorio la doctora Maricela Carrasco Yépez por haberme enseñado el conocimiento acerca de la biología molecular, acercame más hacia la biología y la ciencia, agradezco la paciencia y dedicación de ella y sus alumnos ahora compañeros míos que me han compartido conocimiento, su tiempo, y su sabiduría en esta área de la salud que es la investigación.

Agradezco a mi madre que sin su ayuda y apoyo a lo largo de mi vida yo no estaría donde estoy, agradezco el hecho que ella no se haya rendido para darme una educación y espero se sienta orgullosa del logro obtenido después de tantos años de sacrificios, agradezco a mi hermana por ser la única persona durante mucho tiempo con la que conté, ser mi amiga y confidente en muchos momentos de mi vida, gracias por estar en momentos cruciales de mi vida a mi familia cercana y a la lejana también le agradezco, a mi abuelo Benito de Dios Virgen por enseñarme de mucho y ser una figura paterna para mi en toda mi vida, a mi abuela Reina por apoyarme en el estudio.

Quiero agradecer puntualmente a algunos mis compañeros de laboratorio como Betsa por ser alguien que me enseñó en el laboratorio, por ser alguien con paciencia y dedicación al momento de explicarme conceptos y técnicas y por ser una amiga adentro del área de laboratorio. Quiero agradecer también a uno de mis mejores amigos Diego Rojas por tener la dedicación de enseñarme en seminarios, de explicarme el uso de equipos y manejo de animales, cuidados y tratos, enseñarme a escribir y redactar, sin él esta tesis no sería como es, aunque les he aprendido mucho a ustedes sé que me falta, sé que aun puedo mejorar y no lo haría sin sus consejos y guía.

Quiero dar también un gran agradecimiento a todas las personas que aun no he mencionado, pero estuvieron e influyeron en mi crecimiento académico, a todos mis compañeros del laboratorio del doctor Saul Rojas, mis amigos Roberto, Omar, Diego, Sebastián, José Luis, Gabriela, Mara, Itzel, Alfredo y el mismo doctor Saul, Gracias por brindarme su apoyo, su conocimiento y su laboratorio para aprender.

También quiero agradecer a mi mejor amigo, Daniel Díaz que me acompañó a lo largo de toda mi carrera, gracias amigo por ser un apoyo moral, por ser como eres y por seguir con esta amistad, aun me falta mencionar a mis grandes amigos en la universidad, Edwin, Karina y Carlos, gracias por apoyarme muchísimo en la licenciatura, gracias por ser tan buenas personas, cada uno de ustedes contribuyó de una forma inexplicable a mi crecimiento como persona que la verdad no tengo palabras para explicarlo ni para llegar a agradecerlo.

Gracias a todos por formar parte de mi vida, por ser grandes personas y enseñarme a lo largo de la licenciatura, gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por ofrecerme el espacio para aprender y formarme profesionalmente, por brindarme a su vez la oportunidad de hacer amigos y al mismo tiempo ofrecerme un lugar como la UIICSE para poder realizar investigación, gracias a todo el equipo de trabajo del área de investigación de la UIICSE y al laboratorio de la Escuela Superior de Medicina en el área de Inmunología por abrirme las puertas y ayudarme a realizar esta investigación.

1 Introducción

Durante los últimos 10 años ha habido un incremento en las enfermedades infecciosas alrededor del mundo, esto puede ser una respuesta al crecimiento de la población mundial, el aumento del hambre y pobreza entre otros factores. Uno de los grupos de microorganismos que ha demostrado tener importancia en la salud pública son las amibas de vida de libre (AVL) (1).

Las amibas de vida libre son protozoos que se desarrollan en el ambiente, agua, suelo y aire (2). Se ha establecido que las amibas de vida libre además de vivir en el ambiente, producen en el hombre enfermedades de curso diverso; desde cuadros agudos y fatales con componentes de predominio necrótico a enfermedades crónicas con reacción inflamatoria granulomatosa. Las características de las enfermedades humanas producidas por estas amibas sólo han sido reconocidas durante los últimos 30 años ya que, por ejemplo, el número de humanos infectados por amibas de vida libre es bajo en comparación con el número de pacientes afectados por *Entamoeba histolytica* (2, 3).

Es importante decir que las amibas de vida libre son capaces de vivir de dos formas: como parásitos y como organismos de vida libre, a raíz de esto se denominan amibas anfizoicas.

Las especies de AVL patógenas son; *Naegleria fowleri*, que produce Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP), *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y varias especies del género *Acanthamoeba* spp. causan Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG). *Acanthamoeba* puede provocar infecciones severas en pulmón, oídos, nariz y queratitis amebiana (QA) en ojos y *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* pueden causar Amibiasis cutánea. Ciertas amibas también pueden actuar como vectores de ciertas bacterias como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, *Vibrio* spp., etc. Algunas son consideradas patógenos oportunistas porque pueden producir enfermedades en individuos inmuno - comprometidos (4).

En la medida que estos agentes son conocidos y sus cuadros clínicos y anatomo-patológicos sean familiares, se tienen mayores posibilidades de diagnosticar y eventualmente tratar las infecciones por amibas de vida libre.

En 1958, Culbertson demostró el potencial patógeno de *Acanthamoeba* spp., y en 1965 Fowler y Carter reportaron el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) causado por *Naegleria fowleri* en Australia; posteriormente, en la República Checa se identificó, de manera retrospectiva, un brote de 16 casos de MAP adquirida en una alberca calentada artificialmente.

2 Marco teórico referencial

2.1 Meningitis por microorganismos

Entre los padecimientos más graves y dañinos por su importancia epidemiológica y sus consecuencias están la meningitis y la encefalitis, que conllevan invalidez e incluso la muerte. La periodicidad de notificación a partir de la detección de los casos de meningoencefalitis amebiana primaria se describe en la tabla 1.

Padecimiento	Clave CIE	Periodicidad de Notificación		
		Inmediata	Diaria	Semanal
Meningoencefalitis Amebiana primaria	B60.2	x		x

Tabla 1. Periodicidad de la notificación de casos de Meningoencefalitis Amebiana Primaria.

2.1.1 Metodologías y procedimientos para la vigilancia epidemiológica.

La vigilancia epidemiológica de meningoencefalitis amebiana primaria se llevará a cabo en todas las unidades de salud, públicas o privadas (hospitales, centros de salud, clínicas, etc.), a las que acuda la población general a demandar atención médica por esta enfermedad y en áreas identificadas como de riesgo o donde se confirme la circulación de las AVL ya referidas como patógenas; la vigilancia será permanente, y se intensificará en los meses de mayor temperatura ambiental (verano) (Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica)

Las metodologías y procedimientos para la vigilancia epidemiológica de meningoencefalitis amebiana primaria se describen en la tabla 2.

Padecimiento	Clave CIE	Metodologías y Procedimientos para la Vigilancia Epidemiológica.			
		Vigilancia convencional	Estudio de Brote	Vigilancia basada en laboratorio	Vigilancia activa de la mortalidad
Meningoencefalitis amebiana primaria	B60.2	x	x	x	x

Tabla 2. Metodologías y Procedimientos para la Vigilancia Epidemiológica.

Definiciones operacionales para la epidemiología.

Caso probable. Toda persona con sintomatología de infección del sistema nervioso, que mediante estudio de líquido cefalorraquídeo muestre datos de infección bacteriana, y en la cual no se haya hecho un diagnóstico etiológico.

Caso confirmado. Toda persona con cuadro clínico compatible con infección de sistema nervioso, y en la cual se identifiquen AVL con pruebas de laboratorio (observación directa de LCR, además de la tipificación de la especie de AVL).

Brote. Es la presencia de dos o más casos confirmados, asociados entre sí, en tiempo, lugar y personas, o con una posible fuente de infección común.

Defunción. Todo certificado de defunción donde aparezca como causa básica o asociada el diagnóstico de meningitis por meningoencefalitis amebiana primaria, encefalitis amebiana granulomatosa, meningitis por AVL, meningitis por *Naegleria fowleri* o *Acanthamoeba*. (Manual de Procedimiento Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amebiana Primaria)

2.1.2 Situación Epidemiológica.

Como antecedente en nuestro país se han reportado alrededor de 10 casos de meningoencefalitis amebiana primaria tomando en cuenta diversos estudios científicos rigurosos desde 1984 a 2007 (3) el primero fue un adolescente residente de Mexicali, B. C., que en 1978 falleció por un cuadro

súbito de meningitis, el antecedente es que nadaba en agua de canales de riego y había sufrido un traumatismo nasal; el diagnóstico de meningoencefalitis se realizó postmortem con estudios histopatológicos (5).

Posteriormente se reportó el caso de un adolescente en Huetamo, Michoacán, que trabajaba en un estanque de peces y murió por un cuadro súbito de meningitis. El último fue de una niña residente de Monterrey, N. L., a quien se le administró el tratamiento correspondiente y que es la única que sobrevivió a la enfermedad en nuestro país (6).

En 1990 se confirmó el primer brote (5 casos) de meningoencefalitis amebiana primaria, donde se aisló *Naegleria fowleri* de los pacientes y en un canal de riego, en Mexicali, B. C (7). A nivel mundial se desconoce la incidencia y prevalencia de la enfermedad, pero se calcula que el riesgo de enfermar por Meningitis Amebiana Primaria (MAP) es de un caso por cada 2.5 millones de exposiciones a agua contaminada en los meses en que la temperatura ambiental aumenta; también se sabe que es más frecuente en hombres que en mujeres.

En México la tendencia durante el año 2000 a 2009 presentó variaciones, de tal forma que en el año 2002 se notificaron seis casos, en el 2003, tres casos y en 2004 dos, aumentando a seis casos en el 2005 y disminuir en los siguientes años. En el 2009 se presentó un caso con una tasa de incidencia de 0.001 por 100 000 habitantes, notificado por el estado de Baja California, de sexo masculino en el grupo de edad de 20 a 24 años (7).

Las enfermedades producidas por amibas de vida libre sólo se reconocen, aparentemente, a partir de 1948, cuando se comunicó el caso de un soldado japonés de 22 años, que fuera capturado como prisionero de guerra en enero de 1943, cerca de Buna, Nueva Guinea, y que falleció siete días después (8).

En base a los casos descritos, a la enfermedad se le denominó como meningoencefalitis amebiana primaria, término que fue acuñado por Cecyl G. Butt (9).

Desde entonces y hasta 1997 se habían reportado 81 casos sólo en Estados Unidos y para 2002 un total aproximado de 200 casos de MAP en el mundo. Se han notificado alrededor de 300 casos en total en 50 años desde que se reportó el primer caso en 1965 (10).

La meningitis se agrupa en las causadas por agentes de tipo viral, bacteriano, micótico, y en algunos casos por protozoarios como *N. fowleri*, causante de MAP que produce problemas oculares, cutáneos y del sistema nervioso central.

2.2 Amibas de vida libre

Las Amibas de Vida Libre (AVL) son protozoarios del orden Amoebida; se han encontrado en una gran diversidad de hábitats: atmósfera, agua (albercas, lagos, ríos y cuerpos de agua en zonas cálidas). Estas amibas llaman la atención por su capacidad de causar enfermedad, e incluso la muerte, en el hombre y los animales. Por mucho tiempo las AVL fueron consideradas protozoarios sin importancia para la comunidad médica, hasta que algunas especies de *Naegleria* y *Acanthamoeba* causaron meningoencefalitis aguda y crónica en el hombre (11).

2.3 *Naegleria fowleri* y Enfermedad

Naegleria fowleri es un ameboflagelado termófilo, que tolera temperaturas de 40°C - 45°C y se ha aislado del sistema nervioso central humano y tiene tres estados en su ciclo de vida: trofozoíto, quiste y temporalmente flagelado (12).

Los individuos infectados con esta amiba tienen como antecedente el haber tenido contacto con cuerpos de agua en días recientes, especialmente de piscinas o aguas termales. *N. fowleri* parasita a individuos aparentemente saludables, niños y jóvenes en su mayoría por las actividades recreativas que esto practican y es la causante de muertes por MAP, que se caracteriza por su rápida evolución (12).

La ruta de entrada de *N. fowleri* es la cavidad nasal, mediante inhalación de polvo o aspiración de agua o aerosoles contaminados con trofozoítos o quistes, los cuales pasan al Sistema Nervioso Central (SNC) por el neuroepitelio olfatorio; en virtud de la lesión primaria que se produce en el mismo, los síntomas respiratorios pueden ser resultado de hipersensibilidad o infección subclínica. El periodo de incubación es de 2 o 3 y hasta 7 o 15 días, dependiendo del inóculo y de la virulencia de la cepa (13).

El cuadro clínico tiene un inicio súbito, con curso rápido y fulminante, caracterizado por cefalea frontal, bitemporal intensa, fiebre (de 38.2°C a más de 40°C), náusea, vómito (proyectil), y signos de irritación meníngea: rigidez de nuca (14), encefalitis, fotofobia, edema cerebral, convulsiones, hipertensión intracraneal, progreso rápido a letargia, confusión y coma. La gran mayoría de los casos muere aproximadamente a las 48 o 72 horas (o hasta una semana después) del inicio del cuadro, principalmente por paro cardiorrespiratorio y edema pulmonar.

2.4 Proteínas asociadas a la virulencia de *N. fowleri*

A pesar de las extensas investigaciones realizadas durante las últimas décadas, aún se desconocen los mecanismos que explican la naturaleza progresiva y destructiva de la MAP.

La secuencia del genoma de 30 Mb de *N. fowleri*, incluidos los datos de secuenciación de ARN, se presentaron por primera vez. Sobre la base de estos datos, se identificaron 22 nuevos factores potenciales de patogenicidad en la ameba utilizando enfoques proteómicos. Además, se descubrió que 21 proteínas estaban reguladas hacia abajo en trofozoítos altamente patógenos. La mayor parte de este último grupo de proteínas se componía de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, así como vías de biosíntesis de proteínas. Debido a que sobreviven a expensas de su huésped, los trofozoítos altamente patógenos de *N. fowleri* pueden requerir un repertorio de genes más pequeño porque pueden beneficiarse de las células del huésped. Por el contrario, trofozoítos poco patógenos suelen ser vida libre y por lo tanto debe poseer todos los genes necesarios para los procesos metabólicos esenciales, lo que probablemente explica las diferencias en el metabolismo de los altamente y poco patógenos de *N. fowleri* (15).

Utilizando enfoques genómicos, transcriptómicos y proteómicos, los autores de este trabajo identificaron 22 proteínas que potencialmente actúan como factores de patogenicidad en la ameba *N. fowleri* (15). En la membrana se identificó como un lugar clave donde pueden producirse procesos patogénicos en la patogénesis de la MAP (15). La anotación funcional de estas proteínas reveló que la membrana es el lugar principal donde la ameba ejerce su potencial patógeno, posiblemente involucrando procesos dependientes de actina, como el tráfico intracelular a través

de vesículas. En un primer paso, el ADN se secuenció con la plataforma Illumina HiSeq 2000, lo que dio como resultado aproximadamente 116 millones de lecturas de 100 pb (Pares de bases) en extremos pareados con un tamaño de inserción de 300 pb. El ensamblaje de novo de estas lecturas cortas de 100 pb se facilitó mediante la secuenciación de la red troncal 454, proporcionando aproximadamente 350,000 lecturas únicas con una longitud promedio de 378 pb. Finalmente, el ensamblaje se mejoró con información de una biblioteca de pares compuesta por aproximadamente 400 millones de lecturas de Illumina con un tamaño de inserción de 3 kb. En total, más de 500 millones de lecturas fueron de novo ensambladas en 1.124 andamios con una cobertura promedio de 770x y un N50 de 136,406. El genoma nuclear de *N. fowleri* tiene un tamaño de 29,619,856 pb y es rico en AT (Adenina – Timina), con un contenido de GC de solo 35.4%. El cálculo del tamaño del genoma a través de citometría de flujo indicó que el genoma de *N. fowleri* es de aproximadamente 66 Mb. Basado en el tamaño de 29, 619 y 856 pb del genoma de novo ensamblado, el genoma de *N. fowleri* se considera diploide (16). Y estos procesos muy probablemente involucran mecanismos de tráfico vesicular dependientes de actina.

En el presente trabajo, se plantea que el estudio de esta proteína será la base para nuestra futura aplicación en métodos genéticos con estos microorganismos para demostrar el papel de las proteínas identificadas como candidatas a tener papel virulento en la patogénesis de la MAP. En este trabajo, aunque hubo proteínas del metabolismo asociadas a la patogenicidad de la amiba, no se encontró alguna que correspondiera a la enzima de Gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Sin embargo, cuando se compara con una especie muy similar pero no patógena, *N. gruberi*, sí se encuentra la enzima GAPDH dejando ver que variaciones muy sutiles entre las especies pueden conferir diferencia en la utilización de las proteínas constitutivas llevando a cabo un papel importante en la patogenicidad en una de estas dos especies de *Naegleria*.

2.5 GAPDH como factor de virulencia

La enzima GAPDH es una enzima implicada en una de las actividades catalíticas más importante de la glucólisis (10), ruta de Embden – Meyerhof, puesto que cataliza un paso en el cual se genera el primer intermediario de elevada energía, y, además, genera un par de equivalentes de reducción (en forma de NADH). La reacción global es:

$$\Delta G^0 = 6.3 \frac{kJ}{mol}$$

D – gliceraldehído – 3 – fosfato + NAD⁺ + Pi < --- > 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H⁺

Químicamente, la reacción implica la oxidación del carbonilo del gliceraldehído – 3 – fosfato hasta un carboxilo, lo que es exergónico en condiciones estándar; en la reacción *in vivo*, en la que se aprovecha esta energía para generar un compuesto de alta energía, en cambio, la reacción es ligeramente endergónica, pues parte de esta energía queda almacenada en un grupo acil – fosfato, o anhídrido de ácido carboxílico-fosfórico, que posee una energía libre estándar de hidrólisis de $\Delta G^0 = -49,4$ kJ/mol. Además, la enzima requiere la coenzima NAD⁺ a fin de rescatar los electrones producto de la oxidación del sustrato.

Por otro lado, a la GAPDH también se le han atribuido otras propiedades independientemente a su actividad enzimática tal es el caso de adhesina para algunos microorganismos patógenos los cuales se unen a través de la GAPDH a fibronectina, lisozima y proteínas de citoesqueleto (14). Estos antecedentes indican que la GAPDH tiene un papel importante en la colonización de estos microorganismos al huésped. En algunos hongos, bacterias e incluso parásitos, se le han encontrado propiedades inmunogénicas e inmunoprotectora (16).

Algunas de las estrategias utilizadas por los microorganismos se indican en la Fig. 1. En cada uno de estos mecanismos, la GAPDH patógena es la molécula que interactúa. Por ejemplo, en el mecanismo definido como "adhesión", la GAPDH derivada de microbios, que está localizada en la superficie, puede acoplarse a los tejidos del hospedador mediante la unión simultánea a la superficie del patógeno y una de las moléculas del hospedador ilustradas (a saber, actina, miosina, laminina, mucina y fibronectina). La figura no representa un esquema exhaustivo, sino que sirve como punto de partida para comenzar el proceso de desentrañar los mecanismos más generales de los mecanismos altamente variables o especializados que se han informado y que seguramente seguirán informándose como el interés en este campo se expande.

