



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA AUTOFÁGICA ATG16L1 EN UN
PROCESO DE NEUROINFLAMACIÓN INFECCIOSA INDUCIDA POR
Naegleria fowleri.”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A:

ARELI ALAVEZ FRANCISCO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Luis Reyes Hernández



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por la formación académica y cultural que hasta el día de hoy me ha brindado, sin duda me llevo grandes recuerdos de los años en los que la UNAM se convirtió en mi segundo hogar.

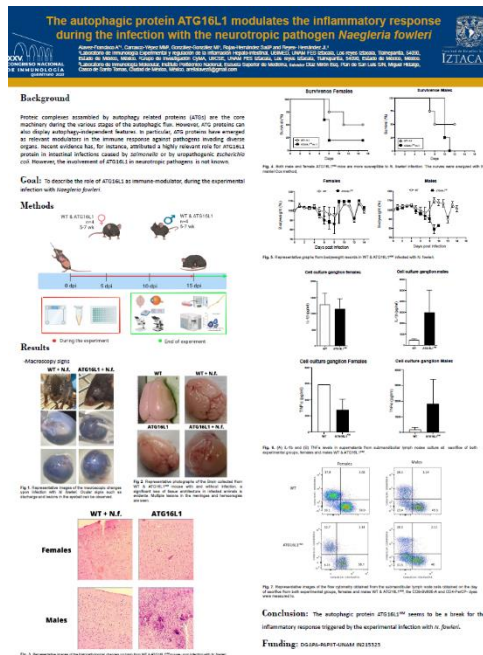
Agradezco a la MVZ María Leticia Flores por el apoyo en el mantenimiento de las colonias de ratones de experimentación para la realización de este proyecto.

Agradezco al Doctor José Luis por aceptarme en el laboratorio, a la Bióloga Marisol Hernández por el trabajo como Técnico de laboratorio, a la Doctora Alicia Vázquez por el tiempo y observaciones mostradas hacia este proyecto de investigación.

Agradezco a la Doctora Maricela Yépez por el tiempo prestado para realizar la infección y por la guía que nos dio durante el proyecto.

Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (PAPPIT) IN215323.

Los avances de este proyecto se presentaron en el XXV Congreso Nacional De Inmunología Querétaro 2023.



DEDICATORIA

Este logro se los dedico a mis padres Leticia y Salvador, gracias por cada uno de los momentos en los que han estado apoyándome, sin ustedes el día de hoy no podría estar terminando esta etapa que día con día nos ha dado miles de risas y preocupaciones. Pero aún más quiero agradecerles por cada palabra de aliento, consejo y regaño que me han brindado durante mi vida, todo esto como parte de mi formación y que ha sido fundamental para que me realice como persona, ustedes son las personas a las que más admiro y respeto.

A mi hermana Dafne, mi pulga humana, que ha sido el pilar fundamental de mi vida durante largos años, sin duda alguna no podría vivir sin ti, cada pequeña plática, risas, travesuras, llanto, pelea y un sinfín de emociones que hemos vivido, no las podría cambiar por nada. Hoy es un placer poder decirte gracias por todo esto y más, por ser esa persona que jamás me ha dejado que decaiga por más difícil que la situación sea, sin ti no habría logrado llegar a este punto, recuerda que pase lo que pase siempre seremos tú y yo contra el mundo.

A mi mejor amigo Alex, después de muchos años de conocernos con un sinfín de historias, espero que siempre mantengamos esta bonita y única amistad, cada momento que he compartido a tu lado lo guardo en mi memoria y siempre desearé seguir creando recuerdos contigo.

A mis amigas Naomi, Diana y Meztli, me alegra que sean parte de este momento que planeamos durante mucho tiempo, quiero agradecerles por ese primer instante en el que decidieron incluirme ya que eso conformó esta sólida amistad y por todo lo que me han brindado durante y después de nuestra licenciatura, todas esas prácticas de campo en las que nunca faltaron las caídas y por supuesto las risas, todas las noches de desvelo, las comidas juntas, las fiestas, confidencias, noches de películas y series, todos estos momentos hicieron que amara aún más la carrera y la vida, cada una tiene un lugar especial en mi corazón.

A mis abuelitos, porque ustedes han sido un impulso día con día para llevar a término este trabajo, han sido fuente de inspiración, desearía que todos estuvieran conmigo en este momento para poder compartir este logro con ustedes.

Al Doctor José Luis Reyes Hernández por haberme aceptado en su equipo de trabajo, por ser un tutor excepcional, que siempre ha logrado guiarme y saber responder a cada una de las inquietudes que le he comentado, gracias por la formación académica que me ha brindado, por haber confiado en mí desde un inicio y mantenerse en esta postura hasta el día de hoy, agradezco su paciencia, empatía, respeto y la responsabilidad y constancia que ha mostrado con este proyecto y con cada uno de nosotros, por siempre impulsarme a realizar tareas que en determinado momento me parecían difíciles. Gracias por el ambiente de cooperación y amistad que siempre ha creado en el laboratorio 18 y por los momentos de recreación que hemos compartido durante estos 2 años.

A la Bióloga Marisol Hernández por la asesoría que me brindó desde el primer día que llegue al laboratorio, por ayudarme siempre en mis momentos de crisis académicas y por todas las palabras de aliento académico que me ha brindado, sobre todo el que siempre confíe en mí misma.

A todos mis compañeros de laboratorio que han estado presentes durante estos años y me han brindado apoyo moral y físico durante todo el trabajo experimental.

A aquellas personas que han sido parte de mi vida y me han enriquecido con conocimiento académico, cultural o amistad.

Y a mí, por nunca haberme rendido a pesar de las adversidades que se me presentaron a lo largo de estos caóticos años y para la futura investigadora que espero ser.