Fig. 1

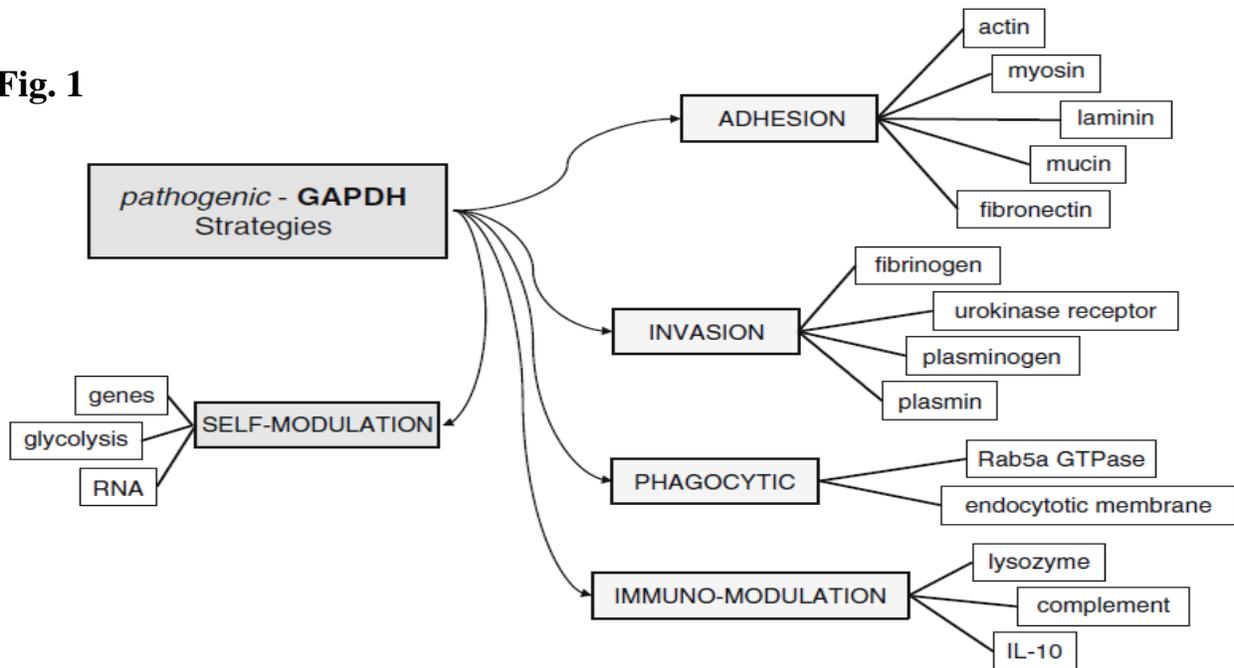


Fig. 1 Mecanismos patogénicos que involucran a la GAPDH como factor de virulencia. Se propone que estas estrategias fueron seleccionadas para la supervivencia del microorganismo. Se ilustran las proteínas de unión de la GAPDH.

2.6. ADN como herramienta de estudio

El ADN o ácido desoxirribonucleico contiene las instrucciones biológicas que hacen de cada especie algo único. El ADN, son las instrucciones que se pasan de los organismos adultos a sus descendientes durante la reproducción.

En los organismos llamados eucariotas, el ADN se encuentra dentro de un área compartimentalizada dentro de la célula llamada núcleo. Debido a que la célula es muy pequeña, y porque los organismos tienen muchas moléculas de ADN por célula, cada molécula de ADN debe estar empaquetada de forma muy compacta y precisa. Esta forma súper-empaquetada del ADN se denomina cromosoma.

Durante la replicación del ADN, el ADN se desenrolla para que pueda ser copiado. En otros puntos del ciclo celular, secciones puntuales del ADN también se desenrollan cuando es necesario para que distintos juegos de instrucciones se usen en la fabricación de proteínas y para otros procesos biológicos. Pero, durante la división celular, el ADN se encuentra en su forma compacta de cromosoma para hacer posible la transferencia a nuevas células.

Los investigadores llaman ADN nuclear al ADN encontrado en el núcleo de la célula. El conjunto completo de ADN nuclear de un organismo se conoce como su genoma.

Además del ADN ubicado en el núcleo, los seres humanos y otros organismos complejos también tienen una pequeña cantidad de ADN en otras estructuras celulares adicionales conocidas como mitocondria. Las mitocondrias son las factorías de las células, generando la energía que la célula necesita para funcionar correctamente.

2.6.1 Composición del ADN

El ADN está formado por unos componentes químicos básicos denominados nucleótidos. Estos componentes básicos incluyen un grupo fosfato, un grupo de azúcar y una de cuatro tipos de bases nitrogenadas alternativas. Para formar una hebra de ADN, los nucleótidos se unen formando cadenas, alternando con los grupos de fosfato y azúcar.

Los cuatro tipos de bases nitrogenadas encontradas en los nucleótidos son: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). El orden, o secuencia, de estas bases determina qué instrucciones biológicas están contenidas en una hebra de ADN. Por ejemplo, la secuencia ATCGTT pudiera dar instrucciones para ojos azules, mientras que ATCGCT pudiera indicar ojos de color café.

2.6.2 Función del ADN

El ADN contiene las instrucciones que un organismo necesita para desarrollarse, sobrevivir y reproducirse. Para realizar estas funciones, las secuencias de ADN deben ser transcritas a mensajes que puedan traducirse para la fabricación de proteínas, que son las moléculas complejas que hacen la mayor parte del trabajo en nuestro cuerpo.

Una secuencia discreta de ADN que contiene las instrucciones para elaborar una proteína se conoce como gen. El tamaño de un gen puede variar enormemente, desde aproximadamente 1,000 bases hasta 1 millón de bases en los seres humanos. Los genes sólo forman aproximadamente el 1 por ciento de la secuencia de ADN. Otras secuencias reguladoras de ADN dictan cuándo, cómo y en qué cantidad se elabora cada proteína. La mayoría de las secuencias del genoma humano y de otros organismos vertebrados y no vertebrados, no tienen una función conocida.

2.6.3 El ARN y sus funciones

El ácido ribonucleico (ARN) es una molécula similar a la de ADN. A diferencia del ADN, el ARN es de cadena sencilla. Una hebra de ARN tiene un eje constituido por un azúcar (ribosa) y grupos de fosfato de forma alterna. Unidos a cada azúcar se encuentra una de las cuatro bases que la constituyen como adenina (A), uracilo (U), citosina (C) o guanina (G). Hay diferentes tipos de ARN en la célula: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt) entre otros. Más recientemente, se han encontrado algunos ARN de pequeño tamaño que

están involucrados en la regulación de la expresión génica y en el funcionamiento de enzimas y proteínas de la célula (17).

La célula utiliza el ARN para una serie de tareas diferentes; una de estas moléculas se llama ARN mensajero o ARNm. Y es la molécula de ácido nucleico cuya traducción transfiere información del genoma a las proteínas. Otra forma de ARN es el ARNt o ARN de transferencia, y moléculas de ARN no-codificantes de proteínas que físicamente llevan los aminoácidos al sitio dónde se lleva a cabo la traducción y permiten que sean ensamblados en las cadenas de proteínas en dicho proceso (17).

De tal manera que el conocimiento de los genes que codifican para proteínas virulentas de *N. fowleri* (a través de los ARNm) es necesario para proporcionar una visión de los mecanismos patogénicos de la ameba como base para el desarrollo de terapias más eficaces, así como herramientas de diagnóstico más rápidas.

3 Antecedentes generales

A lo largo de la historia diferentes científicos y autores dedicados a la inmunología han tenido como propósito en común el investigar los mecanismos por los cuales los microorganismos son capaces de evadir el sistema inmune e invadir al hospedero. Uno ejemplo de estos estudios es el realizado por Sung-Jae Cha *et al* en 2016 donde establecieron que la transmisión de la malaria comienza cuando el mosquito *Anopheles* infectado con *Plasmodium* administra esporozoítos de la amiba en la piel del hospedero. Posteriormente, el esporozoíto entra en la circulación e infecta el hígado al atravesar las células de Kupffer mediante la unión de GAPDH expresada en *Plasmodium* y el receptor CD68 presente en la superficie. En este trabajo mediante la selección de una biblioteca de presentación en macrófagos, diseñaron con base en la proteína de GAPDH un péptido designado como P39 que se une al CD68 en la superficie de las células de Kupffer y bloquea el desplazamiento del esporozoíto. En este estudio, mostraron que el péptido P39 es estructuralmente similar a la GAPDH en la superficie del esporozoíto y que GAPDH interactúa directamente con el CD68 en la superficie celular de Kupffer. Es importante destacar que un anticuerpo anti-P39

inhibió significativamente la invasión hepática del esporozoíto sin reaccionar de forma cruzada con GAPDH de mamíferos. Por lo tanto, los epítomos de GAPDH específicos de *Plasmodium* pueden proporcionar nuevos antígenos para el desarrollo de una vacuna pre – hepática (18).

Por otra parte, en otro estudio donde se midió la respuesta ante *S. mansoni* en individuos de áreas endémicas del trematodo, se reveló que las respuestas inmunológicas de estos individuos identifican antígenos inmunogénicos (Sm37-GAPDH y Sm10-DLC) con propiedades candidatas a vacunas. El análisis de los epítomos de estos inmunógenos indicó que: (I) Sm37-5 es un epítomo que es reconocido por células B principalmente de Sm37-GAPDH y la reactividad del anticuerpo IgG hacia este péptido está asociada con la resistencia a las constantes infecciones; (II) Sm10-T es un epítomo de células T del inmunógeno principal Sm10-DLC reconocido por las células T. Esto llevó a probar un múltiple péptido antigénico que contiene Sm37-5 y Sm10-T como una vacuna anti – esquistosoma. Este múltiple péptido antigénico indujo una respuesta inmune protectora significativa en ratones cuando se les inyectó con adyuvante de Freund o se coadsorbió con GM ± CSF en hidróxido de aluminio.

En este último caso, el enlace físico entre las citocinas y el antígeno a través de la coadsorción sobre el hidróxido de aluminio fue necesaria para obtener una respuesta protectora. Los resultados de la respuesta de anticuerpos indicaron que cuando el múltiple péptido antigénico y GM ± CSF se coadsorbieron en aluminio, la respuesta de anticuerpos contra el epítomo Sm10-T ubicado en la posición NH₂-terminal se amplificó significativamente hasta un 30% de los anticuerpos en respuesta de Sm37-5 (19).

En otra investigación fue reportado el aislamiento de un péptido del fragmento hGAPDH (18-19) del tejido placentario humano que muestra actividad antimicrobiana. El péptido fue internalizado por células de la levadura patógena *Cándida albicans* e inició un rápido mecanismo apoptótico, lo que condujo a la muerte del hongo. La muerte fue dependiente de la dosis, con 10 µg / ml (3.1 µM) y 100 µg / ml de hGAPDH (18-19) despolarizando el 45% y el 90% de las células fúngicas en una población, respectivamente. La infección experimental por *C. albicans* indujo la expresión de hGAPDH (18-19) epitelial. La adición del péptido redujo significativamente el daño tisular en comparación con la infección experimental no tratada. La actividad de proteinasas aspárticas secretadas (Saps) de *C. albicans* fue inhibida por el fragmento a concentraciones más altas con un ED₅₀ de 160 mg / l (50 µM) para Sap1p y 200 mg / l (63 µM) para Sap2p mientras que Sap3 no

se inhibió en todas. Curiosamente, hGAPDH (14-19) indujo una secreción epitelial significativa de IL-8 y GM-CSF y estimuló la expresión de TLR4 en bajas concentraciones independientemente de la presencia de *C. albicans* sin ningún efecto tóxico en la mucosa (20).

En otra investigación realizada por Vijaykumar Pancholi y Vicent A. en 1992 descubrieron que la superficie de los *estreptococos* presenta una serie de proteínas diferentes, cada una diseñada para realizar una función específica. En un intento por comprender los eventos tempranos en la infección por *estreptococos* del grupo A, fue identificada y purificada una proteína de superficie primordial del *estreptococo* del grupo A tipo 6 que tiene una actividad enzimática y una capacidad de unión para una variedad de proteínas. El análisis espectrométrico de masas de la molécula purificada reveló un monómero de 35.8 kDa. La cromatografía de tamiz molecular y la electroforesis con dodecil sulfato de sodio (SDS) sugirieron que la formación nativa de la proteína es probablemente un tetrámero de 156 kDa. El análisis de la secuencia de aminoácidos del amino terminal reveló un 83% de homología con los primeros 18 residuos y aproximadamente el 56% en los primeros 39 residuos con GAPDH de origen eucariótico o bacteriano respectivamente. Esta GAPDH de superficie estreptocócica (SDH por sus siglas en inglés) muestra una actividad de deshidrogenasa dependiente de la dosis en gliceraldehído – 3 – fosfato en presencia de dinucleótido adenina β – nicotinamida, tanto en su forma pura como en la superficie estreptocócica. Su sensibilidad a la tripsina en todo el organismo y su incapacidad para eliminarse con 2 M de NaCl o SDS al 2% respalda su ubicación en la superficie y la unión firme a la célula estreptocócica (17).

Los anticuerpos purificados por afinidad para SDH detectaron la presencia de esta proteína en la superficie de todos los serotipos M del *estreptococo* del grupo A analizados. Se encontró que la SDH purificada se unía a la fibronectina, a la lisozima, así como a las proteínas citoesqueléticas, la miosina y la actina. También se reportó que la actividad de unión a la miosina se localizaba en el dominio globular de meromiosina pesada. SDH no se unió a la proteína M estreptocócica, ni a la tropomiosina, ni al dominio de la bobina en espiral de la miosina. La capacidad de enlace múltiple de la SDH junto con la actividad de GAPDH puede desempeñar un papel en la colonización, la internalización y la proliferación subsecuente de *estreptococos* del grupo A (21).

La deshidrogenasa de superficie estreptocócica (SDH por sus siglas en inglés) es un complejo multifuncional sin anclaje proteico presente en la superficie del grupo A *Streptococcus* (GAS por sus siglas en inglés). Desempeña un papel regulador en los eventos de señalización intracelular mediados por GAS en células faríngeas humanas. Usando ensayos de unión al ligando, se identificó una proteína con peso molecular de 55 kDa como una proteína receptora específica de SDH en la superficie de las células faríngeas humanas de Detroit. Los análisis por LC-MS / MS identificaron esta proteína ligada a la membrana expuesta a la superficie de las células faríngeas SDH como uPAR (Receptor Activador del Plasminógeno Uroquinasa) / CD87. Los ensayos de unión de ligandos también revelaron que solo el dominio N – terminal (D1) de uPAR unido a SDH. uPAR-D1 se unió más específicamente a la hélice alfa C – terminal y dos regiones flanqueantes inmediatas del bucle S de la molécula SDH. La mutagénesis dirigida al sitio en GAS dio como resultado SDH con extremos C-terminales alterados, y la eliminación de uPAR de las células faríngeas por el tratamiento con fosfatidilinositol – fosfolipasa C disminuyó la capacidad de GAS para adherirse a las células faríngeas. Cuando se compararon con células faríngeas de Detroit no infectadas, las células faríngeas infectadas con GAS mostraron un aumento transitorio pero significativo en la expresión de ARNm específico de uPAR, y un proceso de reciclaje prolongado de uPAR en la superficie celular. En conjunto, estos resultados indican que la interacción de la proteína de la superficie estreptocócica y el receptor de la célula faríngea mediada por SDH y uPAR se modula durante la infección por GAS de las células faríngeas humanas. Esta interacción contribuye significativamente a la adherencia bacteriana y, por lo tanto, puede desempeñar un papel importante en la patogénesis del GAS al regular los eventos de señalización intracelular en las células faríngeas (22).

El hongo patógeno *Paracoccidioides brasiliensis* causa paracoccidioidomicosis, una micosis pulmonar adquirida por inhalación de propágulos en el aire por hongos, que pueden diseminarse a varios órganos y tejidos, lo que lleva a una forma grave de la enfermedad. La adhesión y la invasión de las células huésped son pasos esenciales involucrados en la infección y diseminación de patógenos. Además, los patógenos utilizan sus moléculas de superficie para unirse a los componentes de la matriz extracelular del huésped para establecer la infección. Se informó acerca de la caracterización de la GAPDH de *P. brasiliensis* como una adhesina, que puede estar relacionada con la adhesión e invasión de hongos. La GAPDH de *P. brasiliensis* se sobre expresó

en *Escherichia coli* y se obtuvo un anticuerpo policlonal contra esta proteína. Mediante microscopía inmunoelectrónica y análisis de Western blot, se detectó GAPDH en el citoplasma y la pared celular en la fase de levadura de *P. brasiliensis*. Se encontró que la GAPDH recombinante se unía a la fibronectina, la laminina y el colágeno de tipo I en los análisis de transferencia Western blot del ligando. Es de especial interés el tratamiento de las células de levadura de *P. brasiliensis* con anticuerpo policlonal anti-GAPDH y la incubación de neumocitos con la proteína recombinante que promueven la inhibición de la adherencia y la internalización de *P. brasiliensis* a aquellas células cultivadas *in vitro*. Estas observaciones indican que la forma de la proteína asociada a la pared celular de GAPDH en *P. brasiliensis* podría estar involucrada en la mediación de la unión de las células fúngicas a la fibronectina, el colágeno tipo I y la laminina, contribuyendo así a la adhesión del microorganismo a los tejidos del huésped y a la diseminación de la infección (23).

Como ya se ha mencionado la GAPDH son enzimas glucolíticas citoplásmicas que, aunque carecen de señales de secreción identificables, también se han localizado en la superficie de varias bacterias (y algunos organismos eucarióticos); donde en algunos casos se ha demostrado que contribuyen a la colonización e invasión de los tejidos del huésped. *Neisseria meningitidis* es un comensal nasofaríngeo humano obligado que puede causar infecciones potencialmente mortales, como septicemia y meningitis. *N. meningitidis* tiene dos genes, gapA-1 y gapA-2, que codifican las enzimas GAPDH. GapA-1 se ha demostrado anteriormente que está regulado por incremento en el contacto bacteriano con las células epiteliales del huésped y es accesible a los anticuerpos en la superficie de las células meningocócicas permeabilizadas en cápsulas. En el estudio realizado por Tunio S.A. *et al* en el 2010 se vio que la expresión de GapA-1 se mantuvo –conservada en diversos aislamientos de especies de *Neisseria*. La citometría de flujo confirmó que GapA-1 podía detectarse en la superficie celular, pero solo en un fondo de siaD-knockout (cápsula-deficiente), lo que sugiere que GapA-1 es inaccesible para el anticuerpo en *meningococos* encapsulados cultivados *in vitro*. El papel de GapA-1 en la patogénesis meningocócica se abordó mediante análisis mutacional y complementación funcional. La pérdida de GapA-1 no afectó el crecimiento de la bacteria *in vitro*. Sin embargo, un mutante deficiente en GapA-1 mostró una reducción significativa en la adhesión a células epiteliales y endoteliales humanas en comparación con el tipo silvestre o wild type y el mutante complementado. Una reducción similar en los niveles de adhesión también fue evidente entre una cepa meningocócica deficiente en siaD y un mutante isiaD

gapA-1 con doble mutación. Los datos demuestran que el GapA-1 meningocócico es una proteína expuesta a la superficie altamente conservada, expresada de forma constitutiva, a la que se puede acceder con anticuerpos solo en ausencia de cápsula. La mutación de GapA-1 no afecta la tasa de crecimiento *in vitro* de *N. meningitidis*, pero afecta significativamente la capacidad del organismo para adherirse a las células epiteliales y endoteliales humanas en un proceso independiente de la cápsula, lo que sugiere un papel en la patogénesis de la infección meningocócica (24).

En otro estudio realizado por Erttmann K.D. et al en el 2005 buscaron antígenos de *Onchocerca volvulus* posiblemente involucrados en la protección contra la oncocercosis humana, el análisis parcial de la secuencia de aminoácidos de uno de los antígenos de *O. volvulus* de las proteínas identificadas serológicamente mostró una estrecha relación con la familia de proteínas de la GAPDH. La posterior exploración y clonación de la biblioteca de ADNc de gusanos adultos produjo un clon de 1650 pb. Un marco de lectura abierto abarca más de 1020 pb y codifica una proteína de 340 aminoácidos con un peso molecular aparente de 38,000 Daltons. La comparación de la secuencia completa de aminoácidos identificó esta proteína como un miembro de la familia de proteínas GAPDH. La proteína expresada de forma recombinante muestra la actividad enzimática de GAPDH, así como la capacidad de unión al plasminógeno. El análisis de secuencia de ADN del gen correspondiente reveló la presencia de dos intrones. Usando inmunohistología, se observó Ov-GAPDH en microfilarias, larvas infecciosas y gusanos adultos, machos y hembras. Lo más sorprendente fue el etiquetado de la musculatura de la pared del cuerpo. El etiquetado también se observó en la cavidad de pseudocoeloma y en un subconjunto de núcleos celulares, lo que sugiere funciones adicionales no glucolíticas de la Ov-GAPDH. La inmunización con pistola de genes con la construcción de ADN en el ganado condujo a respuestas inmunes humorales específicas. Por lo tanto, el potencial protector de la estructura de ADN de Ov-GAPDH se puede evaluar en ensayos de vacunación utilizando modelos animales como el modelo de ganado / *Onchocerca ochengi* (25).

Un estudio previo realizado en adolescentes que viven en un área endémica para *Schistosoma mansoni* en Brasil ha demostrado que un antígeno de superficie de esquistosoma de 37 kDa es un objetivo selectivo para anticuerpos en sueros de aquellos que fueron resistentes a la reinfección.

Se demostró que este antígeno mediante clonación molecular era el GAPDH de esquistosoma. El objetivo de la investigación fue evaluar si los péptidos correspondientes a determinantes antigénicos de GAPDH podrían usarse en una subunidad de vacuna. Se identificaron cinco regiones epitópicas de células B y dos de células T en Sm37-GAPDH. Uno de los determinantes de células B (Sm37-5, a.á 268 ± 289) es altamente antigénico en infecciones humanas y la reactividad de los anticuerpos hacia este determinante está asociada con la resistencia a la reinfección. Los ratones y las ratas inmunizadas con Sm37-5 se protegieron parcialmente contra una infección de exposición, lo que indica que este péptido puede inducir inmunidad protectora. El análisis de la secuencia de aminoácidos de Sm37-5 indicó que este determinante antigénico probablemente se conserva entre otras cepas patógenas de esquistosoma (*S. haematobium*, *S. intercalatum* y *S. japonicum*), aunque muestra importantes diferencias de aminoácidos con el GAPDH humano correspondiente a la secuencia. Todos estos resultados indican que el Sm37-5 debe considerarse como un componente candidato para una vacuna de subunidad antiesquistosoma (26).

4 Antecedentes directos

Diferentes autores se han dado a la tarea de investigar los procesos de invasión y colonización de los patógenos, logrando identificar proteínas relacionadas a la virulencia de los microorganismos. Uno de estos equipos de trabajos es el laboratorio de Microbiología Ambiental del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y la Educación, FES Iztacala UNAM y en colaboración con el laboratorio de Inmunología Molecular de la Escuela Superior de Medicina, IPN se ha desarrollado un excelente modelo en ratón de la infección de la MAP causado por *Naegleria fowleri*, el cual es iniciado en la mucosa nasal. Interesantemente se ha observado que los ratones desarrollan la enfermedad de una manera muy similar a la que ocurre en los humanos. A nivel general, se puede observar mediante imágenes por Inmunohistoquímica de la cavidad nasal de los ratones infectados, una gran cantidad de células polimorfonucleares rodeando a los trofozoítos de *N. fowleri* tanto en el lumen como en el epitelio de la mucosa nasal del ratón (27). Aunque la presencia de estas células parece no ser suficiente para evitar la muerte del ratón, ya que las amibas logran invadir la mucosa y así montar una infección letal, como se observó previamente en un estudio realizado por Rojas y colaboradores en 2004 (27). Por otro lado, en 2014 se desarrolló un modelo de protección, el cual consiste en inmunizar ratones BALB/c por la ruta intranasal con extractos totales de la amiba coadministrados con la toxina del cólera, durante cuatro ocasiones en intervalos de siete días, donde se logró obtener un 100% de supervivencia de los ratones una vez que estos fueron retados con dosis letal de trofozoítos de *N. fowleri*. Se ha observado que este modelo de inmunización induce altos niveles de anticuerpos IgA e IgG tanto a nivel sistémico como de la mucosa nasal donde la respuesta provocada por estos antígenos se polariza hacia una respuesta de tipo TH2 (28-30). De tal manera que se sugiere que los anticuerpos juegan un papel muy importante en la protección contra *N. fowleri*. Interesantemente también se ha encontrado que, en un trabajo reciente, utilizando el esquema de inmunización antes mencionado, se plantea la idea de buscar cuáles son los antígenos reconocidos por estos anticuerpos e identificarlos como posibles responsables de la inmunidad protectora contra *N. fowleri*. Hasta ahora se han identificado algunas proteínas altamente inmunogénicas e inmunodominantes como es el caso de la proteína de 37 kDa la cual debido a su peso molecular es muy probable que corresponda a la enzima GAPDH ((28)).

En otro trabajo realizado por Osornio – Rojas J. L. en 2017 se obtuvo el diseño de los Péptidos potencialmente inmunogénicos a partir de la Gliceraldehído – 3 – Fosfato Deshidrogenasa. Los epítopes seleccionados de la proteína de diferentes regiones de la (GAPDH de humano 37 kDa), muy probablemente fueron los responsables de la inmunidad protectora, ya que la Inmunización de ratones con los péptidos diseñados y coadministrados con la toxina del cólera (PepMXY+CT) indujo un 80% de protección en los ratones infectados con trofozoítos, mientras que la inmunización con los péptidos diseñados en conjunto (PepMXY) indujo un 60 % de protección.

Se encontró un incremento en la producción de los niveles de anticuerpos séricos de los isótipos (IgA, IgG e IgM) en los ratones inmunizados tanto con los péptidos diseñados como, coadministrados con la CT (PepMXY) (PepMXY+CT). Además, hubo una mayor producción de anticuerpos en lavados nasales de los isótipos (IgA, IgG e IgM) en los ratones inmunizados tanto con los péptidos diseñados como, coadministrados con la CT (PepMXY) (PepMXY+CT).

Con base a lo anterior, nosotros identificamos a la proteína GAPDH dentro de la banda de 37 kDa la cual podría tener propiedades de virulencia en *N. fowleri* que posiblemente, al igual que en otros microorganismos, puede tener un papel en la adhesión de la amiba, por lo tanto, es de vital importancia el poder identificar la secuencia de esta proteína para poder desarrollar una vacuna en base a la proteína completa o bien en base al diseño de péptidos sintéticos basados en la secuencia de la GAPDH y poder establecer un modelo de vacunación en animales y llegar a tener sobrevida de más del 80% sin necesidad de adyuvantes y así poder llegar a utilizar este tipo de métodos y de modelos de vacunación contra este microorganismos como un método preventivo en zonas endémicas donde se encuentra esta amiba.

5 Justificación del proyecto

De las amibas de vida libre los tres géneros que producen enfermedades en el hombre son: *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia*; aunque este trabajo se enfocó únicamente a lo concerniente a *Naegleria fowleri*. La patología que es causada por *N. fowleri* es la Meningitis amebiana primaria (MAP), enfermedad aguda y letal. En México no son muchos los casos reportados por Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) esto porque los síntomas suelen ser confundidos con los de una gripa estacional. Por lo tanto, es importante incentivar el estudio y el conocimiento de estos protozoarios, especialmente la divulgación de las infecciones causadas por amibas de vida libre al personal de salud y a la población en general; así como, el desarrollo de técnicas diagnósticas eficientes con el fin de poder llegar a un diagnóstico preciso para un correcto tratamiento de la infección.

La realización de esta tesis contribuye a la identificación parcial la proteína GAPDH (de la banda de 37 kDa) que expresa la AVL *N. fowleri* la cual sugerimos como factor de virulencia para la adhesión en mucosa y su posterior patogenicidad en meninges provocando la Meningitis Amebiana Primaria. Con la identificación de la proteína que codifica para la GAPDH podremos proponer en trabajos posteriores, un tratamiento preventivo como una vacuna para evitar la adhesión de la amiba en mucosa nasal y/o proponer un tratamiento de despegue para aquellos pacientes que ya están contagiados y poder darle un tratamiento curativo, ya que esta es una enfermedad aguda y fulminante que mata en el lapso de 7 a 14 días, por la brevedad del tiempo es la importancia de poder proponer un tratamiento médico que mínimo alargue la vida del paciente para poder estudiar más acerca de esta patología que por falta de rigor científico no se le ha dado la importancia debida en nuestro país.

Es probable que con los hallazgos de este trabajo a futuro se pueda seguir la línea de investigación para proponer una posible candidata a vacuna con base a la proteína identificada demostrando en posteriores investigaciones su implicación más profunda como factor de virulencia.

6 Objetivos

6.1 Objetivo General:

Identificar la proteína gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa de *Naegleria fowleri* (de la banda de 37 kDa) y su posible implicación como factor de virulencia durante la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP)

6.2 Objetivos específicos:

- Alinear la secuencia del gen que codifica para la GAPDH de *Naegleria gruberi* con la secuencia de otros microorganismos patógenos que ya han sido reportados con esta enzima como factor de virulencia.
- Diseñar oligos o primers específicos de las regiones que codifican para la GAPDH de *Naegleria fowleri*, así como aquellas que codifican para una especie no patógena del género, *Naegleria gruberi*.

Amplificar las regiones que codifican para la GAPDH de *N. fowleri*

Determinar si proteínas reconocidas por sueros de conejo y ratones inmunizados con extractos de *N. fowleri* cruzan con aquellas reconocidas por anticuerpos específicos anti-GAPDH

- Analizar la banda de 37 kDa de *Naegleria fowleri* mediante espectrometría de masas
- Inmunolocalizar a la proteína GAPDH en *N. fowleri* por microscopía confocal
- Reconocer cual es el papel que tiene la GAPDH como factor de virulencia en *Naegleria fowleri*.

7 Hipótesis

La proteína que codifica para el gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa de *Naegleria fowleri* (de la banda de 37 kDa) participa como factor de virulencia durante la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP)

8 Materiales y Método

8.1 Diseño de los cebadores/primers del gen que codifica para la Gliceraldehído – 3 – Fosfato Deshidrogenasa.

Se realizó una búsqueda de las secuencias de los nucleótidos que codifican para la proteína GAPDH que están reportadas de la base de datos NCBI y Uniprot de las amibas de vida libre *Naegleria gruberi*, *Naegleria andersoni*, *Entamoeba histolytica* y los macroorganismos patógenos *Neisseria meningitidis*, *Edwardsiella tarda*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* y *Onchocerca volvulus*. Posterior a esto se realizó un alineamiento en el programa ClustalX para poder hacer un comparativo entre las secuencias de ARNm de los diferentes microorganismos y poder diseñar un cebador/primer.

8.2 Selección de los cebadores/primers

El diseño de los cebadores/primers fue hecho mediante los criterios que se establecen para el diseño de primers, que son los siguientes: deben tener longitud de entre 19 y 25 nucleótidos; deben de ser ricos en GC (más del 50% de ser posible); el contenido de GC de los cebadores de la misma reacción deben de ser similares; deben ser complementarios a la zona deseada aunque admiten degeneraciones; las temperaturas de fusión de los primers usados en la misma reacción deben ser similares, normalmente $T_m > 58^\circ\text{C}$; es requisito que la secuencia de los cebadores no formen horquillas internas y sean complementarias entre sí.

8.3 Diseño de los cebadores/primers

El diseño de los cebadores se hizo una vez realizado un alineamiento mediante un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) entre las diferentes secuencias de ARNm de las amibas, bacterias y hongos que se seleccionaron y tomando en cuenta los parámetros del diseño de primers que establece el Instituto de Biotecnología (IBt ANEXO I). De entre todos estos microorganismos se utilizó a *Naegleria gruberi* (amiba no patógena del género *Naegleria*) como base para el diseño de los primers por su parentesco con la amiba de estudio *Naegleria fowleri*. Es importante mencionar que, a la fecha del estudio, no estaba disponible en la base de datos la secuencia de GAPDH para *Naegleria fowleri*. Por tal motivo se consideró a *Naegleria gruberi* para el diseño.

8.4 Síntesis de los Cebadores/Primers seleccionados.

Una vez seleccionadas las secuencias de los primers, estas fueron enviadas para síntesis (UNIPROT-País) considerando el tipo de purificación o de síntesis, la molaridad y la concentración.

8.5 Cultivo de las amibas

Para este trabajo se trabajó con la amiba de vida libre *Naegleria fowleri* y se realizaron cosechas de la amiba en cajas de cultivo con un contenido de 5 ml de Bactocasitona al 2%, antibiótico (Penicilina) y anti-fúngico (Estreptomocina) al 0.01%, suero fetal bovino al 10% y las amibas, a una temperatura de 37°C. La cosecha de las amibas se realizó en una campana de flujo laminar donde se deja con luz ultravioleta 10 min. Previos al uso de la campana mientras las amibas se dejan a una temperatura de 2° a 4° para que se despeguen de la caja de cultivo y puedan ser cosechadas con mayor facilidad, una vez transcurrido ese tiempo se procede a encender el mechero y dar unos golpes a la caja para despegar toda la monocapa, se abre la caja cerca del mechero y se decanta en un tubo Falcon de 30 ml sin tocar boquillas para evitar riesgo de contaminación del medio, se vuelve agregar la Bactocasitona a la caja, el suero fetal bovino, el antibiótico y anti-fúngico, se cierra y se sella con Parafilm para que vuelvan a reproducirse las amibas. Posteriormente una vez obtenido las amibas se procede a centrifugar a 3500 revoluciones para formar una pastilla de amibas y desechar el medio en el que se encuentra, después se coloca 5 ml e PBS al 1x para lavar a las amibas, se resuspende y se vuelve a centrifugar a 3500 revoluciones para obtener de nueva cuenta una pastilla, se desecha el PBS y se procede a lisar a las amibas.

8.6 Cultivos de *Naegleria fowleri*, *Naegleria lovaniensis* y *Naegleria gruberi*.

Se trabajó con una cepa de *Naegleria fowleri* ATCC 30808, *Naegleria lovaniensis* ATCC 30569 y *Naegleria gruberi* ATCC 30224 (American Type Culture Collection, Manassas, Va), las cuales fueron cultivadas axénicamente en medio de Bactocasitona (225930, Difco, Le Pont de Claix, France) suplementado con suero fetal bovino al 10% (161770-078, GIBCO, Grand Island, N.Y) a 37°C. Los trofozoítos de las diferentes especies fueron cosechados dos veces a la semana, en donde se colocaba 15 minutos en el congelador previos a la cosecha para favorecer el desprendimiento de estos, posteriormente se llevaron a la campana de flujo laminar previamente limpiada y esterilizada donde se cosecharon los trofozoítos de las amibas siendo colocados en tubos tipo Falcón. Finalmente se colocaron estos tubos en una centrifuga a 3,500 revoluciones por minuto durante 15 minutos para poder obtener las pastillas limpias del medio en el que se encontraban.

8.7 Extracción de ADN en las amibas *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. gruberi*.

Una vez obtenida la pastilla de amibas, esta fue lavada con PBS al 1X al menos 2 veces, resuspendiendo y volviendo a centrifugar durante 15 minutos a 3,500 revoluciones por minuto, para una muestra de monocapa celular se procede a realizar un conteo en una cámara de recuento Neubauer o hemocitómetro (Figura 1), este sistema tiene 2 áreas de conteo separadas, cada una debe contener 0.1 mm^3 de muestra al cubrirse con el cubre objetos, al tener las amibas resuspendidas en medio se carga una micropipeta con $10 \mu\text{l}$ de la muestra en cada cuadrante para tener cubierto al 100% todas las regiones de la cámara de recuento, se observa bajo microscopio y se comienza a contabilizar el número de trofozoítos por cuadrantes de la siguiente forma:

Cuadrantes para conteo

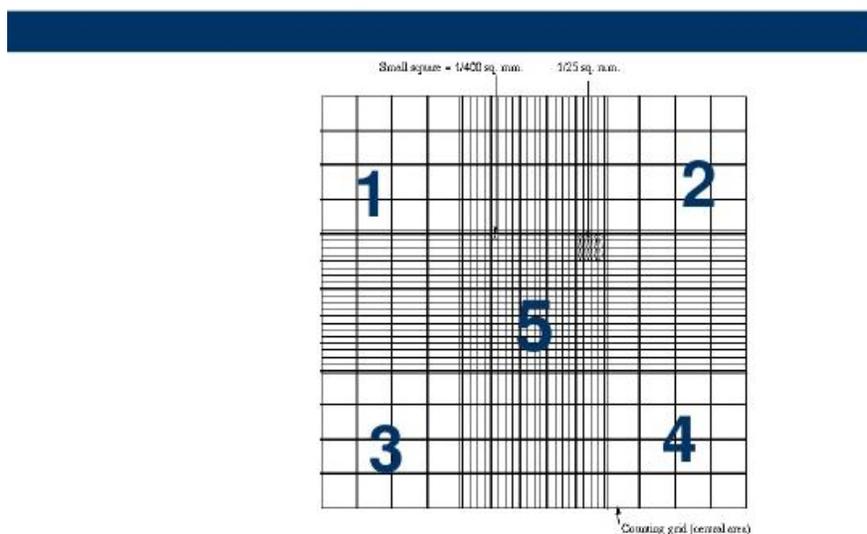


Figura 1. Cámara de Neubauer Esta cámara de recuento está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas en cuyo fondo se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas. Se cubre la cámara con un cubreobjetos que se adhiere por simple tensión superficial (en especial una vez que se haya añadido la muestra líquida).