“Todos nuestros sueños pueden hacerse realidad si tenemos el coraje de perseguirlos.” - Walt Disney

*Nada en la vida es para ser temido
es solo para ser comprendido.
Ahora es el momento de entender más,
de modo que podamos temer menos.
-Marie Curie*

ÍNDICE

1.- RESUMEN	11
1.1 Abstract.....	12
2.- INTRODUCCIÓN	13
2.1 Autofagia.....	14
2.2 Proteína ATG16L1.....	14
2.3 Papel de ATG16L1 en la respuesta inflamatoria.....	15
2.4 <i>Naegleria fowleri</i>	16
2.5 Ciclo de vida de <i>N.fowleri</i>	17
2.6 Epidemiología de <i>N.fowleri</i>	19
2.7 Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP).....	20
2.8 Formas de Infección.....	22
2.9 Respuesta inmune en la MAP.....	23
3.- ANTECEDENTES	26
4.- JUSTIFICACIÓN	27
5.- HIPÓTESIS	27
6.- OBJETIVOS	27
6.1 Objetivo general.....	27
6.2 Objetivos particulares.....	27
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	28
7.1 Animales de experimentación.....	28
7.2 Genotipo.....	28
7.3 Infección con <i>N. fowleri</i>	29
7.4 Análisis histológicos.....	30
7.5 Extracción de suero de sangre.....	30
7.6 Cultivo de células totales de nódulos submandibulares.....	31
7.7 ELISA.....	31
7.8 Citometría de flujo.....	32
7.9 Análisis estadístico.....	32
8.- RESULTADOS	33
8.1 Genotipo.....	33

8.2 Sobrevida.....	34
8.3 Monitoreo del peso.....	35
8.4 Análisis macroscópicos.....	36
8.4.1 Manifestaciones de daño en órganos.....	36
8.4.1.1 Presencia de Esplenomegalia.....	38
8.4.1.2 Daño en diversos órganos.....	39
8.4.1.3 Daño en colon.....	40
8.4.2 Lesiones en cerebro.....	41
8.4.2.1 Peso cerebral.....	42
8.4.3 Lesiones en ojos.....	43
8.4.3.1 Longitud axial del globo ocular.....	44
8.5 Análisis microscópicos.....	45
8.5.1 Cambios histopatológicos en cerebro.....	45
8.6 Hematocrito.....	47
8.7 Cuantificación celular en bazo y ganglio.....	48
8.7.1 Ganglio submandibular.....	48
8.7.2 Bazo.....	49
8.8 Cuantificación de interleucinas.....	50
8.8.1 Cuantificación de interleucinas en suero sanguíneo.....	50
8.8.1.1 IL-13.....	50
8.8.1.2 IL-1 β	51
8.8.1.3 TNF- α	52
8.8.2 Cuantificación de interleucinas en cultivo de ganglio.....	53
8.8.2.1 IL-4.....	53
8.8.2.2 IL-13.....	54
8.8.2.3 IL-1 β	55
8.8.2.4 TNF- α	56
8.8.3 Cuantificación de interleucinas en bazo.....	57
8.8.3.1 TNF- α	57
8.9 Citometría de flujo.....	58
8.9.1 Análisis de poblaciones celulares de Ganglio.....	58

8.9.2 Análisis de poblaciones celulares de bazo.....	59
9.- DISCUSIÓN.....	60
10.- CONCLUSIÓN.....	61
11.- ANEXOS.....	62
12.- REFERENCIAS.....	64
12.1 Bibliografía citada.....	64
12.2 Bibliografía consultada.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Conformación de ATG16L1.....	14
Figura 2 Cambio en los intrones e inserción de la trmapa génica.....	15
Figura 3 Estadios de <i>N. fowleri</i>	18
Figura 4 Ciclo de vida de <i>N. fowleri</i>	18
Figura 5 Mapa de casos reportados 2011.....	19
Figura 6 Casos reportados al 2018.....	20
Figura 7 Mecanismos de infección de <i>N. fowleri</i>	23
Figura 8 Esquema de forma de infección de <i>N. fowleri</i>	25
Figura 9 Primers de PCR.....	28
Figura 10 Fotografía del gel de agarosa.....	33
Figura 11 Graficas de sobrevida.....	34
Figura 12 Graficas de peso.....	35
Figura 13 Manifestaciones oculares.....	36
Figura 14 Fotografías de bazo.....	38
Figura 15 Daño anatómico en hígado.....	39
Figura 16 Daño en colon.....	40
Figura 17 Fotografías de cerebro.....	41
Figura 18 Graficas de peso cerebral.....	42
Figura 19 Fotografías del ojo.....	43
Figura 20 Gráficas de longitud axial.....	44
Figura 21 Cambios histopatológicos en cerebro.....	45
Figura 22 Gráficas de hematocrito.....	47
Figura 23 Gráficas de células totales en ganglio.....	48
Figura 24 Gráficas de células totales en bazo.....	49
Figura 25 Gráficas de niveles de IL-13 en suero.....	50
Figura 26 Gráfica de niveles de IL-1 β en suero.....	51
Figura 27 Gráfica de niveles de TNF- α en suero.....	52
Figura 28 Gráfica de niveles de IL-4 en cultivo de ganglio.....	53
Figura 29 Grafica de niveles de IL-13 en cultivo en ganglio.....	54

Figura 30	Gráfica de niveles de IL-1 β en cultivo de ganglio.....	55
Figura 31	Gráfica de niveles de TNF- α en cultivo de ganglio.....	56
Figura 32	Gráfica de niveles de TNF- α en cultivo de bazo.....	57
Figura 33	Citometría de flujo de Ganglio.....	58
Figura 34	Citometría de flujo de Bazo.....	59

ABREVIATURAS

AmB-Anfotericina B

ATG16L1^{HM}- Ratones hipomórficos de ATG16L1

ATGs- proteínas asociadas a autofagia (del inglés autophagy-related proteins)