Del cuadrante 1 al 4 se contabilizan sólo los ejemplares que estén en su forma de trofozoíto, una vez obtenido el número de trofozoítos por cada cuadrante se suman y se sacó un promedio por los 4 cuadrantes de la cantidad de trofozoítos contados, una vez obtenido el promedio se multiplica por 10,000 para obtener el valor de trofozoítos por ml en los tubos Falcón, teniendo la equivalencia

de trofozoítos por ml se multiplica esta cantidad por el número de ml que se obtuvieron de cosecha en el tubo Falcón para tener un aproximado de la cantidad de trofozoítos totales cosechados. Para este procedimiento de extracción de ADN de una muestra de monocapa celular se necesitó 5.0×10^6 como máximo de células, una vez contadas y cumpliendo el primer requisito procedimos a centrifugar la suspensión a aproximadamente 3,800 revoluciones por minuto durante 5 minutos, remover el sobrenadante y agregar 500 μ l de amortiguador de lisis genómico directamente a la pastilla celular resuspendiendo la pastilla y poniendo al vórtex durante 4 o 6 segundos y dejar reposando durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente la mezcla es transferida a una columna Zymo - Spin™ sobre un tubo colector, se centrifuga a 17,200 revoluciones por minuto durante un minuto, terminando este paso se desecha el tubo colector con el fluido, continuando con la transferencia de la columna de Zymo - Spin™ a un nuevo tubo colector y agregando 200 μ l de amortiguador Pre – Lavado de ADN a la columna, centrifugar nuevamente a 17,200 revoluciones por minuto durante un minuto. Agregar 500 μ l de amortiguador de Lavado ADN-g a la columna, centrifugar por 17,200 revoluciones durante un minuto. Por último, transferir la columna a un tubo de microcentrifugado limpio y agregar ≥ 50 μ l de amortiguador Elución del ADN o agua a la columna. Incubar de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente y lo resultante centrifugarlo a máxima velocidad (19,000 rpm) durante 30 segundos para eluir el ADN.

8.8 Extracción de ARN de las amibas *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. gruberi*.

Una vez obtenida la cosecha de amibas para poder extraer ARN, ADN y Proteínas se obtiene 1 ml de la cosecha previamente contabilizada y se coloca en un tubo de polipropileno Eppendorf™ añadiendo 500 μ l de TRI Reagent® suplementado con 200 μ l de Isopropanol cerrando el tubo Eppendorf™ para homogenizar y realizar la lisis de las amibas mediante agitación con vórtex durante 15 segundos. Una vez mezclado la muestra se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación de nucleoproteínas. Siguiendo a esto se suplementa la lisis de las amibas agregando 200 μ l de Cloroformo por cada 500 μ l de TRI Reagent®, cubrir la muestra fuertemente y agitar vigorosamente por 15 segundos en vórtex. Mantener la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 5 minutos y centrifugar a 18,800 rpm durante 15

minutos a 4°C. Posterior a la centrifugación la mezcla se separará en 3 fases en donde el ARN se encontrará exclusivamente en la fase acuosa, el ADN y Proteínas en la fase intermedia y la fase orgánica queda en una pequeña pastilla abajo. El volumen de la fase acuosa es aproximadamente del 60%. Una vez obtenida la fase acuosa, se trasfiere a un nuevo tubo Eppendorf™ para agregar 500 µl de Isopropanol por cada 0.5 ml de TRI Reagent® utilizados para la lisis inicial, deje la muestra a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos y centrifugar posteriormente a 18, 800 rpm durante 8 minutos a 4°C, el resultante de esta precipitación de ARN forma un gránulo peludo o un gel blanco en el fondo del tubo. Una vez obtenida esta pequeña pastilla de ARN retirar el sobrenadante y dar lavados al ARN con Etanol al 75% en vórtex, agregando 1 ml de Etanol por 500 µl de TRI Reagent® utilizados inicialmente, una vez mezclado el ARN y el Etanol al 75% centrifugar la suspensión a 14, 900 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente remover el Etanol por completo y dejar la pastilla de ARN secar al aire durante un aproximado de 10 minutos, la pastilla de gel blanco se volverá transparente, una vez obtenida esa consistencia del ARN agregar 50 µl de agua libre de RNAsas, ADNzas, esta agua se llama DEPC, mezclar bien para obtener una completa solubilización del ARN, por último incubar por 15 minutos a 55°C y está listo el aislamiento de ARN.

8.9 Amplificación del ADN de *N. fowleri*, *N. gruberi* y *N. lovanienses* por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Una vez que se tienen las cosechas de las amibas y se lisan para extracción de ADN el procedimiento a seguir para la amplificación del gen de interés es realizar una PCR, la PCR consiste en sacar una muestra de ADN en este caso 1 µl de ADN en una concentración de 10 µg, después se añaden los primers que van unirse al sitio de interés, en este caso se utilizaron primers diseñados específicamente para la proteína que se trata de identificar, la concentración de los primers tiene que ser de 10 pM, en las muestras se cargó 1 µl de sentido y 1 µl de antisentido a 10 pico molar cada una, posteriormente se añade 12.5 µl de KAPA Polimerasa y se lleva a 25 µl con agua libre en ADNAsas, antes de meter al termociclador con las condiciones específicas para que los primers puedan hacer su alineación se les da un pequeño spin a 3000 rpm para hacer que todos los compuestos se mezclen uniformemente y no queden residuos en las paredes del tubo de PCR. Una vez hecho esto se coloca en el termociclador en las condiciones óptimas para que los primers sirvan, para este trabajo se trabajó bajo las siguientes condiciones: Las cadenas sufren una

desnaturalización a 94°C por 2 minutos, después comienzan los ciclos del termociclador, dando un ciclo a 94°C por 30 segundos para la desnaturalización, alineamiento a una temperatura de 55°C durante 30 segundos y para terminar el ciclo una extensión a 72°C durante 1 minuto, estos pasos se repite durante 35 ciclos y seguido de estos 35 ciclos se le da una última extensión a 72°C durante 10 minutos para terminar en una refrigeración de 4°C durante un tiempo indefinido o hasta su utilización para correr en gel de Agarosa.

8.10 Amplificación de ARN de *N. fowleri*, *N. gruberi* y *N. lovanienses* por Reacción en Cadena de Polimerasa con Retro Transcriptasa en un solo paso (RT/PCR)

Para esta técnica se tiene que utilizar el ARN extraído de las amibas, se tienen que utilizar ARN de gran calidad para una síntesis exitosa de ADNc (ADN Complementario) con longitud completa, antes de realizar la técnica confirmar que nuestro ARN no esté contaminado corriendo una pequeña muestra en un gel de Agarosa al 2% en una electroforesis durante 50 minutos esto con fines de ver que no contenga ADN y el ARN se mantenga en buen estado y esté libre de ARNasa y mantenga buenas condiciones, una vez verificado las condiciones y calidad de nuestro ARN continuamos con los cebadores genéticos específicos, en este caso los primers diseñados para la proteína GAPDH, la cantidad a usar es de 1 µl a la concentración de 10 pM, aunque el rango para la RT/PCR es de 0.2 a 0.5 µM, esto acompañado de los dNTP que deben estar en una concentración de 200 µM para tener una buena reacción. Para comenzar a preparar la mezcla o coctel para la RT/PCR tenemos que cargar el tubo de PCR con las siguientes concentraciones y cantidades: 1 µl de muestra de ARN en una concentración de 10 µg x 1 µl, después agregar el sentido y antisentido de los cebadores genéticos específicos 1 µl por cada uno en una concentración de 10 pM, agregar 1 µl de RT/Platinum™ *Taq* Mix, 25 µl de 2X Reaction Mix y 21 µl de Agua libre de ARNasa y ADNasa para llevar a un volumen final de 50 µl. Por ultimo meter al termociclador con las siguientes condiciones: dar una incubación de 30 minutos a una temperatura de 55°C para dejar que trabaje la retrotranscriptasa y después subir la temperatura a 94°C durante 3 minutos para inactivar a la retrotranscriptasa y comenzar a realizar la PCR con del ADNc, se dan 35 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C durante 15 segundos para la desnaturalización de las cadenas de

ADNc; una alineación a 55°C durante 30 segundos (la T_m es de 55°C en este caso particular por la razón de que los cebadores diseñados trabajan bajo esa T_m para su alineación, va depender o a cambiar esta T_m según lo requiera el par de cebadores utilizados en cada caso) y una extensión o elongación a 71°C durante un minuto, terminando estos 35 ciclos se da una última elongación a 72°C durante 10 minutos y posterior a esto baja la temperatura a 4°C para su refrigeración y posterior análisis en gel de Agarosa.

8.11 Análisis de proteínas de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. gruberi* por electroforesis unidimensional en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE 1D).

20 µg de extractos totales de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. gruberi* se separaron por SDS-PAGE (12%) en condiciones desnaturalizantes a 100 V. Posteriormente, algunos geles se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa (400 mA durante 1 h) para la realización del Western blot y otros se tiñeron con azul Coomassie hasta que se logró el contraste apropiado para la identificación de las bandas (Carrasco-Yepey y cols., 2013).

8.12 Identificación de la banda de 37 kDa por espectrometría de masas

Un trozo de gel correspondiente a la banda de 37 kDa fue cortado cuidadosamente y se colocó en un tubo Ependorff con PBS-1x estéril, este tubo fue enviado a la Facultad de Química de la UNAM, específicamente a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria, en la cual fue analizada por espectrometría de masas utilizando el equipo espectrómetro de masas modelo Synapt G2S.

Los datos fueron procesados mediante un servidor y un software global llamado Protein Lynx versión 2.4 (Waters Corporation) (Protein Lynx Global Server: PLGS) (Waters Corporation). La puntuación de > 95% de confianza se aceptó como correcta. Se buscó en la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org>). Los péptidos se combinaron con los péptidos teóricos de proteínas informadas de *N. fowleri* y *N. gruberi*.

8.13 Inmunolocalización de la proteína GAPDH con microscopía confocal

Preparación de Paraformaldehído al 4%

Se agrega paraformaldehído (40 gr) en PBS 1X (900 ml) precalentado a 60°C en agitación y con temperatura constante, posteriormente se incorporan perlas de NaOH, hasta que la solución se vuelva transparente. Dejar enfriar y ajustar el pH con NaOH concentrado a 7.4 una vez conseguido el pH se refrigera a 4°C protegido de la luz para su posterior uso.

Técnica de tinción de fluorescencia

Para la tinción de amibas se debe de realizar un conteo de la cosecha en una cámara Neubauer, una vez realizado el conteo se debe colocar entre 50 o 100 amibas/100 microlitros sobre un cubreobjetos e incubar en cámara húmeda a 37°C por 30 min. (A la par, una alícuota de paraformaldehído al 4% de atempera a 37°C por 30 min), posteriormente se agregan 200 µL de paraformaldehído al 4% y se incuba a 37°C para fijar las amibas adheridas al vidrio del cubreobjetos, posterior a la fijación, se lava 4 veces en PBS Tween frío por inmersión del cubreobjetos con movimientos lentos de izquierda a derecha, una vez hecho los 4 lavados se coloca en cámara húmeda y se permeabiliza con 300 µL de PBS-Tween + Triton frío (PBS-T + 50 µL de Triton X-100) y se incuba por 15 min. Después de la incubación se realiza de nuevo 4 lavados veces en PBS Tween frío por inmersión del cubreobjetos, posteriormente se colocan 200 µL del anticuerpo primario α -Nf en dilución (10 µL en 1 ml de PBS-T) y se incuba 4 hrs a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad. Posteriormente se lava 4 veces en PBS Tween frío por inmersión del cubreobjetos, se colocan 200 µL del anticuerpo secundario α -GAPDH con fluorocromo en dilución (3 µL en 0.5 ml de PBS-T) y se incuba 4 hrs a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad. Posteriormente se lava 4 veces en PBS Tween frío por inmersión del cubreobjetos y se colocan 200 µL del anticuerpo Secundario α -Conejo con fluorocromo en dilución (2 µL en 0.5 ml de PBS-T) y se incuba 4 hrs a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad. Posteriormente se lava 4 veces en PBS Tween frío por inmersión del cubreobjetos y se deja secar un breve tiempo para

posteriormente colocar la cara del cubreobjetos donde están las amibas fijadas sobre una gota de 5 μL de Vectashield + DAPI y se sella con esmalte sobre un portaobjetos y finalmente se refrigera a 4°C en una caja de porta muestras protegido de la luz, hasta su observación. Posteriormente las muestras fueron observadas con un microscopio confocal (Axovert 200M; Carl Zeiss, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas).

8.14 Reto Intranasal con Trofozoítos de *N. fowleri*.

Partiendo con una concentración de anticuerpos comerciales de la proteína de 37 kDa de 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se procedió a pre – incubar a las amibas durante 3 minutos con el anticuerpo para realizar el bloqueo de la proteína de 37 kDa e inmediatamente después de los 3 minutos siendo inoculados los grupos de ratones, con la dosis letal de trofozoítos vivos de la amiba (10,000) haciendo 3 grupos, 2 con diferentes concentraciones de anticuerpo y el control (solo amibas), las diluciones utilizadas fueron 1:250 y 1:100. Los ratones fueron infectados por la ruta IN con aproximadamente 25 μL de volumen que incluía la dosis letal de N.f. Los ratones fueron monitoreados diariamente durante 60 días posteriores al desafío para determinar la sobrevivencia.

9 Resultados

9.1 Recolección de nucleótidos reportados del Gliceraldehído – 3 – Fosfato Deshidrogenasa y selección de secuencias para diseño de primers.

Al momento del estudio, se encontró en la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/P83601>) reportados 18 aminoácidos de la amiba *Naegleria fowleri* con clave G3P_NAEFO (Figura 2), la secuencia completa no estaba aún reportada en la base de datos, por lo que se utilizaron como base para poder diseñar los primers con adiciones de secuencias de las amibas *Naegleria gruberi*, *Naegleria lovaniensis* y *Plasmodium falciparum* principalmente, tomando como base a *Naegleria gruberi* por el parentesco que tiene filogenéticamente con *Naegleria fowleri* esperando que la homología entre estas especies sea lo suficientemente similar como para poder llegar a obtener más aminoácidos en la secuencia de *Naegleria fowleri* con el diseño de primer degenerados.

```
>sp|P83601|G3P_NAEFO Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment) OS=Naegleria fowleri OX=5763 PE=1 SV=1  
VKVGINGFGRIGRXVFRA
```

Figura 2. Secuencia de aminoácidos reportados en la base de datos Uniprot. Fragmento de los primeros 18 aminoácidos correspondientes a la amiba *Naegleria fowleri*.

Se comparó la secuencia de *Naegleria gruberi* con clave D2W142 (Figura 3) y *Naegleria fowleri* para ver qué tanta homología existía entre los primeros 18 aminoácidos de ambas secuencias de la Gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa y así poder dilucidar mediante un BLAST las posibles variables entre las diferentes secuencias y poder tomar estas posibilidades mediante el diseño de varios primers degenerados para poder tener un abanico mayor de posibilidades al momento de realizar las reacciones de cadenas de polimerasa, este BLASTp se realizó mediante el programa ClustalX2 y BioEdit de donde se obtuvieron los alineamientos de las distintas secuencias de Gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa que se utilizaron como bases para determinar los sitios ideales para el diseño de los primers (Figura 4).

```

>tr|D2W142|D2W142_NAEGR Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
OS=Naegleria gruberi OX=5762 GN=NAEGRDRAFT_53883 PE=1 SV=1
MVKIGINGFGRIGRLVFRASLERTDVEVVAINDIMMTPEYMIYMIKYDTHVHGKFKHGLEH
TEKSIIVNGREIHVLCERDPEQLPWGQHNVEYVVESTGIFTKLDSAAKHLKGGAKRVVIS
APADTPTFVMGVNHEYKPEMTVINNASCTTNC LAPIAAVLHENFGIVEGLMTTVHAVTA
TQPTVDAPSRKDWRRGGRAAGYNIIPSSTGAAKAVGLVIPSLNGKLTGMAFRVPTVDVSVV
DLTCRLEKPKTKKQIDEAMKAASESERFKGILKFTDEEVVSSDFVHDSASSTYDSKASIC
LNEHFVKVVAWYDNEWGYSNRVLDLIKSTAKIQ

```

Figura 3. Secuencia de aminoácidos completa para la proteína de GAPDH de *Naegleria gruberi*. Esta secuencia de aminoácidos corresponde a *Naegleria gruberi*, secuencia completa reportada en la base de datos de Uniprot

Figura 4.

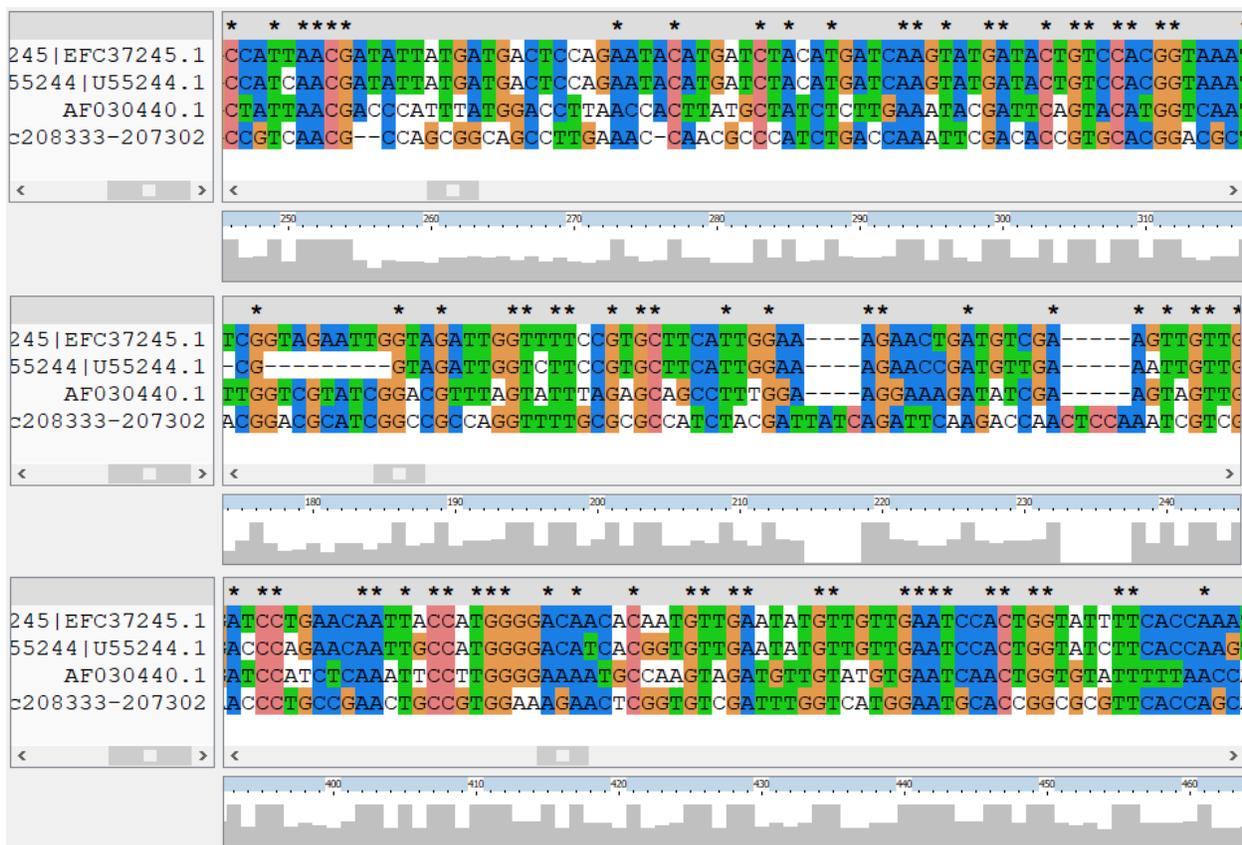


Figura 4. Alineamientos de las secuencias; ENA| EFC37258| EFC37245.1 (*Naegleria gruberi*) ENA| U55244| U55244.1 (*Naegleria andersoni*) AF030440.1 (*Plasmodium falciparum*) CN_003112.2_c208333-207302 (*Neisseria meningitidis*). En esta figura se muestra los alineamientos de las secuencias de 4 microorganismos diferentes que comparten cierta homología en la secuencia de nucleótidos que codifican a la proteína GAPDH, arriba de cada secuencia de alineamiento se muestra un asterisco (*) que indica la similitud existente entre estas diferentes especies patógenos y no patógenos.

9.2 Diseño de primers a través del programa de la base de datos NCBI

Una vez realizado los blast en el programa de NCBI para el diseño de primers, se tomaron en cuenta los primers que cumplían con los criterios mencionados en la metodología, en las figuras siguientes figuras se observa las secciones de nucleótidos seleccionadas por el programa que cumplen los criterios dentro de la secuencia completa de GAPDH de los diferentes microorganismos que fueron utilizados como molde para los fines de más variabilidad en un posible nueva secuencia aún sin identificar en *Naegleria fowleri*.

Las secciones subrayadas en amarillo corresponden a la secuencia de nucleótidos que fueron seleccionados mediante el programa de NCBI para usarlos como cebadores, teniendo en cuenta todas las características con los que un cebador debe cumplir para poder ser funcionales al momento de mandarse a sintetizar, las secciones subrayadas de azul indican el sitio de unión a la proteína en cada secuencia correspondiente a la GAPDH mencionada en la base de datos Uniprot.

Primer par: Edwarsiella tarda (1.- Edwarsiella tarda)

Para el primer par de cebadores correspondientes al microorganismo *Edwarsiella tarda* se puede observar que la longitud del producto esperado es de 90 pb teniendo una longitud en el sentido (Fw) y antisentido (Rv) 20 nucleótidos de la secuencia original de GAPDH, teniendo el comienzo del Fw en el nucleótido 33 de la secuencia y se llega hasta el nucleótido 52 cumpliendo con la norma de tener un contenido rico en Guanina y Citosina (GC) del mínimo 50% trabajando a una temperatura de 59.48°C y teniendo un riesgo de 5 de la formación de horquillas, el Rv comienza en el nucleótido 122 y termina en el 103 también cumpliendo el 50% de GC requerido y trabajando a una temperatura de 60.54°C y con el riesgo de 4 para la formación de horquillas.

Primer par: *Edwarsiella tarda*

	Secuencia (5' -> 3')	Cadena de plantillas	Longitud	comienzo	Detener	Tm	GC%	Auto complementariedad	Self 3' complementariedad
Cebador directo	CGCTACCCAGAAAACCGTTG	Más	20	33	52	59.48	55.00	5.00	3.00
Reverso imprimación	CCGGTAGAGGACGGGATGAT	Menos	20	122	103	60.54	60.00	4.00	3.00
Longitud del producto	90								

1.- Edwarsiella tarda

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Edwarsiella tarda* para mostrar la secuencia de los cebadores.

GAA GCA CTG ATG ACC ACC GTT CAC GCT ACC ACC GCT ACC CAG AAA ACC GTT GAT GGC CCG TCC ATG AAA GAT TGG CGC GGC
 GGC CGT GGC GCT AGC CAG AAC ATC ATC CCG TCC TCT ACC GGT GCT GCC AAG GCT GTT GGC AAG GTT ATC CCG GAA CTG AAC
 GGC AAA CTG ACC GGT ATG GCT TTC CGC GTT CCG ACC CCG AAC GTT TCC GTT GTT GAC

Segundo par de *Edwarsiella tarda* (1.2.- *Edwarsiella tarda*)

Por otro lado, aunque al programa pudo encontrar un candidato para el primer par de cebadores se arrojaron otros posibles candidatos con diferentes condiciones las cuales fueron las siguientes, en este segundo par de cebadores de *Edwarsiella tarda* tiene una longitud de 122 pb, al igual que el primer par de cebadores tiene una longitud de 20 nucleótidos por Fw y Rv, a diferencia del el primer par en este el Fw comienza en el nucleótido 12 y termina en el 31 cumpliendo con el 50%- de GC y teniendo un riesgo de 5 de auto complementariedad y trabajando en una temperatura de 59.48°C, el Rv comienza en el 133 y termina en el 114 cumpliendo también el 55% de GC, teniendo igual que el Fw una riesgo de 5 de formar horquillas y trabajando a una temperatura de 60.32°C.

Segundo par: *Edwarsiella tarda*

	Secuencia (5' -> 3')	Cadena de plantillas	Longitud	comienzo	Detener	Tm	GC%	Auto complementariedad	Self 3' complementariedad
Cebador directo	CGCTACCCAGAAAACCGTTG	Más	20	12	31	59.48	55.00	5.00	3.00
Reverso imprimación	CCGGGATAACCTTGCCAACA	Menos	20	133	114	60.32	55.00	5.00	1.00
Longitud del producto	122								

1.2.- Edwarsiella tarda

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Edwarsiella tarda* para mostrar la secuencia de los cebadores.

CAC GCT ACC ACC GCT ACC CAG AAA ACC GTT GAT GGC CCG TCC ATG AAA GAT TGG CGC GGC GGC CGT GGC GCT AGC CAG AAC
 ATC ATC CCG TCC TCT ACC GGT GCT GCC AAG GCT GTT GGC AAG GTT ATC CCG GAA CTG AAC GGC AAA CTG ACC GGT ATG GCT
 TTC CGC GTT CCG ACC

Tercer par de *Edwarsiella tarda* (1.3.- *Edwarsiella tarda*)

En otro posible candidato arrojado por el programa de NCBI se muestran las siguientes secuencias, el Fw comienza en el nucleótido 8 y termina en el 27 teniendo una longitud de 20 y cumpliendo con el 50%- de GC, el Rv comienza en el nucleótido 139 y termina en el 119 con un longitud de 21 nucleótidos y dando como resultado un producto de 132 pb, teniendo un riesgo de 2 de auto complementariedad en el Fw y trabajando en una temperatura de 60.96°C y el Rv un riesgo de 5 de formar horquillas y trabajando a una temperatura de 60.07°C.

Tercer par: *Edwarsiella tarda*

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCACCGCTACCCAGAAAACC	Plus	20	8	27	60.96	60.00	2.00	0.00
Reverse primer	TCAGTTCCGGGATAACCTTGC	Minus	21	139	119	60.07	52.38	5.00	2.00
Product length	132								

1.3.- *Edwarsiella tarda*

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Edwarsiella tarda* para mostrar la secuencia de los cebadores.

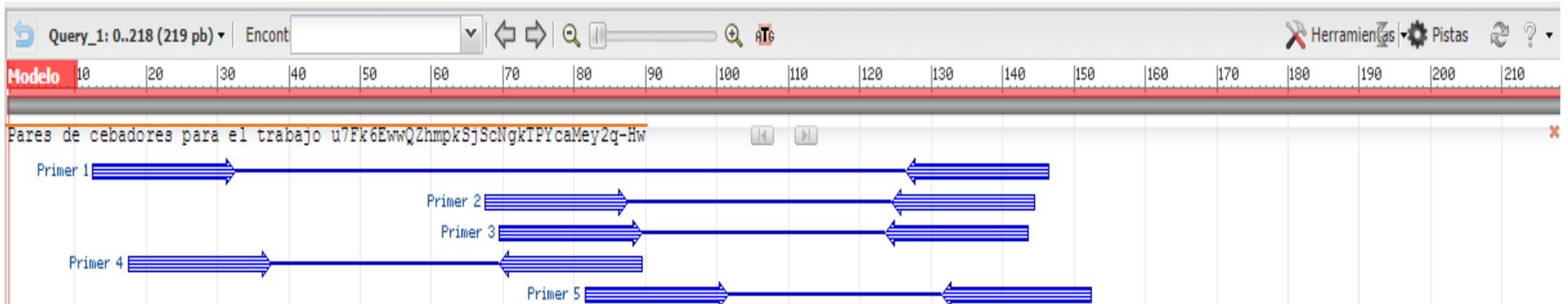
CAC GCT ACC ACC GCT ACC CAG AAA ACC GTT GAT GGC CCG TCC ATG AAA GAT TGG CGC GGC GGC CGT GGC GCT AGC CAG AAC
 ATC ATC CCG TCC TCT ACC GGT GCT GCC AAG GCT GTT GGC AAG GTT ATC CCG GAA CTG AAC GGC AAA CTG ACC GGT ATG GCT
 TTC CGC GTT CCG ACC

Primer par de cebadores de *Naegleria gruberi* (2.- *Naegleria gruberi*) y todos los posibles pares arrojados por el programa NCBI representados de manera gráfica.

Para este primer par de cebadores de *Naegleria gruberi* tenemos una longitud de 20 nucleótidos tanto para Fw como para Rv, comenzando el sentido en el nucleótido 13 y terminando en el 32 y el Rv comenzando en el 146 y terminando en el 127, ambos cumpliendo con el 50% de GC que deben tener y dando un producto de 134 pb y trabajando cada cebador en una temperatura de 60°C dando como resultado uno de los pares de cebadores ideales para una correcta PCR.

Primer par: *Naegleria gruberi*

	Secuencia (5' -> 3')	Cadena de plantillas	Longitud	comienzo	Detener	Tm	GC%	Auto complementariedad	Self 3' complementariedad
Cebador directo	ACCACTGTCCACGCTGTAC	Más	20	13	32	60.25	55.00	3.00	3.00
Reverso imprimación	ACCAAACCGACAGCCTTAGC	Menos	20	146	127	60.61	55.00	3.00	2.00
Longitud del producto	134								



En esta imagen se pueden ver los pares de cebadores que fueron utilizados en el trabajo u7Fk6EwwQZhmpkSjScNgkTPYcaMey2q-Hw de los cuales se seleccionaron solo aquellos que cumplían de mejor forma los parámetros necesarios para el diseño de cebadores, siendo sólo el par 1 el que cumple mejor las condiciones.

2.- *Naegleria gruberi*

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Naegleria gruberi* para mostrar la secuencia de los cebadores.

```
GAA GGT TTG ATG ACC ACT GTC CAC GCT GTT ACT GCT ACT CAA CCA ACT GTT GAT GCT CCA TCT AGA AAG GAT TGG AGA GGT
GGT CGT GCT GCT GGT TAC AAT ATC ATT CCA TCT TCA ACT GGT GCT GCT AAG GCT GTC GGT TTG GTT ATT CCA TCA TTG AAT
GGT AAA TTG ACT GGT ATG GCT TTC AGA GTT CCA ACT GTT GAT GTT TCC GTT GTT GAT
```

Primer par de cebadores para *Schistosoma mansoni* (3.-*Schistosoma mansoni*)

Para el primer par de cebadores de *Schistosoma mansoni* el Fw tiene una longitud de 21 nucleótidos y Rv 20 nucleótidos, iniciando el sentido en el nucleótido 15 y terminando en el 35 y el Rv comenzando en el 125 y terminando en el 106, ambos cumpliendo con el 50% de GC que deben tener y dando un producto de 111 pb y trabajando cada cebador en una temperatura de 60°C, pero teniendo un riesgo de 6 el sentido y 5 antisentido, haciendo de la mezcla algo muy inestable y altamente auto complementario.

Primer par: *Schistosoma mansoni*

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACTGTGCACTCATTACGGC	Plus	21	15	35	60.14	52.38	6.00	2.00
Reverse primer	GCACCAGTGAAGCTGGAAT	Minus	20	125	106	60.61	55.00	5.00	2.00
Product length	111								

3.- *Schistosoma mansoni*

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Schistosoma mansoni* para mostrar la secuencia de los cebadores.

GAG GGC TTA ATG ACC ACT GTG CAC TCA TTT ACG GCT ACA CAA AAG GTT GTA GAT GGA CCA TCC TCA AAA TTA TGG CGA GAT
 GGC CGT GGA GCG ATG CAA AAT ATT ATT CCA GCT TCC ACT GGT GCT GCC AAA GCT GTG GGA AAA GTC ATT CCA GCA CTA AAC
 GGA AAA TTA ACG GGA ATG GCT TTC CGC GTC CCA ACA CCA GAC GTT TCA GTC GTT GAT

Segundo par de *Schistosoma mansoni* (3.1.- *Schistosoma mansoni*)

Para el segundo par de cebadores de *Schistosoma mansoni* el Fw y Rv tienen una longitud 20 nucleótidos, iniciando el sentido en el nucleótido 84 y terminando en el 103 y el Rv comenzando en el 189 y terminando en el 170, ambos cumpliendo con el 50% de GC que deben tener y dando un producto de 106 pb, el Fw trabaja a una temperatura de 59°C y el Rv en una de 61°C dando una media de 60°C pero antisentido tiene un riesgo de 7 en la auto complementariedad, haciendo del par algo muy inestable.

Segundo par: *Schistosoma mansoni*

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCGTGGAGCGATGCAAAATA	Plus	20	84	103	58.99	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	GCGGAAAGCCATTCCCGTTA	Minus	20	189	170	61.03	55.00	7.00	2.00
Product length	106								

3.1.- *Schistosoma mansoni*

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Schistosoma mansoni* para mostrar la secuencia de los cebadores.

GAG GGC TTA ATG ACC ACT GTG CAC TCA TTT **ACG** GCT ACA CAA AAG GTT GTA GAT GGA CCA TCC TCA AAA TTA TGG CGA GAT
 GGC CGT GGA GCG ATG CAA AAT ATT ATT CCA GCT TCC ACT GGT GCT GCC AAA GCT GTG GGA AAA GTC ATT CCA GCA CTA AAC
 GGA AAA TTA ACG GGA ATG GCT TTC **CGC** GTC CCA ACA CCA GAC GTT TCA GTC GTT GAT

Primer par de cebadores para *Neisseria meningitidis* (4.-*Neisseria meningitidis*)

Para el primer par de cebadores de *Schistosoma mansoni* el Fw tiene una longitud de 21 nucleótidos y Rv 20 nucleótidos, iniciando el sentido en el nucleótido 15 y terminando en el 35 y el Rv comenzando en el 125 y terminando en el 106, ambos cumpliendo con el 50% de GC que deben tener y dando un producto de 111 pb y trabajando cada cebador en una temperatura de 60°C, pero teniendo un riesgo de 6 el sentido y 5 antisentido, haciendo de la mezcla algo muy inestable y altamente auto complementario.

Primer par: *Neisseria meningitidis*

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AACGACCAAACCGTTACCGA	Plus	20	34	53	59.90	50.00	5.00	2.00
Reverse primer	CGAGCCTGCCTTTCAATTCG	Minus	20	169	150	59.90	55.00	4.00	2.00
Product length	136								

4.- *Neisseria meningitidis*

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Neisseria meningitidis* para mostrar la secuencia de los cebadores.

AAA GGC GCG ATG ACC ACC ATC CAC GCG CTG ACC AAC GAC CAA ACC GTT ACC GAC GTG CGC CAC AAA GAC CTG CGC CGC GCC
CGC AGC GGC GTG GAA AAC ATG ATT CCG ACC AAA ACC GGC GCG GCA AAA GCC GTC GGT TTG GTA CTG CCC GAA TTG AAA GGC
AGG CTC GAC GGG CTT GCC ATC CGC GTG CCG ACC GTC AAC GTA TCA TTG GTA GAT

Segundo par de cebadores para *Neisseria meningitidis* (4.1.-*Neisseria meningitidis*)

El segundo par de cebadores de *Schistosoma mansoni* tienen una longitud de 20 nucleótidos tanto para Fw como para Rv, iniciando el sentido en el nucleótido 28 y terminando en el 47 y el Rv comenzando en el 168 y terminando en el 149, ambos cumpliendo con el 50% de GC que deben tener y dando un producto de 141 pb y trabajando cada cebador en una temperatura de 60°C promedio, pero teniendo un riesgo de auto complementariedad de 3 el sentido y 4 antisentido.

Segundo par: *Neisseria meningitidis*

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGACCAACGACCAAACCGT	Plus	20	28	47	60.81	55.00	3.00	3.00
Reverse primer	GAGCCTGCCTTTCAATTCGG	Minus	20	168	149	59.55	55.00	4.00	1.00
Product length	141								

4.1.- *Neisseria meningitidis*

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Neisseria meningitidis* para mostrar la secuencia de los cebadores.

```

AAA GGC GCG ATG ACC ACC ATC CAC GCG CTG ACC AAC GAC CAA ACC GTT ACC GAC GTG CGC CAC AAA GAC CTG CGC CGC GCC
CGC AGC GGC GTG GAA AAC ATG ATT CCG ACC AAA ACC GGC GCG GCA AAA GCC GTC GGT TTG GTA CTG CCC GAA TTG AAA GGC
AGG CTC GAC GGG CTT GCC ATC CGC GTG CCG ACC GTC AAC GTA TCA TTG GTA GAT
  
```

Tercer par de cebadores para *Neisseria meningitidis* (4.2.-*Neisseria meningitidis*)

En el tercer par de cebadores de *Schistosoma mansoni* tienen una longitud de 21 nucleótidos tanto para Fw como para Rv, iniciando el sentido en el nucleótido 9 y terminando en el 29 y el Rv comenzando en el 150 y terminando en el 130, ambos cumpliendo con el 50% de GC que deben tener y dando un producto de 142 pb y trabajando cada cebador en una temperatura de 60°C promedio, pero teniendo un riesgo de auto complementariedad de 3 el sentido y 2 antisentido.

Tercer par: *Neisseria meningitidis*

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACCAACGACCAAACCGTTAC	Plus	21	9	29	59.74	52.38	5.00	3.00
Reverse primer	GTCGAGCCTGCCTTTCAATTC	Minus	21	150	130	59.87	52.38	4.00	2.00
Product length	142								

4.2.- *Neisseria meningitidis*

En la secuencia que se observa a continuación se hace la representación gráfica de las regiones seleccionadas por el programa subrayadas en amarillo, los nucleótidos subrayados de azul son el sitio de unión reportado en la base de datos de NCBI, cabe aclarar que sólo se tomó una sección de la secuencia completa de la GAPDH de *Neisseria meningitidis* para mostrar la secuencia de los cebadores.