EAE-Encefalitis Autoinmune Experimental

IL- interleucina

IFN-interferón

LCR-Líquido cefalorraquídeo

MAP- Meningoencefalitis amibiana primaria

MAC- Complejo de ataque de la membrana lítica

MHC-complejo principal de histocompatibilidad (del inglés major histocompatibility complex)

mL-mililitro

N.f.- *Naegleria fowleri*

pg- picogramos

PRRs-Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés pattern-recognition receptors)

ROS- Especies Reactivas de Oxígeno

TLRs- Receptores tipo toll (del inglés toll-like receptors)

WT- ratones silvestres (del inglés wild type)

1.- RESUMEN

Los complejos proteicos ensamblados por proteínas relacionadas con la autofagia (ATG) son la maquinaria central durante las diversas etapas del flujo autofágico. Sin embargo, las proteínas ATG también pueden realizar funciones independientes de la autofagia. En particular, las proteínas ATG han surgido como moduladores relevantes en la respuesta inmune contra patógenos que invaden diversos órganos. La evidencia reciente, por ejemplo, ha atribuido un papel muy relevante a la proteína ATG16L1 en las infecciones causadas por *Salmonella* o por *Escherichia coli* uropatógena. Sin embargo, se desconoce la participación de ATG16L1 en patógenos neurotrópicos. Mediante una infección in vivo vía nasal con 6000 trofozoitos en ratones hipomórficos para ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) se determinó que los ratones, ATG16L1^{HM} de ambos sexos sobreviven en menor porcentaje y presentan mayor daño histopatológico e infiltrado celular en las muestras de cerebro. En cuanto a la cuantificación de citocinas, los ratones más susceptibles mostraron altos niveles de TNF α e IL-1 β en suero sanguíneo, y órganos linfoides secundarios. Además, cuando se analizaron las poblaciones de linfocitos T en los nódulos drenantes, los ratones ATG16L1^{HM} presentaron un menor porcentaje de estas células, sugiriendo que están siendo atraídas al sistema nervioso central. En resumen, la presencia de la proteína ATG16L1 se asocia con una menor respuesta inflamatoria que permite la sobrevivencia del hospedero.

1.1 Abstract

Proteic complexes assembled by autophagy related proteins (ATGs) are the core machinery during the various stages of the autophagic flux. However, ATG proteins can also display autophagy-independent features. In particular, ATG proteins have emerged as relevant modulators in the immune response against pathogens invading diverse organs. Recent evidence has, for instance, attributed a highly relevant role for ATG16L1 protein in intestinal infections caused by *Salmonella* or by uropathogenic *Escherichia coli*. However, the involvement of ATG16L1 in neurotropic pathogens is unknown.

Through an in vivo nasal infection with 6000 trophozoites in hypomorphic mice for ATG16L1 (ATG16L1^{HM}), it was determined that ATG16L1^{HM} mice of both sexes survived in a lower percentage and presented greater histopathological damage and cellular infiltration in brain samples. Regarding the quantification of cytokines, the most susceptible mice showed high levels of TNF α and IL-1 β in blood serum, and secondary lymphoid organs. In addition, when the populations of T lymphocytes in the draining nodules were analyzed, the ATG16L1^{HM} mice presented a lower percentage of these cells, suggesting that they are being attracted to the central nervous system. In summary, the presence of the ATG16L1 protein is associated with a lower inflammatory response that allows the survival of the host.

2.- INTRODUCCIÓN

La autofagia es un proceso molecular que lleva a la degradación y el reciclaje de proteínas mal plegadas, orgánulos dañados, eliminación de patógenos y en la respuesta inflamatoria, todo esto a través de la formación de un autofagosoma, lo descrito anteriormente funge como respuesta inmune innata contra diferentes organismos patógenos, sin embargo, son escasos los estudios en los que se aborda la función y participación de las proteínas autofágicas en la eliminación de patógenos (xenofagia), en concreto en la proteína ATG16L1.

Los estudios existentes de esta proteína están en el contexto de la autoinmunidad, pero se desconoce como participa en un proceso infeccioso del sistema nervioso central, por lo que describimos el papel que tiene en la infección por *Naegleria fowleri*.

N. fowleri es una ameba de vida libre que se distribuye mundialmente, se le encuentra en aguas estáticas en forma de trofozoíto y en los sedimentos en forma de quiste, su importancia radica en su relevancia patológica ya que causa la Meningoencefalitis Amebiana Primaria afectando al SNC, esta ameba tiene una tasa de muerte de alrededor del 97% con un periodo de defunción de 9-15 días después de la infección.

2.1 Autofagia

La homeostasis celular depende de diferentes vías celulares, una de ellas es la autofagia, esta se define como una vía de degradación en la que la membrana tiene reordenamientos para englobar patógenos, moléculas dañadas o proteínas mal plegadas, estas son enviadas al lisosoma en donde el material será degradado. (Hamaoui, D. y Subtil, A., 2021)

Los genes relacionados a la autofagia se describieron por primera vez en levaduras durante la década de los 90', se han encontrado 15 genes básicos necesarios para la formación del autofagosoma entre los que se encuentra ATG16 (Xiong, Q., *et. al.*, 2018).

2.2 Proteína ATG16L1

La proteína ATG16 está presente en todas las especies eucariotas, esta proteína es necesaria para la formación de un conjugado de ATG12 y ATG5 (este conjugado formará una estructura preautofagosómica), ATG16 se compone de la unión a ATG5 seguido de un dominio carboxil terminal y un dominio formado por siete repeticiones WD40 formando una hélice β (Mizushima, N., *et. al.*, 2003)

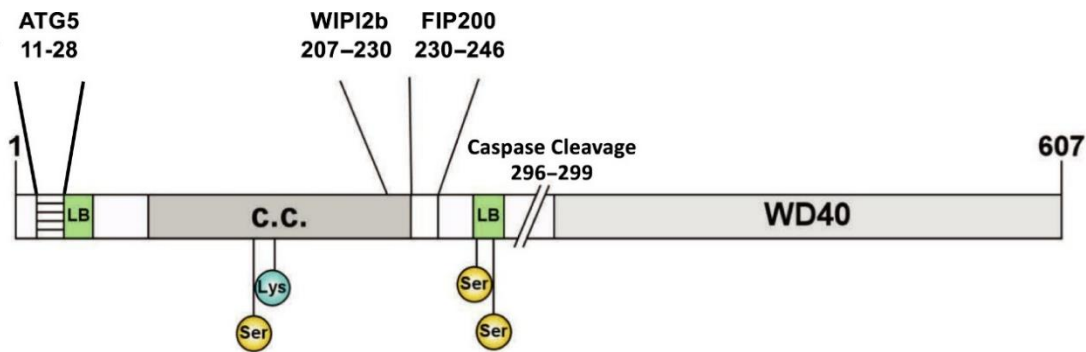


Fig. (1) Representación de la conformación de ATG16L1 (Hamaoui, D. y Subtil, A., 2021).