CAC GCG CTG ACC AAC GAC CAA ACC GTT ACC GAC GTG CGC CAC AAA GAC CTG CGC CGC GCC CGC AGC GGC GTG GAA AAC ATG
 ATT CCG ACC AAA ACC GGC GCG GCA AAA GCC GTC GGT TTG GTA CTG CCC GAA TTG AAA GGC AGG CTC GAC GGG CTT GCC ATC
 CGC GTG CCG AC

De todos los posibles primers diseñados a través del programa de NCBI sólo fueron seleccionados los que cumplían los parámetros, estos se muestran en la siguiente tabla de una forma resumida, lo que es el Fw (Sentido) y el Rv (Antisentido), como ya se mencionó existen primers que su naturaleza es inestable y cuentan con alto nivel de auto complementariedad y fueron descartados durante el proceso de selección para pedir los primers, los primers

Nombre del primer	Fw	Rv
1.- <i>Edwarsiella tarda</i>	ACC GCT ACC CAG AAA ACC GTT G	ATC ATC CCG TCC TCT ACC GG
1.2.- <i>Edwarsiella tarda</i>	ACC GCT ACC CAG AAA ACC GTT G	T GTT GGC AAG GTT ATC CCG G
1.3.- <i>Edwarsiella tarda</i>	CC ACC GCT ACC CAG AAA ACC	GC AAG GTT ATC CCG GAA CTG A
2. <i>Naegleria gruberi</i>	ACC ACT GTC CAC GCT GTT AC	GCT AAG GCT GTC GGT TTG GT
3.- <i>Schistosoma mansoni</i>	C ACT GTG CAC TCA TTT ACG GC	ATT CCA GCT TCC ACT GGT GC
3.1.- <i>Schistosoma mansoni</i>	C CGT GGA GCG ATG CAA AAT A	TA ACG GGA ATG GCT TTC CGC
4. <i>Neisseria meningitidis</i>	AAC GAC CAA ACC GTT ACC GA	C GAA TTG AAA GGC AGG CTC G
4.1.- <i>Neisseria meningitidis</i>	CTG ACC AAC GAC CAA ACC GT	CC GAA TTG AAA GGC AGG CTC
4.2.- <i>Neisseria meningitidis</i>	G ACC AAC GAC CAA ACC GTT AC	GAA TTG AAA GGC AGG CTC GAC

Tabla 3. Tabla de primers diseñados utilizando el programa de NCBI. La tabla muestra el nombre del primer del lado derecho con su respectivo Fw (sentido) y Rv (antisentido).

9.3 identificación de proteínas de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. gruberi* por Western Blot

Se analizaron las proteínas de *Naegleria lovaniensis*, *Naegleria gruberi* y *Naegleria fowleri* en las membranas de nitrocelulosa para detectar cuales de ellas son reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de conejo y ratón. Tiras que fueron incubadas con anticuerpos específicos para la proteína GAPDH en distintas especies de *Naegleria*.

Particularmente en el Western blot para proteínas de mediano peso molecular (SDS-PAGE 16%) del extracto de *N. fowleri* se observó que la proteína de 37 kDa o en este caso 35 kDa coincide con el peso molecular que ha sido reportado en trabajos anteriores la presencia de dicha proteína, esta proteína estuvo presente tanto en la banda correspondiente para *Naegleria fowleri* como para *Naegleria lovaniensis* (banda 3 para *N. lovaniensis* y banda 7 para *N. fowleri*) siendo también recurrente la presencia de otras bandas como la de 18, 28, 75 y 100 kDa teniendo presencia en la bandas que fueron incubadas con ratones inmunizados al día 1, 7, 14 y 28, mostrando una gran marca en la banda de 19 kDa y 75 kDa, lo que sugiere que la respuesta inmune contra esta proteína es altamente específica.

Cabe mencionar que, aunque las otras especies también hayan mostrado reacción para la banda de 19, 28 y 35 kDa y no sean patógenas nos da indicio de que la proteína presente en estas amibas tiene cierta similitud a la de la amiba patógena, estas variación en el peso y en el reconocimiento de proteínas entre amibas del mismo género es lo que nos sugiere que la proteína GAPDH de la amiba *N. fowleri* puede variar en peso por procesos o modificaciones post – traduccionales que la dotan de esa capacidad virulenta en la amiba.

Por otro lado, las proteínas que fueron reconocidas en las bandas que fue sólo tratada para reconocer a la proteína GAPDH y reconocieron otras proteínas de más bajo y alto peso molecular entre cuales destacan 19, 28, 60, 65, 75, y 100 kDa sugiere que la GAPDH comparte estructura con otras proteínas lo cual podría ayudar al incremento de la protección al estar compartiendo regiones de epítomos altamente inmunogénicas.

Los resultados obtenidos del Western Blot con sueros de conejo y ratón muestran un amplio reconocimiento de proteínas inmunogénicas en las 3 especies de amibas, sin embargo es de llamar la atención como la proteína de 35 kDa está más presente en el grupo de *N. fowleri* siendo reconocida también en *N. lovaniensis*, aunque no se muestre en el grupo de incubado con suero de conejo (tira 1) este reconocimiento por anticuerpos en suero de ratón inmunizado en 4 ocasiones muestra el mayor reconocimiento de proteínas que han sido ya reconocidas por el sistema inmune del ratón, lo que nos habla de la especificidad que se podría tener contra este parásito.

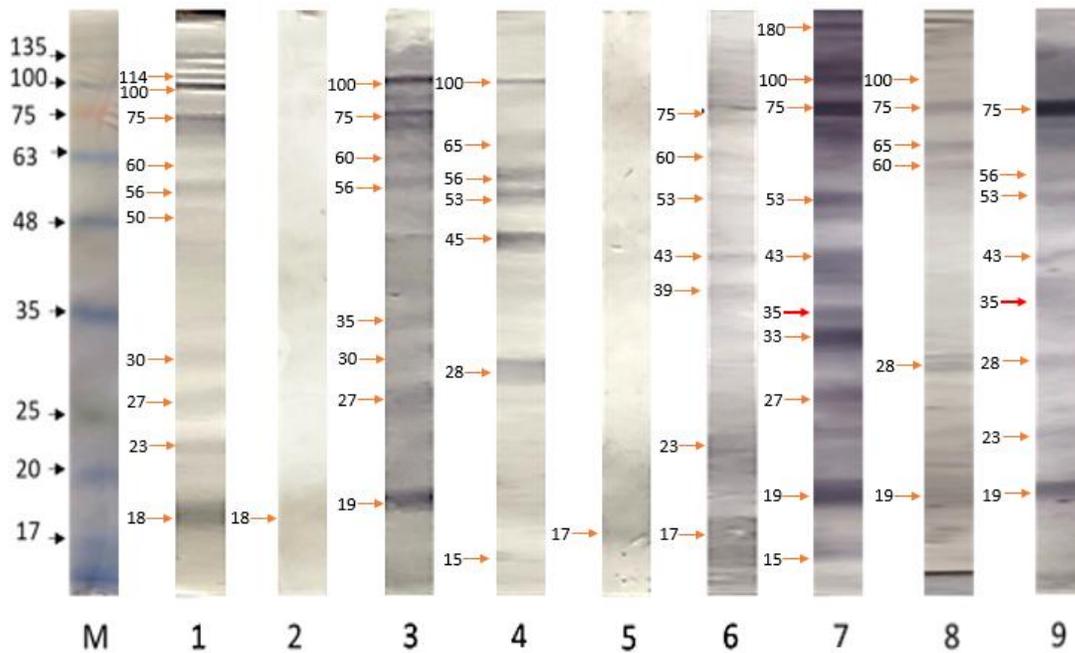


Figura 5. Identificación de proteínas para *N. lovaniensis*, *N. gruberi* y *N. fowleri*. Los grupos de tiras fueron seccionados en grupos de 3 por lo que las primeras tres tiras (1, 2 y 3) corresponden a *N. lovaniensis*, las siguientes 3 (4, 5 y 6) a *N. gruberi* y las últimas 3 (7, 8 y 9) a *N. fowleri*, cada grupo fue pre incubado con diferentes sueros siguiendo el mismo orden por grupos. Para las tiras 1, 4 y 7 se utilizó suero de conejo en dilución 1:1000. Para las tiras 2, 5 y 8 se incubó con GAPDH en el orden anteriormente mencionado, donde las bandas inmunorreactivas para GAPDH en la ameba *N. lovaniensis* (tira 2) fue la banda de 18 kDa, para la ameba *N. gruberi* (tira 5) la banda de 17 kDa y para *N. fowleri* las bandas de 19, 28, 60, 65, 75 y 100 kDa. Por último, las tiras 3, 6 y 9 fueron incubadas en suero de ratón (1:500) previamente inmunizados en 4 ocasiones en los días 1, 7, 14 y 21 con extractos totales de *N. fowleri*.

9.4 Secuencia identificadas en nucleótidos por espectrometría de masas

Algunas de las proteínas de *N. fowleri* comparten similitudes con otros microorganismos entre ellos se encuentran otras especies de *Naegleria*, estas regiones conservadas de la ameba nos brindaron un punto de comparación para poder identificar secuencias conservadas en *N. fowleri* mediante espectrometría de masas, aunque filogenéticamente *N. fowleri* tiene más cercanía a *N. lovaniensis* el molde o base que se tomó como punto de comparación fue la especie de *Naegleria gruberi*. Las proteínas se extrajeron manualmente de geles y se analizaron mediante técnica de espectrometría de masas. Se compararon con los péptidos teóricos de todas las proteínas reportadas tanto de *N. fowleri* como de *N. gruberi* de la base de datos UNIPROT dando como resultado varias secuencias que tienen similitud con *N. gruberi* ya que para *N. fowleri* hasta el momento sólo se han reportado 18 aminoácidos.

Naegleria fowleri posible identidad con *N. gruberi*

```

ATG GTC AAG GTA GGT ATT AAC GGT TTC GGT AGA ATT GGT AGA TTT GTT TTC CGT
GCT TCA TTG GAA AGA ACT GAT GTC GAA GTT GTT GCC ATT AAC GAT ATT ATG ATG
ACT CCA GAA TAC ATG ATC TAC ATG ATC AAG TAT GAT ACT GTC CAC GGT AAA TTC
CAT GGT AAG CTC GAA CAT ACT GAA AAG TCT ATC ATT GTC AAT GGT CGT GAA ATC
CAC GTT TTG TGT GAA AGA GAT CCT GAA CAA TTA CCA TGG GGA CAA CAC AAT GTT
GAA TAT GTT GTT GAA TCC ACT GGT ATT TTC ACC AAA TTG GAC TCT GCT GCC AAG
CAC TTG AAG GGT GGT GCT AAG AGA GTT GTT ATT TCT GCT CCT GCT GAT ACT CCA
ACA TTT GTT ATG GGT GTC AAT AAC CAT GAA TAT AAG CCA GAA ATG ACT GTC ATT
AAC AAT GCT TCT TGT ACT ACT AAC TGT TTG GCT CCA ATT GCT GCT GTT TTG CAC
GAA AAC TTT GGT ATT GTT GAA GGT TTG ATG ACC ACT GTC CAC GCT GTT ACT GCT
ACT CAA CCA ACT GTT GAT GCT CCA TCT AGA AAG GAT TGG AGA GGT GGT CGT GCT
GCT GGT TAC AAT ATC ATT CCA TCT TCA ACT GGT GCT GCT AAG TCT GTC GGT TTG
GTT ATT CCA TCA TTG AAT GGT AAA TTG ACT GGT ATT GCT TTC AGA GTT CCA ACT
GTT GAT GTT TCC GTT GTT GAT TTG ACT TGT AGA TTG GAA AAG CCA GCT ACT AAG
AAG CAA ATT GAT GAA GCT ATG AAG GCT GCT TCT GAA TCT GAA AGA TTC AAG GGT
ATT TTG AAG TTC ACT GAT GAA GAA GTT GTT TCT AGC GAT TTC GTC CAT GAT TCT
GCT TCA TCC ACT TAT GAT AGC AAG GCT TCA ATT TGT TTG AAT GAA CAC TTT GTT
AAG GTT GTT GCT TGG TAC GAT AAC GAA TGG GGT TAC TCT AAC AGA GTT TTG GAT
TTG ATC AAG TCT ACT GCT AAG ATC CAA TAA

```

Figura 6. secuencia de la proteína Gliceraldehído – 3 – Fosfato deshidrogenasa de la ameba *Naegleria gruberi* reportada en el NCBI. Las zonas subrayadas de la secuencia tienen similitud con la ameba *Naegleria fowleri* los codones **ACT** y **AGA** son los sitios de unión de la proteína, las diferentes zonas subrayadas están de diferente color sólo para indicar gráficamente donde se encuentran las diferentes secciones homologas con *N. fowleri*, de este modo el amarillo (■) indica una sección de nucleótidos, la sección verde (■) es otra sección, la gris (■), rosa (■) gris obscura (■) y azul (■) son diferentes secciones identificadas, y aunque se repitan secciones de amarillo y verde, son secciones independientes a las primeras, sólo se subrayó para identificar otra sección y sin que se perdiera la letra.

9.5 Identificación de la proteína GAPDH en aminoácidos en *Naegleria fowleri* por masas

Los resultados dados por la identificación de masas arrojaron secuencias de aminoácidos que fueron comparados con la secuencia completa de la proteína que codifica para el GAPDH de *N. gruberi* dada en nucleótidos (figura 6) y en esta figura se pueden ver las secciones en aminoácidos, encerrados en recuadros que corresponden a los colores de figura pasada, estos aminoácidos, aunque en apariencia son los mismo para ambas especies de *Naeglerias* tienen diferencias en algunos nucleótidos, estas secuencias de aminoácidos nos sirvió para poder hacer un diseño de primers más completo tendiendo mayor posibilidad de amplificar secuencias de la proteína en *N. fowleri*.

10	20	30	40	50
MVKIGINGFG	RIGRLVFRAS	LERTDVEVVA	INDIMMTPEY	MIYMIKYDTV
60	70	80	90	100
HGKFH GKLEH	TEK SIIVNGR	EIHVLCER DP	EQLPWGQHNV	EYVVESTGIF
110	120	130	140	150
TKLDSA AKHL	KGGAKRVVIS	APADTPTFVM	GVNNHEYKPE	MTVINNASCT
160	170	180	190	200
TNCLAPIAAV	LHENFGIVEG	LMTTVHAVTA	TQPTVDAPSR	KDWRGGR AAG
210	220	230	240	250
YNIIPSSTGA	AKAVGLVIPS	LNGKLTGMAF	RVPTVDVSV	DLTCRLEKPA
260	270	280	290	300
TKKQIDEAMK	AASESER FKG	ILKFTDEEVV	SSDFVHDSAS	STYDSKASIC
310	320	330		
LNEHFVK VVA	WYDNEWGYSN	RVLDLIK STA	KIQ	

Figura 6. Secuencia de GAPDH de los aminoácidos que codifican la secuencia de *Naegleria gruberi* reportados en NCBI. Las zonas en recuadros de colores han sido reportadas en *Naegleria fowleri* en la banda de 37 y 108 kDa, los colores están distribuidos según el marcaje que se les dio en la secuencia de *Naegleria gruberi* en aminoácidos (Figura. 5)

Como el genoma de *N. gruberi* se secuenció en 2010 (16), y debido a que *N. fowleri* y *N. gruberi* comparten sustancialmente más familias de genes que las de *N. fowleri* con las otras especies (16), las masas de péptidos se compararon con las masas peptídicas teóricas de todas las proteínas de ambas especies de *Naegleria* de la base de datos UNIPROT. Por lo tanto, se identificaron con éxito 32 proteínas para ambas especies, 18 masas peptídicas se emparejaron con el péptido teórico de *N. fowleri* y 15 péptidos no se emparejaron con *N. fowleri*, sin embargo, se encontró una coincidencia con *N. gruberi* (Tabla 4).

Band (kDa)	Uniprot Accession	Description	Species	mW (Da)	pI (pH)
37	ACT2_NAEFO	ATP synthase F1 subunit alpha	<i>N. fowleri</i>	41126	5.0698
	B5M6J9_NAEFO	Actin	<i>N. fowleri</i>	41698	5.0977
	M4H5H9_NAEFO	ATP synthase F1 subunit alpha	<i>N. fowleri</i>	61917	8.499
	Q25559_NAEFO	Ubiquitin	<i>N. fowleri</i>	13658	5.7847
	Q25561_NAEFO	Myosin II heavy chain	<i>N. fowleri</i>	87729	5.4126
	D2UXB7_NAEGR	Putative uncharacterized protein	<i>N. gruberi</i>	37129	5.0728
	D2VE39_NAEGR	Putative uncharacterized protein	<i>N. gruberi</i>	41849	4.8911
	D2VZJ8_NAEGR	Putative uncharacterized protein	<i>N. gruberi</i>	21849	5.3789
	D2VUS6_NAEGR	Conventional actin	<i>N. gruberi</i>	41669	5.2148
	D2W142_NAEGR	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	<i>N. gruberi</i>	36576	6.6548

Tabla 4. Comparación de espectrometría de masas de la banda de 37 y 108 kDa entre *N. fowleri* y *N. gruberi*. Se identificaron diez proteínas para la banda de 37 kDa, 5 para *N. fowleri* y 5 para *N. gruberi*. Mientras que para la banda de 108 kDa encontramos 20 proteínas, 12 correspondientes a *N. fowleri* y 8 a *N. gruberi*. Con respecto a *N. fowleri*, solo se encontró una proteína en las dos bandas, fue la cadena pesada de miosina II (Q25561_NAEFO) mientras que la actina (B5M6J9_NAEFO) y la subunidad alfa de la ATP sintasa F1 (M4H5H9_NAEFO) se encontraron en bandas correspondientes a un peso molecular de 37 kDa. Se identificó una proteína no caracterizada (D2UXB7_NAEGR) que se emparejó con *N. gruberi* en las dos bandas, mientras que solo se encontró una proteína de *N. gruberi*, gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa (D2W142_NAEGR) en las bandas de 37 y 108 kDa.

En cuanto al diseño de primers diseñados con las secuencias de aminoácidos que arrojo el MASAS teniendo como punto de comparación la secuencia de *N. gruberi*, se elaboraron cebadores para realizar PCR y RT/PCR para su posible amplificación obteniendo 8 pares de primers, 3 de ellos degenerados y 5 de ellos manteniendo la secuencia conservadas de *Naegleria gruberi*, que se muestran en la tabla 5:

Nombre del primer	Fw	Rv
GAPDH1	5' GTC AAT GGT CGT GAA ATC CAC G 3'	5' CCC CAT TCG TTA TCG TAC CA 3'
GAPDH1' (Degenerado)	5' RTY RRW GRW MRK RAA RTC MRY G 3'	5' CCC CAT TCR TTA TCG TAC CA 3'
GAPDH2	5' GGT AGA TTG GTT TTC CGT GC 3'	5' GGA ATA ACC AAA CCG ACA GC 3'
GAPDH2' (Degenerado)	5' GGW MGW TTR GTH TTY MGW GC 3'	5' GGW AWR ACY WWA CCD ACA GC 3'
GAPDH3	5' GCT GTC GGT TTG GTT ATT CC 3'	5' CCC CAT TCG TTA TCG TAC CA 3'
GAPDH3' (Degenerado)	5' GCT GTH GGT WWR GTY WTW CC 3'	5' CCC CAT TCR TTA TCG TAC CA 3'
GAPDH4	5' GGT AGA TTG GTT TTC CGT GCT 3'	5' AAT TGA AGC CTT GCT ATC ATA AGT GG 3'
GAPDH5	5' CTG ATG TCG AAG TTG TTG CCA 3'	5' TGA AGC AGA ATC ATG GAC GAA 3'

Tabla 5. Cuadro de primer diseñados con el programa BioEdit. Con la posibilidad de que alguno de estos primers pudiera cruzar con los nucleótidos que se encuentran en *N. fowleri* se diseñaron primers degenerados, utilizando secuencias de otros microorganismos que comparten regiones conservadas con *N. fowleri*, pero se mantiene aún a la perspectiva de modificaciones de la técnica para la amplificación del gen de GAPDH.

9.6 ARN de *N. fowleri* y producto de PCR

Los productos de PCR diseñados con los primers fueron corridos en una electroforesis. En general, pocos primers tuvieron resultado, sólo un par de primers amplificó, fue el primer basado en *N. gruberi*. Como ya se ha mencionado el hecho de que *N. fowleri* y *N. gruberi* sean muy cercanas entre si filogenéticamente hizo que la posibilidad de que productos de basados en esta amiba pudieran amplificar. Debido a que aun así las muestras de *N. fowleri* no amplificaron como se esperaba con el primer de *N. gruberi*, fue de gran interés observar que tanto se parecía el producto hecho en PCR comparado con el ARNt de *N. fowleri*, teniendo estos un peso molecular igual, pero mostrando una degradación en el pozo 3 producto de la PCR y posiblemente podrían ser nucleótidos que no se utilizaron durante la reacción.

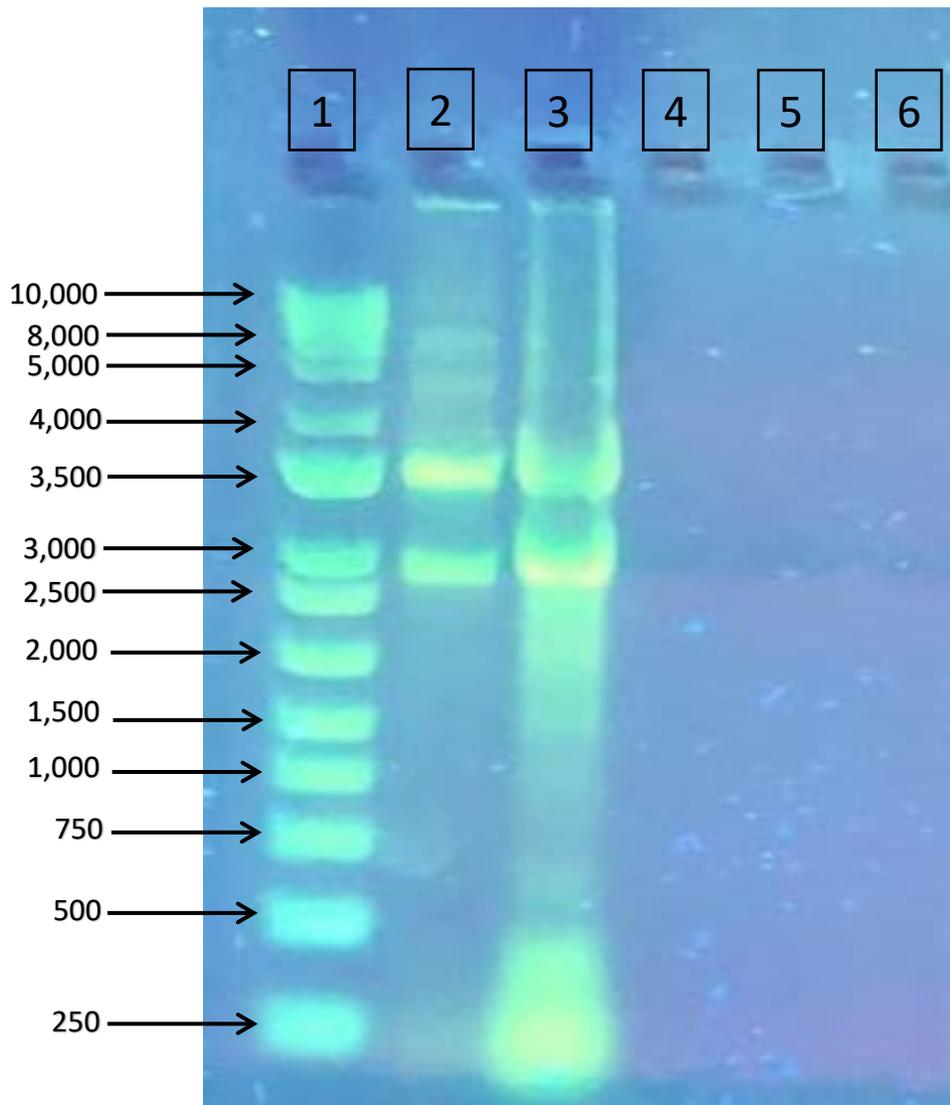


Figura 8. productos de PCR. Se corrió en el pozo 1 un marcador de la marca Thermo fisher que va desde las 250 pares de bases hasta las 10,000 pares de bases, en el pozo 2 se colocó ARN extraído de *Naegleria fowleri*, se elaboró con 1 μ l de ARN, 1 μ l de sentido, 1 μ l de antisentido, 12.5 μ l de KAPATaq ReadyMix y se llevó a 25 μ l con agua destilada y como se ve en la imagen no se mostró DNA genómico, pero si las 2 subunidades de los ribosomas, en el pozo 3 se corrió un producto de PCR con ARN de *Naegleria gruberi* en las mismas condiciones que el pozo 2 teniendo un volumen final de 25 μ l.

9.7 Inmunohistoquímica

Para determinar las zonas en donde se encuentra distribuida la proteína GAPDH en la amiba se procedió a realizar una inmunohistoquímica para hacer una inmunolocalización. La preparación de laminillas se hizo en diferentes grupos todos bajo las mismas condiciones para observar el mayor número de campos posibles y así determinar que fuera similar la distribución tanto de anticuerpo como de marcaje, para contrastar se tiñó de rojo a toda la amiba con un anticuerpo anti-N.f, el núcleo de la amiba de azul y de verde la marca de interés, que en este caso es un anticuerpo anti-GAPDH, se pudo observar que las amibas que mostraron marca para GAPDH tienen regiones en la cual se focaliza esta proteína, suelen estar cerca de los núcleos y esto podría deberse a la cercanía que tiene el núcleo con los ribosomas, productores de la proteína GAPDH, sin embargo el marcaje de la proteína se muestra distribuido en la superficie de la amiba, esto puede deberse a que esta proteína es constitutiva en la amiba, aunque se puede ver que la proteína puede ser movida a regiones similares a pseudópodos como se muestra en el recuadro de la figura 9 y que se desconoce que papel desempeñe esta proteína en estas prolongaciones citoplasmáticas.

Figura 9.

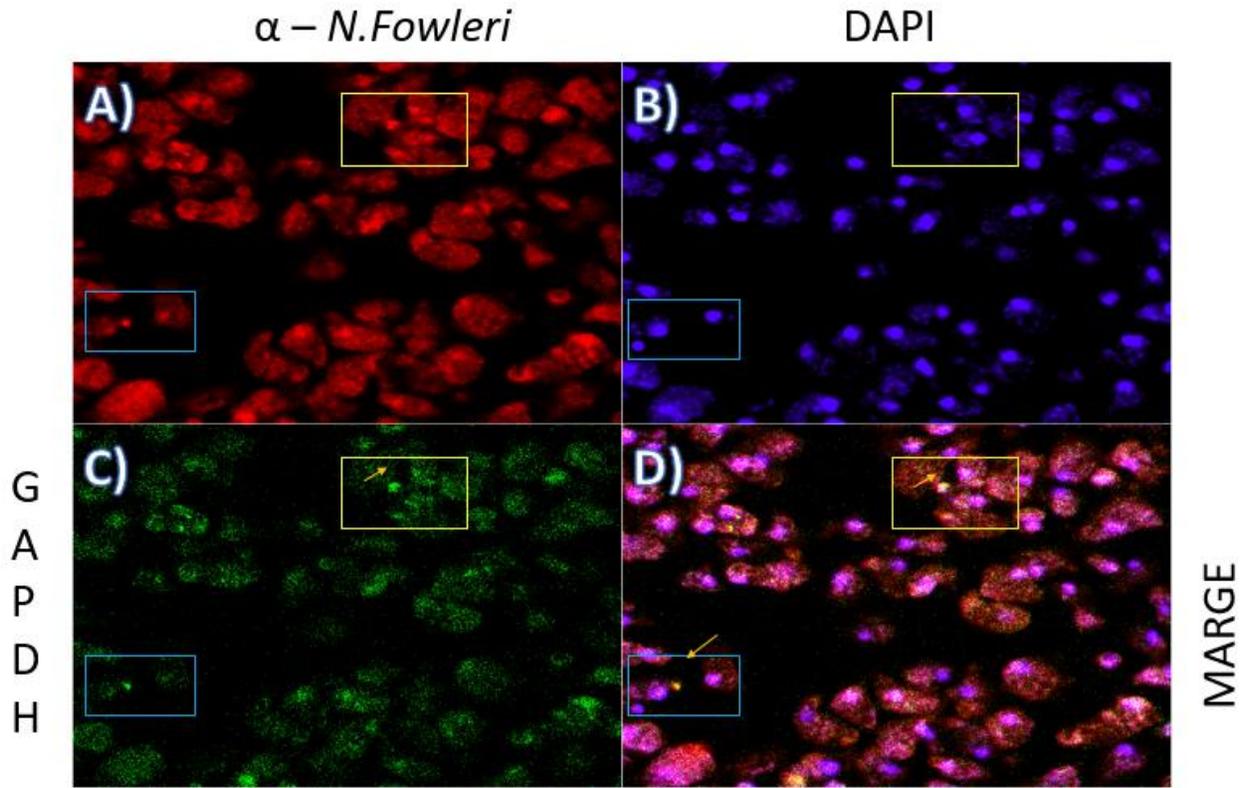


Figura 9. Inmunohistoquímica de *N. fowleri* y la proteína GAPDH. En el panel A) (Rojo) tenemos los anticuerpos anti conejo específicos para los anticuerpos que reconocen a *N. fowleri*. En el panel B) (Azul) se encuentra marcado el núcleo de las amibas con DAPI. En el panel C) (Verde) está en anticuerpo anti cabra que reconoce a la proteína GAPDH y en el panel D) (MARGE) tenemos la mezcla de los tres colores anteriores. Se muestra en el recuadro azul y amarillo las amibas que presentan mayor concentración y actividad de la proteína GAPDH, en el recuadro amarillo se ve la proteína más distribuida alrededor del núcleo de las amibas y en el recuadro azul se muestra una concentración más a la periferia, una posible proyección de esta proteína.

En esta inmunohistoquímica se le hizo un zoom a una amiba, en donde se puede apreciar mejor la distribución y marca que da la proteína GAPDH, en una imagen 3D se puede apreciar como las amibas presentan esta proteína alrededor de la membrana, aunque también se cuenta con presencia de la proteína en el interior de la amiba, de rojo se tiñó a la amiba completa con un anticuerpo fluorescente anti – N. f , en azul el núcleo de la amiba y en verde el marcaje a GAPDH.

Figura 10.

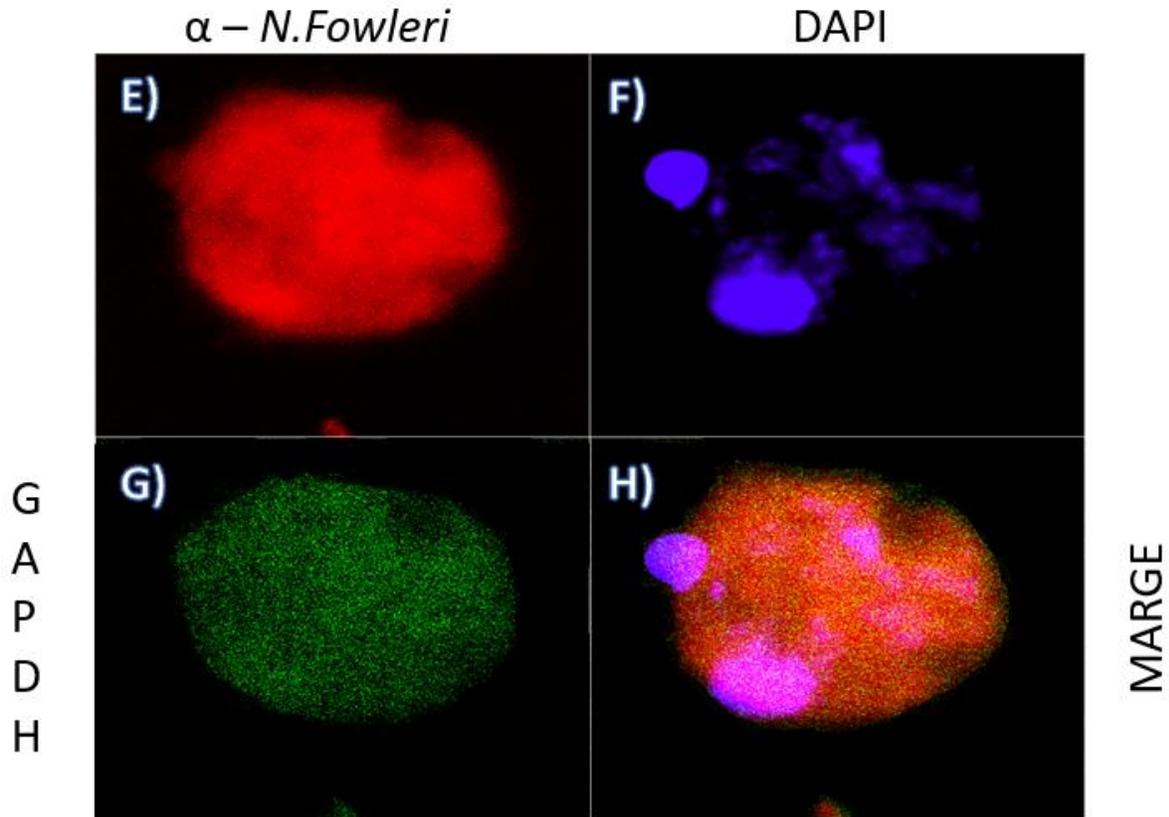


Figura 10. Inmunocitoquímica de *N. fowleri* y la proteína GAPDH. En el panel E) (Rojo) tenemos los anticuerpos anti conejo específicos para los anticuerpos que reconocen a *N. fowleri*. En el panel F) (Azul) se encuentra marcado el núcleo de las amibas con DAPI. En el panel G) (Verde) está en anticuerpo anti cabra que reconoce a la proteína GAPDH y en el panel H) (MARGE) tenemos la mezcla de los tres colores anteriores. Es una amiba aislada que muestra una actividad más uniforme de la proteína GAPDH en lo que podría ser toda la membrana y citoplasma, a diferencia de las muestras anteriores no se notan zonas específicas de esta proteína.

9.8 Sobrevida de ratones

La evaluación de la sobrevida en ratones infectados con amibas bloqueadas con anticuerpos anti – GAPDH a diferentes diluciones con la dosis letal de *N. fowleri* viva, se muestra en la figura 10. En el caso de los ratones que solamente fueron inmunizados con PBS y retados con *N. fowleri* , todos murieron en un periodo de 5 a 8 días después del reto (figura 11, triángulos negros), por otra parte los ratones que fueron retados con una dilución del anticuerpo de 1:100 murieron todos los ratone

en el día 14, alargando un poco más la vida de los ratones respecto al control (figura 11, cuadro rojo), con respecto a los ratones retados con una dilución de 1:250 sólo murieron tres ratones, en el día 8, 9 y 10 teniendo un 40% de sobrevivida (figura 11, círculo negro).

Figura 11.

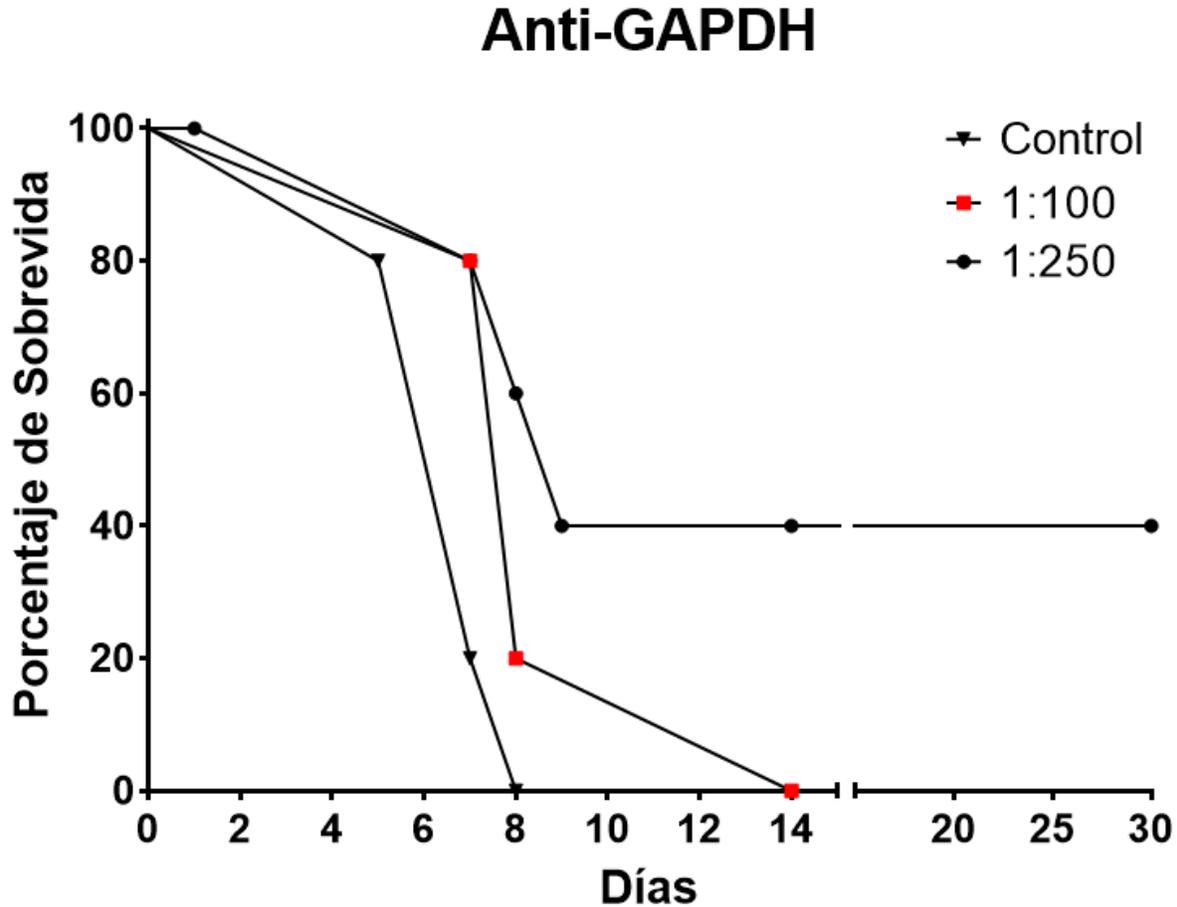


Figura 11. Grafica de sobrevivida en ratones con amibas pre-incubadas con anticuerpo anti – GAPDH.

Ratones infectados con trofozoítos pre – incubados con anticuerpos anti – GAPDH en diluciones 1:100 y 1:250, con n=5 control infectado con trofozoítos sin tratamiento, inoculo: 12,000 amibas aproximadamente. Las amibas fueron pre -- incubadas en periodos de 3 minutos para cada una de las diluciones y posteriormente fueron infectados los ratones. El grupo control (▼) tuvo una muerte total a los 8 días de ser infectados con los trofozoítos sin tratamiento, el grupo de 1:100 (■) murió por completo al día 14 después de ser retados con los trofozoítos pre -- incubados y el grupo 1:250 (●) mostro una sobrevivida del 40%, estos resultados se obtuvieron de dos experimentos a las mismas condiciones y obteniendo en ambos los mismo resultados.