ATG16L1 posee múltiples funciones, es de relevancia en el presente trabajo, debido a su papel, en la eliminación de patógenos la cual se denomina xenofagia, por ejemplo, en la infección por *Salmonella typhimurium* en donde la V-ATPasa presente en la membrana lisosomal recluta a ATG16L1 para promover la unión de LC3 que es necesario en la formación de membranas autofagosómicas lo que resulta en la activación de la autofagia (Huang, J. y Brumell, J. H., 2014).

2.3 Papel de ATG16L1 en la respuesta inflamatoria

Existe evidencia del papel como molécula moduladora de la inflamación, en recientes estudios se ha observado que puede actuar en la regulación negativa de la inflamación a través del reconocimiento de patrones moleculares presentes en la inmunidad innata, utilizado en la eliminación de patógenos mediante el Interferón tipo 1 (IFN-I), pese a esto existen patógenos que logran escapar de esta respuesta y muchas otras presentes en la inmunidad. (Mao, J., *et. al.*, 2019)

Al ya haber estudios de los diversos fenómenos protectores de ATG16L1 en múltiples patologías, se decidió poner a prueba frente a una infección con *Naegleria fowleri*, que da como resultado una patología neuroinflamatoria.

Existen diferentes formas para evaluar el papel de la proteína ATG, dentro del laboratorio contamos con un modelo de ratones hipomórficos, el cual se distingue por la disminución en la expresión de la proteína ATG16L1, estos ratones fueron creados por Ken Cadwell y colaboradores en 2008, su característica es la producción de mutaciones a través de trampas génicas a partir de células madre que contiene estas mutaciones en el intrón 3' al exón 6 o al exón 10.

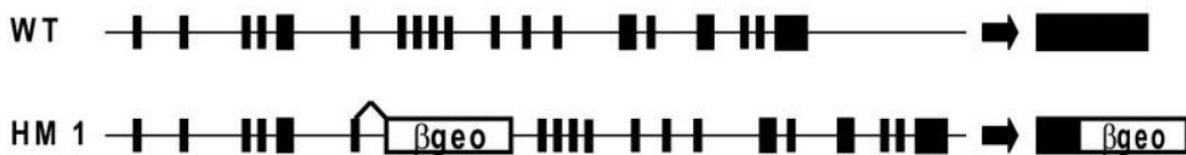


Fig. (2) Cambio en los intrones e inserción de la trampa génica.

2.4 *Naegleria fowleri*

Es una ameba de vida libre, perteneciente al super grupo Excavata, Heterolobosia, Vahlkampfiidae (Adl, S., *et. al.*, 2005). Descrita por primera vez por Fowler y Carter en 1965, al estudiar el caso de un niño residente en Australia y analizar una biopsia del tejido cerebral determinaron que de acuerdo con las diferencias encontradas en la descripción morfológica y patológica que causaba *Acanthamoeba* era una nueva especie y la nombraron como *Naegleria fowleri*, dentro del género *Naegleria* existen 47 especies, *N. fowleri* es la única que resulta patógena para los humanos (Jonckheere, J., 2011).

Es un ameboflagelado, aeróbico que vive en el ambiente en diferentes entornos como sedimentos y agua de ríos y lagos cálidos, sin embargo, hoy en día también se ha encontrado en charcos, acuarios, canales de riego, estanques, aguas termales, albercas poco cloradas, spas, fuentes y aguas residuales (Jahangeer *et al.*, 2020).

Es un protozooario termofílico que puede sobrevivir en altas temperaturas de hasta 45°C, se alimenta de levaduras y bacterias gramnegativas como *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* o *Klebsiella pneumoniae* a través de la quimiocinesis, quimiotaxis y la formación de amebostomas (tasas de comida).

2.5 Ciclo de vida de *N. fowleri*

Se conocen tres diferentes estadios.

Trofozoito: Mide en promedio de 10-25 μm , su membrana celular es de 10 nm de espesor, tienen un solo núcleo con un nucleolo prominente, ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso, presenta lobopodios en el extremo anterior y tiene locomoción sinusoidal activa, el extremo posterior conocido como uroide tiene varios filamentos colgantes. En este estadio se realiza la reproducción a través de división celular por promitosis y fisión binaria (Marciano, F., 1988). La figura (3) panel A muestra una fotografía del trofozoíto.

Flagelado: Cuando hay cambios iónicos en el medio o condiciones sin nutrientes el trofozoíto cambia a un estadio de flagelo, siendo una etapa transitoria que en presencia de agua le permite desplazarse largas distancias en busca de alimento y/o un lugar propicio para reproducirse, este cambio morfogénico dura entre 30 a 60 minutos, (Siddiqui, R. *et. al.*, 2016), tiene un tamaño de 10-16 μm , la forma que toma es de un cuerpo alargado en forma de pera, posee un solo núcleo con un nucleolo grande, no tiene citostoma y comúnmente presenta 2 flagelos, aunque puede llegar a tener hasta cuatro (Marciano, F., 1988). La figura (3) panel B muestra una fotografía del flagelado.

Quiste: Cuando el medio se vuelve desfavorable es debido a que la ameba se somete a condiciones de estrés como falta de oxígeno, nutrientes, desecación, cambios de pH, concentraciones salinas altas y densidad poblacional alta, los trofozoítos cambian a una forma metabólicamente inactiva o latente en forma de quiste, esta se considera como una etapa de resistencia por lo que no se alimenta ni se reproduce, el quiste es esférico de entre 7-14 μm de diámetro, liso y con doble pared con poros, tiene un núcleo con un nucleolo prominente y vacuolas citoplasmáticas. Maciver, S., *et. al.*, 2020; Piñero, J., *et. al.*, 2019; Schuster, F. & Rechthand, E., 1975). La figura (3) panel C muestra una fotografía del quiste.

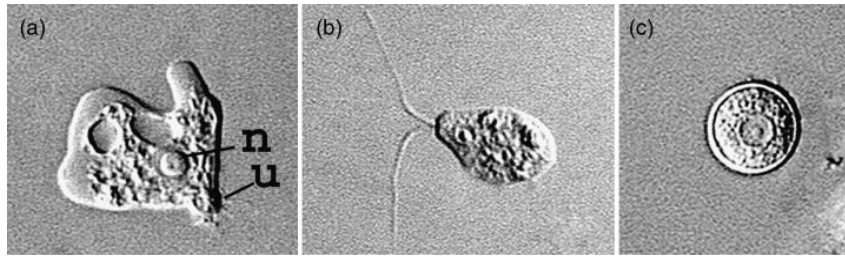


Fig. (3) Imágenes de microscopio óptico 1000x de a) Trofozoíto, b) Flagelado y c) Quiste (Visvesvara, G. S., *et. al.*, 2006).

La infección con *N. fowleri* se inicia cuando el parásito ingresa por la vía nasal en los individuos y viajan a través del neuroepitelio olfativo (Siddiqui, R. *et. al.*, 2016), las amebas se unen a la mucosa nasal y migran por los nervios olfativos, llegando a la placa cribiforme en donde la cruzan e ingresan al sistema nervioso central penetrando el espacio subaracnoideo continuando hasta el parénquima cerebral, produciendo la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP), caracterizada por la lisis del tejido e intensa inflamación en las leptomeninges debido a la congestión provocada por la lisis de eritrocitos, infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y algunos linfocitos (Martínez, A. J., 1977), todo esto lleva producir hernia cerebelosa y posteriormente la muerte (Symmers, 1969).

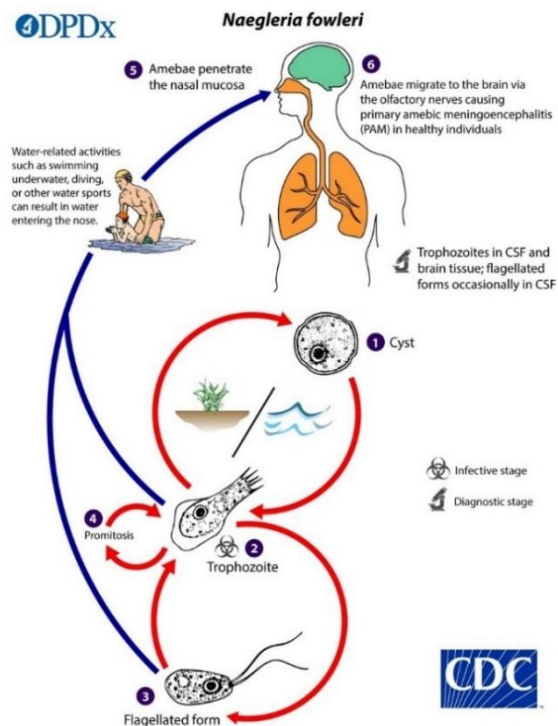


Fig. (4) Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*, imagen tomada del CDC (Centers of Disease Control and Prevention).

2.6 Epidemiología de *N. f owleri*

Se ha reportado una mayor incidencia en niños y adultos jóvenes que practicaron actividades acuáticas días antes de los primeros síntomas, es una ameba de distribución cosmopolita (Schuster, F & Visvesvarab, G., 2004) excepto en la Antártida, generalmente se observan casos de infección durante los meses de verano cuando la temperatura ambiente es alta.

La mayoría de los casos reportados se han dado en regiones tropicales, zonas subtropicales e incluso zonas templadas, al 2011 se habían registrado 235 casos de MAP a nivel mundial.

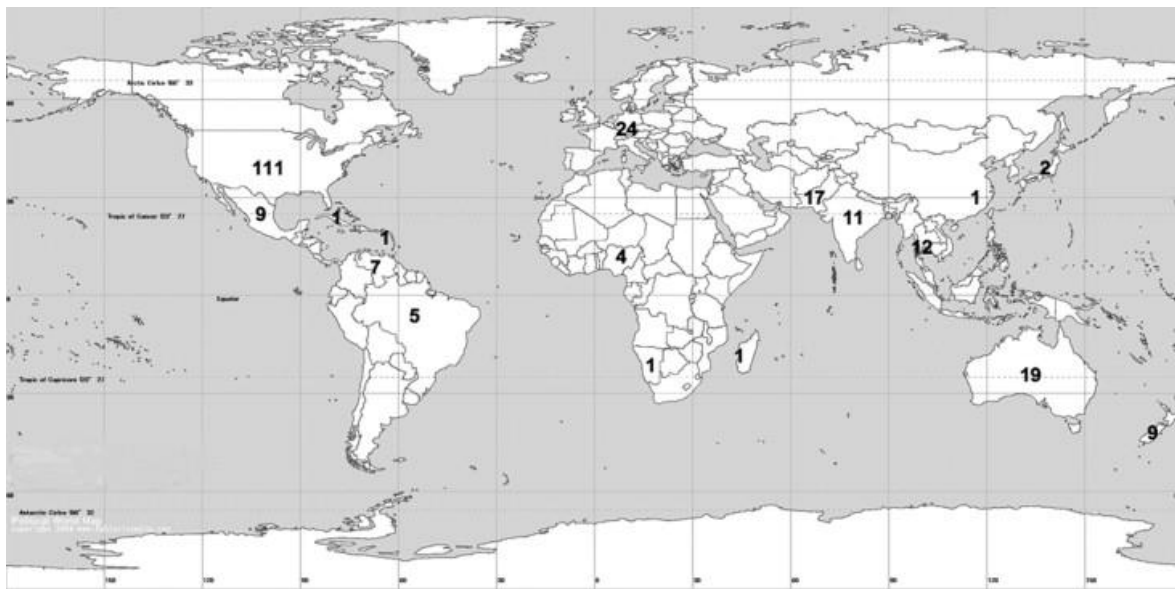


Fig (5). Mapa que refleja la cantidad de casos de PAM registrados al 2011 (Jonckheere, J., 2011).

En la figura 4 se muestra la distribución de la enfermedad, se puede observar que Estados Unidos, Europa y Australia son los países con un mayor número de casos reportados, estos indican que en su mayoría se dieron debido a que las personas se sumergieron en aguas naturales contaminadas, la segunda razón es debido a nadar en albercas no tratadas de manera correcta con cloro (Jonckheere, J., 2011).

Un estudio en el 2021 muestra que los casos de infección con *N. f owleri* va en aumento, ya que al comparar a Estados Unidos siendo el país con mayor número de casos tuvo un aumento de 45 casos en tan solo 7 años, esto se muestra en la figura

(6), es de suma relevancia seguir estudiando al patógeno debido a que el aumento a nivel mundial es alarmante (Ortolano, S., *et. al.*, 2021).

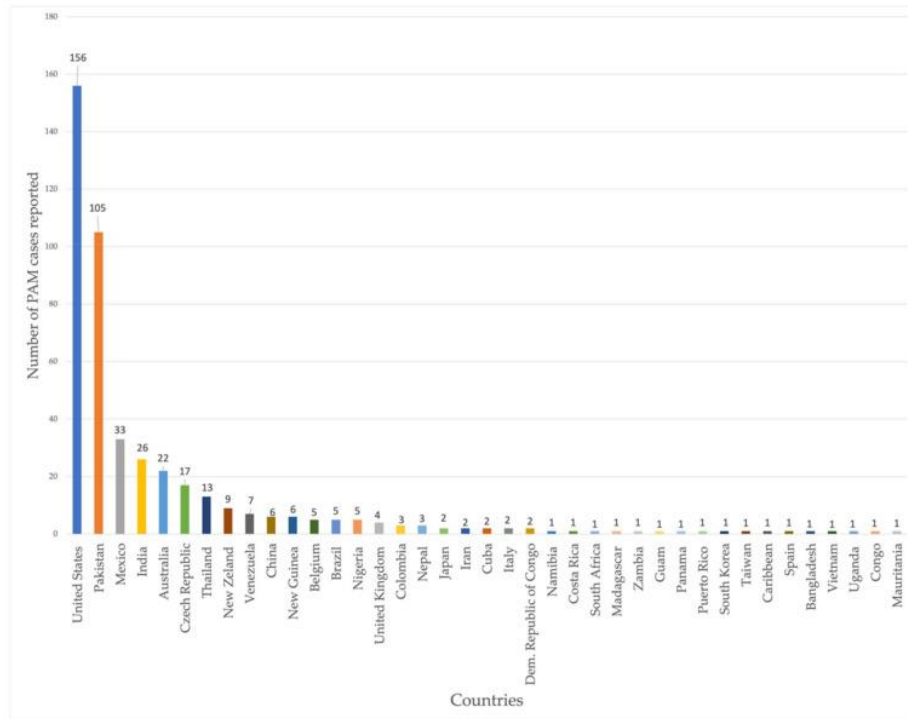


Fig. (6) Casos de *N. fowleri* documentados por país hasta el 2018. (Ortolano, S., *et. al.*, 2021)

Hay 8 diferentes genotipos de *N. fowleri*, cada uno se distribuye de manera desigual en los continentes, en Estados Unidos y México se presentan 3 genotipos que pertenecen a 36 cepas.

2.7 Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP)

La meningoencefalitis amebiana primaria es una enfermedad que se desencadena 3 días después de la infección con *N. fowleri* (Maciver, S., *et. al.*, 2020; Piñero, J., *et. al.*, 2019), se desarrolla en pacientes inmunocompetentes.

Se caracteriza por una aparición pronta y progresión rápida. Los signos que presentan las personas infectadas incluyen fiebre (38.5-41°), vómito, caquexia, fotofobia y signos de irritación meníngea como rigidez en el cuello con signos de Kerning y Brudzinski positivos, letargo y confusión (Visvesvara, G. S., *et. al.*, 2006), además hay

afectaciones en los bulbos olfatorios que provocan alteraciones en el sentido del olfato y/o del gusto (Visvesvara, G., 2013).

Los síntomas que refieren los pacientes son confusión, irritabilidad, cefalea bifrontal o bitemporal y náuseas, se desarrollan durante 5-7 post-infección, además los pacientes pueden presentar convulsiones como consecuencia del aumento de la presión intracraneal, coma y posiblemente un paro cardio respiratorio y edema pulmonar (Martínez, 1985; Siddiqui, R. *et. al.*, 2016).

A pesar de la gravedad de la enfermedad, es escasa la información acerca de su fisiopatología, estudios pioneros reportaron que los hemisferios cerebrales cambian anatómicamente ya que están blandos, hinchados y edematosos, las leptomeninges (aracnoides y piamadre) se observan opacas y congestionadas, además presentan un exudado entre los surcos, en la base del cerebro y el cerebelo. A raíz de la observación del daño encontrado en el sitio de infección también se describieron los bulbos olfatorios, aquí se ha observado necrosis hemorrágica y exudado, a su vez se han encontrado hemorragias en otro sitios como en la base y alrededor de los lóbulos orbitofrontal y temporal, hipotálamo, mesencéfalo, el bulbo raquídeo, la porción superior de la médula espinal y el espacio subaracnoideo sobre los hemisferios (Visvesvara, G. S., *et. al.*, 2006) .

Debido a la rápida progresión es difícil su diagnóstico, en general este se hace post mortem, mediante un análisis microscópico del Líquido Ceforraquídeo (LCR) con el objetivo de buscar la presencia de las amebas, además de un análisis microscópico de una muestra de cerebro en donde buscan exudados inflamatorios con presencia de poliformonucleares, eosinófilos, algunos macrófagos y linfocitos, sin embargo, no han sido suficientes para eliminar a la ameba, también se ha observado desmielinización focal en la sustancia blanca del cerebro y la médula espinal (Chang, S., 1979), por lo que hay una cantidad mínima de personas que han sobrevivido a esta letal patología. El principal método de diagnóstico utilizado es una amplia historia clínica, que posteriormente se confirma con un examen microscópico de LCR, si el diagnóstico se comprueba el principal tratamiento se basa en la administración del antimicótico Anfotericina B (AmB), la administración de este fármaco provoca cambios en la membrana de las amebas, decremento en el número de amebostomas, ausencia en

la formación de pseudópodos y anormalidades mitocondriales (Schuster, F. & Rechthand, E., 1975), aunado a este fármaco se utilizan Miconazol IV y Rifampicina.

2.8 Formas de infección de *N. fowleri*

Aún se desconoce una terapia para esta infección sin embargo se han descrito diversos mecanismos que podrían usarse como blanco terapéutico.

Entre estos se encuentran los dos mecanismos dependientes de contacto, el primero es la adhesión, capacidad que posee *N. fowleri* para adherirse a la mucosa nasal, para esto es importante la respuesta quimiotáctica a los componentes de las células nerviosas (Cline, M., *et. al.*, 1986; Han, K., *et. al.*, 2004), el segundo mecanismo es la trogocitosis, este proceso implica que una parte de la célula objetivo sea absorbida por los amebostomas (John, D., *et. al.*, 1985), este proceso depende de la polimerización de actina G monomérica en actina F filamentosa (Shin, H., *et. al.*, 2005).

En los mecanismos dependientes del contacto el primero es la producción de proteínas conocidas como Naeglerioporinas A y B que son similares a la perforina que lisa las células diana, estas Naeglerioporinas actúan en la formación de poros en las membranas (Herbst, R., *et. al.*, 2002 & Herbst, R., *et. al.*, 2004).

Entre los factores dependientes e independientes de contacto está el factor citolítico que provoca la destrucción de las membranas celulares (Young, D. & Lowrey, D., 1989).

El primer mecanismo descrito sobre la patogenicidad de esta ameba fue la liberación de enzimas fosfolipasas A, A₂, B y C, por Cursons, *et. al.* en 1978 además de actividad de esfingomielinasas, neuroamidases, elastasas y enzimas proteolíticas, que facilitan la destrucción de células de cultivo tisular, a través del daño a la membrana rica en lípidos de las células huésped y la desmielinización del tejido nervioso (Hysmith, R. & Franson, R., 1982).

Otro factor descrito es la presencia de una proteína citopática dentro de las amebas, que desencadena la vía de apoptosis en células de cultivo de tejidos susceptibles, además de una alta actividad fagocítica (Schuster, F & Visvesvarab, G., 2004).

Por último, existen otros mecanismos usados por la ameba para tener una exitosa infección como lo son el cambio fenotípico, su morfología, la ubiquitinación, la

tolerancia fisiológica al medio, la producción de biofilms, quimiotaxia, resistencia a los fármacos, evasión de la respuesta inmune y el factor huésped (Siddiqui, R. *et. al.*, 2016).

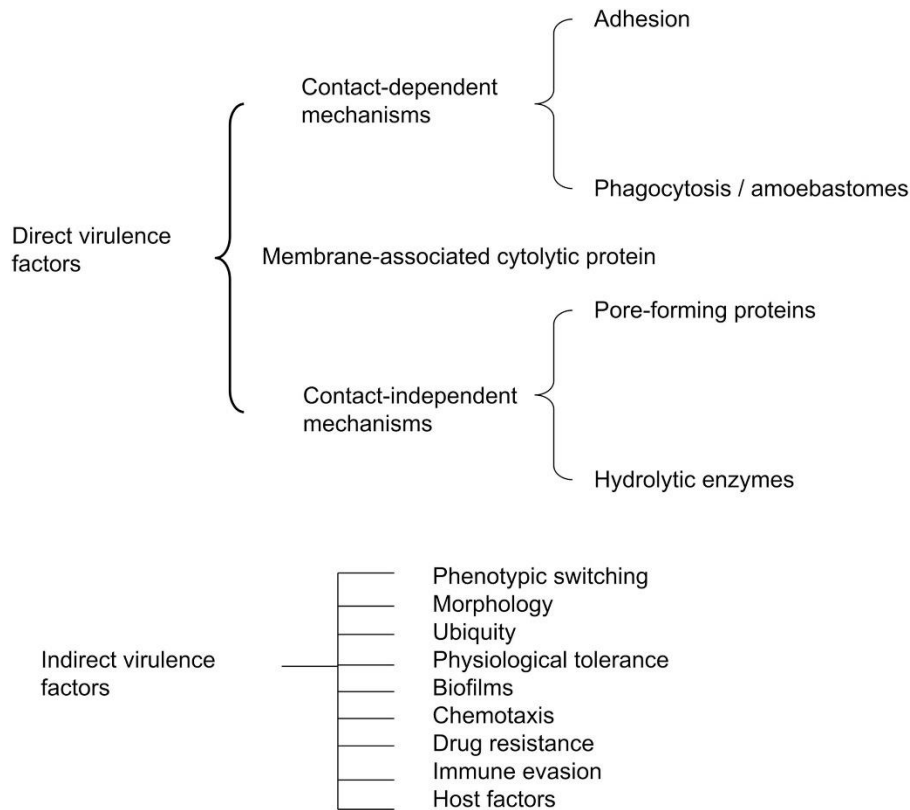


Fig (7). Esquema que resume los mecanismos dependientes e independientes del contacto que funcionan en la patogénesis de la infección con *N. fowleri* (Siddiqui, R. *et. al.*, 2016).

2.9 Respuesta inmune en la MAP

Aún no se han determinado todos los mecanismos que utiliza el sistema inmune para poder superar el desafío contra esta ameba, son pocas las descripciones existentes, al inicio de la infección se induce la activación de las defensas innatas, hay secreción de mucinas como MUC5AC para atrapar a estas amebas, también se produce interleucina 8 e 1 beta en las células epiteliales respiratorias a través de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Cervantes, I., *et. al.*, 2009), a pesar de ser una reacción protectora, se ha demostrado que *N. fowleri* induce ROS, provocando necroptosis en células T Jurkat (Song, K., *et. al.*, 2011).

No obstante, de que las mucinas logran inhibir la unión de *N. fowleri* al epitelio, algunos trofozoítos consiguen penetrar, esto provoca la inducción de una reacción inflamatoria

en la que se observan eosinófilos y neutrófilos, con el paso de los días la reacción inflamatoria aumenta y lo que en un inicio era una ventaja del cuerpo humano se convierte en una respuesta dañina, resultando en lisis celular y daño tisular del SNC (Rojas, S., *et. al.*, 2004 & Cervantes, S., *et. al.*, 2008).

Aun siendo una enfermedad de rápida progresión se logró recolectar sueros de pacientes infectados con *N. fowleri*, en los cuales se ha encontrado que existe un título de 1:20 anticuerpos específicos contra esta ameba, a su vez encontraron que la IgM es la principal clase de anticuerpo generado, aún no se determina si poseen una actividad protectora, sin embargo se ha registrado que se producen anticuerpos sIgA, que han sido capaces de inhibir la unión de la ameba a las células, pero las amebas pueden erradicar el complejo antígeno-anticuerpo a través de la endocitosis (Ferrante, A. & Thong, H., 1979).

Pese a las barreras y mecanismos inmunológicos que se han descrito, esta ameba posee adaptaciones que le permiten evadir al sistema inmune tales como, actividad mucinolítica, es decir las amebas evaden la mucosidad generada en la respuesta innata al degradar a las mucinas a través de proteasas (Cervantes, S., *et. al.*, 2008). Los resultados de Im, K., *et. al.* en 1978 mostraron que durante la infección existe una reducción de la transformación linfoblástica inducida por mitógeno de células B, esto lleva a sugerir que hay una supresión de la inmunidad mediada por células durante esta infección, sumado a, *N. fowleri* puede evitar la lisis mediada por el complemento por las proteínas presentes en su superficie formando vesículas en la membrana en la que el complejo de ataque de la membrana lítica (MAC) se elimina de la superficie de la ameba.

Para eliminar la MAC las amebas deben de reconocer la formación de los componentes terminales del complemento (C5b y C9) en la superficie de las células lo que desencadenará las cascadas de señalización y así se agregan los complejos a regiones de la membrana plasmática y liberarlos en las vesículas de la membrana (Chu, T., *et. al.*, 2005), se ha propuesto como un papel protector a las amebas contra las proteínas propias del sistema para formar poros (Fritzinger, A. E. & Marciano, F., 2004; Fritzinger, *et. al.*, 2006), cuando las amebas son expuestas a suero sanguíneo

se ha observado que hay activación de proteínas cinasas como serina, treonina y/o tirosina quinatas, que se encuentran implicadas en la resistencia al complemento ya que al bloquearlas hace que *N. fowleri* sea susceptible a la lisis mediada por el complemento (Chu, *et. al.*, 2000).

Otro mecanismo descrito es la eliminación de anticuerpos de su superficie mediante la endocitosis (Ferrante, A. & Thong, H., 1979).

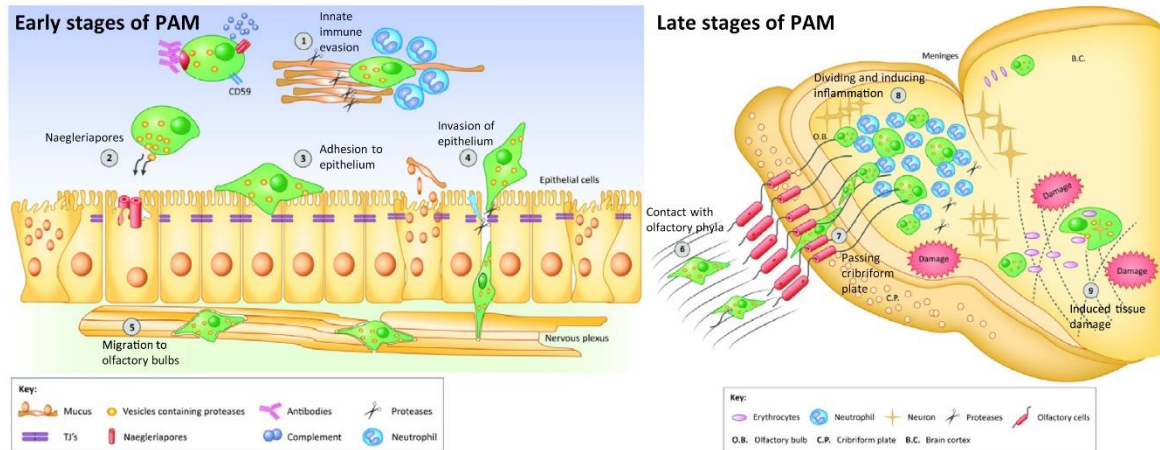


Fig. (8) Esquema que representa la forma de infección de *N. fowleri* en las diferentes zonas (Piñero