10. Discusión

En el presente trabajo se realizó el diseño de primers para poder identificar la secuencia de nucleótidos que codifican a la proteína Gliceraldehído – 3 – Fosfato Deshidrogenasa en la ameba *Naegleria fowleri* teniendo como base y molde diferentes secuencias de GAPDH de microorganismos patógenos y no patógenos como las amebas *Naegleria gruberi*, y *Naegleria andersoni*, y como microorganismos patógenos están *Plasmodium falciparum*, *Neisseria meningitidis*, *Edwardsiella tarda*, *Onchocerca volvulus* y *Schistosoma mansoni* para dar un mosaico de mayor posibilidades que crucen con algún otro microorganismo patógeno que pudiera llegar a tener similitud con *N. fowleri* dando así un mayor margen de variabilidad entre organismos no patógenos y organismo patógenos. Estos organismos fueron seleccionados porque han sido reportados como patógenos para la vida humana y entre los mecanismos de infección expresan la proteína GAPDH como factor de virulencia (20, 23, 31, 32).

En la realización de los diseños de primers se observó que **1)** las regiones que codifican para la proteína GAPDH entre el género de *Naegleria* tiene un alto grado de conservación entre regiones independientemente si son cepas patógenas o no patógenas, como se observó en el trabajo realizado por Jung A. *et al* donde ellos observaron que las secuencias entre diferentes especies de *Enterococcus cecorum* tenían un alto grado de conservación en la secuenciación de ADN independientemente de la patogenicidad de las cepas, esto por la relación tan cercana que se tiene en la especie (31) **2)** La secuencia entre microorganismos patógenos que utilizan a la GAPDH como adhesina suelen tener regiones que coinciden entre ellas aun siendo microorganismos tan diferentes, esto nos ayudó para poder dar un poco de más idea acerca de la secuencia que tiene *N. fowleri*, utilizamos los microorganismos anteriormente reportados porque como se mencionó en los antecedentes, estos microorganismos son patógenos para el ser humano y expresan la proteína GAPDH que se ha reportó con funciones de adhesina en estos organismos patógenos (22-25, 33) **3)** Las variaciones presentes en la secuencia de GAPDH entre *N. gruberi*, *N. andersoni*, *N. lovaniensis* y *N. fowleri* aunque pueden llegar a ser sutiles hablando incluso de un par de nucleótidos o el acomodo de estos mismos posiblemente es lo que haga la diferencia entre una especie patógena y una no patógena. En diversos trabajos, con diferentes microorganismos se ha determinado que el GAPDH parece desempeñar un papel como proteína inmunogénica e

inmunoprotectora debido a que se ha observado como inhibiendo la producción de esta proteína en los microorganismos disminuye la adhesión y mortalidad de los grupos experimentales, al igual que al realizar western blots para la identificación de esta proteína es identificada por las IgG de suero, lo que nos habla de una gran exposición o de su producción por parte de los microorganismos que tienen contacto con el sistema inmune innato, el reconocimiento por estos anticuerpos nos indican que es un péptido importante dentro del reconocimiento de estos patógenos (33, 34). También se ha atribuido otras propiedades independientes a su actividad enzimática tales como la de una adhesina para algunos microorganismos patógenos los cuales se unen a través de la GAPDH a fibronectina, lisozima y proteínas del citoesqueleto (35).

Además, los nucleótidos que codifican para el aminoácido Trionina en *N. gruberi* en posición 179 de la secuencia reportada en la base de datos Uniprot han sido identificados como el sitio de unión a la proteína junto con el aminoácido 231 que codifica para Arginina, posiblemente los sitios de unión a proteína por parte de la secuencia de *N. fowleri* se encuentren cerca o en el margen de esas regiones de nucleótidos, estos aminoácidos suelen tener O – glicosilaciones lo que favorece la unión a proteína si en este caso la GAPDH estuviera siendo reconocida por una lectina de epitelio nasal, cabe mencionar también que los sitios de unión a proteína tanto en *N. gruberi* como en los demás microorganismos suelen tener los mismo aminoácidos Trionina y Arginina, con glicosilaciones al menos en uno de ambos casos, esto nos habla de la homología que pudiera llegar a tener *N. fowleri* con estas secuencias de nucleótidos y las regiones de los sitios de unión a proteína (36).

De forma que el presente trabajo sugiere como uno de los posibles factores de virulencia en la ameba *N. fowleri* ya que ha sido reportada en otros trabajos como adhesina y en trabajos del equipo de laboratorio ha mostrado tener un papel inmunogénico al momento de revelar proteínas en suero de ratones inmunizados, ya que la secuencia del Gliceraldehído – 3 – Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) de la ameba *Naegleria fowleri* no ha sido reportada en su totalidad, se trató de llegar a identificar la mayor parte posible de la proteína teniendo como base que la reactividad que tuvo en trabajos anteriores a este y presentes en este es compatible con *Naeglerias* de otras especies y eso motivo a tomar como molde la secuencia de la proteína *Naegleria gruberi* ya que como se plantea en este trabajo por espectrometría de masas comparte cierta homología la secuencia de la GAPDH de *N. gruberi* comparándola con *N. fowleri*, siendo también relevante mencionar que un

trabajo de Osornio Rojas J.L del año 2017 (trabajo aun no publicado) elaboro péptidos sintéticos tomando como base la estructura de la GAPDH de *Naegleria fowleri* en donde pudo demostrar el papel inmunológico que tiene este péptido en la amiba, pudo llegar a profundizar más acerca de la respuesta humoral y celular que monta el ratón que fue inmunizado con los péptidos basados en la banda de 37 kDa de la amiba *N. fowleri* llegando a tener una sobrevida del 40 y 60 % con los puros péptidos y al 80% con adyuvante (toxina del cólera).

Los primers diseñados a partir de secuencias de diferentes microorganismos por programas y con los parámetros establecidos para el diseño de primers demostraron reconocer la secuencia de sus microorganismos, lo que nos confirma que el proceso de diseño no fue erróneo sino por el contrario, faltó una gama más amplia de nucleótidos inmiscuidos en los primers para poder hacer la polimerización, en vista de que la variabilidad debía aumentar se diseñaron primers degenerados que hicieron aun un poco más grande la posibilidad de encontrar la secuencia, pero la pequeña variación de acomodo o de nucleótidos en la secuencia de los primer puede llegar a hacer esto más específico de lo que se esperaba, por lo que se mandó a reconocer partes de secuencia por espectrometría de masas revelando aún más fragmentos homólogos con *Naegleria gruberi* pero variaciones en ciertos nucleótidos y por ende en la codificación de aminoácidos, aunque mantienen muchas regiones conservadas ambas especies de *Naegleria* la espectrometría deo ver que existen variaciones y que hay partes de la proteína de 37 kDa que no son comparables con ningún microorganismos ya reportado, esto solo nos propone seguir intentado y seguir investigando acerca de cómo poder llegar a secuenciar la proteína de *N. fowleri*.

Algunas proteínas inmunogénicas encontradas para *N. fowleri* por técnica de Western Blot tradicional fueron la banda de 19, 28, 60, 65, 75 y 100 kDa con suero de conejo y de ratón inmunizado en 4 ocasiones, mostrando bandeo diferente al de *N. gruberi* y *N. lovaniensis* teniendo presencia de bandas que estas últimas mencionadas no presentaron, estas bandas reconocidas y con mayor inmunoreactividad para *N. fowleri* nos pueden indicar que hay partes de la proteína que estas reconociendo otras regiones que las proteínas de las especies no patógenas no son capaces de reconocer, aparte de que la intensidad de la marca nos podría sugerir una mayor producción de esta proteína por parte de *Naegleria fowleri*, lo que nos indicaría la importancia que tiene la producción de esta proteína para el patógeno independientemente de la función constitutiva que tiene en el ciclo de vida de la amiba sea parasitaria o no, como se observó en los experimentos

realizados por Kim J.H *et al* donde los genes expresados en *Naegleria fowleri* tienen una alta producción de proteínas de bajo peso molecular con potencial inmunológico, se observó que inhibiendo estos genes en la amiba al momento de infectar los ratones de experimentación les confería una mayor protección contra la amiba, lo que resultaba en menor producción de las proteínas y por ende de su virulencia (37).

En las Inmunohistoquímicas realizadas en *Naegleria fowleri* podemos observar el marcaje que da el anticuerpo α 37 kDa dejando ver que se encuentra en toda la amiba y puede llegar a focalizar esta proteína, mediante transporte a través de la membrana citoplasmática la amiba es capaz de “acomodar” la GAPDH en regiones parecidas a pseudópodos que puede estar utilizando para anclarse al momento de estar en contacto con células del epitelio nasal, en diferentes cortes hechos mediante confocal se puede observar en una imagen 3D como es que esta proteína aparte de estar en citoplasma se encuentra en la membrana de la amiba, y como he mencionado la concentración de esta proteína puede llegar a ser focalizada a diferentes zonas dependiendo de las necesidades de la amiba, mientras que en citoplasma parece ser que la mayor concentración se encuentra a un costado del núcleo, esto podría ser por la producción de esta proteína en los ribosomas y siendo el ARNm y ARNt los que salen del núcleo para entrar en el retículo endoplásmico podría ser que la concentración de esta proteína se encuentre más concentrada hacia esa zona por la producción de la misma.

11. Conclusión

Sin embargo, los intentos por llegar a tener un producto de PCR con los primers diseñados para la proteína GAPDH parecen seguir sin resultados, esto nos sugiere que aunque cuenta con cierta homología la secuencia de *Naegleria fowleri* con la amiba *Naegleria gruberi* debe de haber variaciones en los nucleótidos de la amiba que aunque se integraron otros microorganismos para llegar a tener un mayor rango de posibilidades estos no llegaron a reconocer la secuencia para la polimerización de las hebras de ADN por PCR, estas variaciones que presentan las diferentes especies de *Naegleria* entre no patógenas y patógenas pueden ser las que doten de esta capacidad virulenta y diferencien una de otra. Por otra parte, las secuencias de aminoácidos identificados por espectrometría de masas nos revelo más piezas del rompecabezas de la proteína GAPDH de *N. fowleri* aunque no se cuente con toda la secuencia codificada, nos sirven como una buena base para poder seguir experimentando y llegar a desarrollar cebadores que logren polimerizar en la PCR y brindarnos más información acerca de esta proteína, los aminoácidos entre *N. fowleri* y *N. gruberi* en apariencia sugieren ser los mismos en una secuencia de nucleótidos, sin embargo también gracias a los primeros 18 aminoácidos reportados en la base de datos Uniprot nos podemos dar cuenta que aunque sean los mismo aminoácidos la secuencia de nucleótidos puede ser diferente, la brecha que nos deja esta identificación de aminoácidos por espectrometría de masas nos brinda con mayor precisión la posible secuencia de nucleótidos por parte de *N. fowleri*. Parte de esta investigación también fue el ver si dicha proteína tenía papel en la adhesión de la amiba y si era un factor de virulencia, teniendo como resultado un western blot que nos deja claro que esta proteína es inmunogénica, es reconocida por las IgG de suero de animales que fueron inmunizados con extracto total de *N. fowleri* presentando diferentes bandas a diferentes pesos molecular lo que nos deja ver como esta proteína tiene diferentes regiones identificadas por los anticuerpos esto dado la estructura de la proteína, su forma en el espacio le permite quizá tener mejor contacto para ayudar en la adhesión de la amiba lo que también deja tener varias regiones de contacto y reconocimiento por parte de las células presentadoras de antígenos y por ende de anticuerpos que son capaces de opsonizar diferentes regiones de esta proteína; como se mostró en la inmunohistoquímica la proteína se encuentra por toda la superficie de la amiba de manera uniforme, lo que podría sugerir que es una proteína que se encuentra de manera transmembranal en la amiba y que a su vez esta es capaz de moverla a través de la membrana citoplasmática

concentrándola en estructuras parecidas a seudópodos, estos datos son respaldados por la sobrevivencia de los ratones que fueron infectados con amibas que fueron pre – incubadas con anticuerpos α 37 kDa llegando a tener una sobrevivencia de hasta el 40% lo que aunado a la investigación de Osornio-Rojas que nos mostraba una sobrevivencia del 80% infectando con péptidos sintéticos de GAPDH adyuvado con toxina del cólera, lo que sin duda alguna de su implicación en la virulencia de la amiba.

11. Bibliografía

1. Cerva L, Zimak V, Novak K. Amoebic meningoencephalitis: a new amoeba isolate. *Science*. 1969;163(3867):575-6.
2. Haugen P, De Jonckheere JF, Johansen S. Characterization of the self-splicing products of two complex *Naegleria* LSU rDNA group I introns containing homing endonuclease genes. *Eur J Biochem*. 2002;269(6):1641-9.
3. Benenson AS. The control of cholera. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1971;47(10):1204-10.
4. Bonilla-Palomas JL, Gamez-Lopez AL, Moreno-Conde M, Lopez-Ibanez MC, Anguita-Sanchez M, Gallego de la Sacristana A, et al. Hypoalbuminemia in acute heart failure patients: causes and its impact on hospital and long-term mortality. *J Card Fail*. 2014;20(5):350-8.
5. Rivera F, Roy-Ocotla G, Rosas I, Ramirez E, Bonilla P, Lares F. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ Res*. 1987;42(1):149-54.
6. Dominguez JA, Corella EL, Auro A. Oral papillomatosis in two laboratory rabbits in Mexico. *Lab Anim Sci*. 1981;31(1):71-3.
7. Lares-Villa F, De Jonckheere JF, De Moura H, Rechi-Iruretagoyena A, Ferreira-Guerrero E, Fernandez-Quintanilla G, et al. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *J Clin Microbiol*. 1993;31(3):685-8.
8. Jadin JB. [Primary amebic meningo-encephalitis and the pathogenicity of water-borne amoebas]. *Bull Acad R Med Belg*. 1974;129(6-7):439-66.
9. Butt CG. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med*. 1966;274(26):1473-6.
10. Martinez-Castillo M, Cardenas-Zuniga R, Coronado-Velazquez D, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J Med Microbiol*. 2016;65(9):885-96.
11. Cerva L, Novak K, Culbertson CG. An outbreak of acute, fatal amebic meningoencephalitis. *Am J Epidemiol*. 1968;88(3):436-44.
12. Yousuf FA, Siddiqui R, Subhani F, Khan NA. Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. *Journal of water and health*. 2013;11(2):371-5.
13. Martinez AJ, Visvesvara GS. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. *Clin Lab Med*. 1991;11(4):861-72.

14. McNamara KK, Kernig ML, Kreuter KS, Kalmar JR, Allen CM. Clinical-pathological conference: case 4. *Head Neck Pathol.* 2010;4(3):230-3.
15. Herman EK, Greninger AL, Visvesvara GS, Marciano-Cabral F, Dacks JB, Chiu CY. The mitochondrial genome and a 60-kb nuclear DNA segment from *Naegleria fowleri*, the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis. *J Eukaryot Microbiol.* 2013;60(2):179-91.
16. Zysset-Burri DC, Muller N, Beuret C, Heller M, Schurch N, Gottstein B, et al. Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC Genomics.* 2014;15:496.
17. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *The New England journal of medicine.* 2014;371(12):1170.
18. Cha SJ, Kim MS, Pandey A, Jacobs-Lorena M. Identification of GAPDH on the surface of *Plasmodium* sporozoites as a new candidate for targeting malaria liver invasion. *J Exp Med.* 2016;213(10):2099-112.
19. Argiro L, Henri S, Dessein H, Kouriba B, Dessein AJ, Bourgois A. Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorption with GM-CSF on alum. *Vaccine.* 2000;18(19):2033-8.
20. Wagener J, Schneider JJ, Baxmann S, Kalbacher H, Borelli C, Nuding S, et al. A peptide derived from the highly conserved protein GAPDH is involved in tissue protection by different antifungal strategies and epithelial immunomodulation. *J Invest Dermatol.* 2013;133(1):144-53.
21. Pancholi V, Fischetti VA. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med.* 1992;176(2):415-26.
22. Jin H, Song YP, Boel G, Kochar J, Pancholi V. Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J Mol Biol.* 2005;350(1):27-41.
23. Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 2006;74(1):382-9.
24. Tunio SA, Oldfield NJ, Ala'Aldeen DA, Wooldridge KG, Turner DP. The role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GapA-1) in *Neisseria meningitidis* adherence to human cells. *BMC Microbiol.* 2010;10:280.

25. Erttmann KD, Kleensang A, Schneider E, Hammerschmidt S, Buttner DW, Gallin M. Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH). *Biochim Biophys Acta*. 2005;1741(1-2):85-94.
26. Argiro LL, Kohlstadt SS, Henri SS, Dessein HH, Matabiau VV, Paris PP, et al. Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa *Schistosoma mansoni* GAPDH. *Vaccine*. 2000;18(19):2039-48.
27. Rojas-Hernandez S, Jarillo-Luna A, Rodriguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitology research*. 2004;94(1):31-6.
28. Carrasco-Yepey M, Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Terrazas LI, Moreno-Fierros L. Protection against *Naegleria fowleri* infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response. *Parasite Immunol*. 2010;32(9-10):664-70.
29. Jarillo-Luna A, Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R, Rodriguez-Monroy MA, Lara-Padilla E, Rojas-Hernandez S. Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite immunology*. 2008;30(1):31-8.
30. Carrasco-Yepey M, Campos-Rodriguez R, Lopez-Reyes I, Bonilla-Lemus P, Rodriguez-Cortes AY, Contis-Montes de Oca A, et al. Intranasal coadministration of Cholera toxin with amoeba lysates modulates the secretion of IgA and IgG antibodies, production of cytokines and expression of pIgR in the nasal cavity of mice in the model of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Experimental parasitology*. 2014;145 Suppl:S84-92.
31. Jung A, Metzner M, Ryll M. Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):33.
32. Rojas L, Moran P, Valadez A, Gomez A, Gonzalez E, Hernandez E, et al. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in Mexican school children: genotyping and phylogenetic relationship. *BMC Infect Dis*. 2016;16:485.
33. Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, Oshima S. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine*. 2004;22(25-26):3411-8.
34. Tallima H, Montash M, Veprek P, Velek J, Jezek J, El Ridi R. Differences in immunogenicity and vaccine potential of peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Vaccine*. 2003;21(23):3290-300.
35. Pancholi V, Chhatwal GS. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2003;293(6):391-401.

36. Machado ATP, Silva M, Iulek J. Expression, purification, enzymatic characterization and crystallization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Naegleria gruberi*, the first one from phylum Percolozoa. *Protein Expr Purif.* 2016;127:125-30.

ANEXO I

Primers Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. De este paso depende el éxito en el laboratorio. En la tabla 5 se muestran los criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers.

Tabla 5. Criterios principales

Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C
Temperaturas de fusión (T_m)	50-65 °C
contenido GC	40-60%
auto-complementariedad	Debe ser evitada Para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
Similaridad	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

Cuando el objetivo a amplificar es un locus, la posición de los iniciadores debe ser relativa a los codones de inicio y terminación. Es recomendable que el cebador "forward" se encuentre más o menos a 35 pb del inicio de la secuencia que codifica, de la misma forma el cebador "reverse" debe localizarse 35 pb después de la región que codifica.

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μ M. Altas concentraciones de primer pueden promover "mispriming" y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado.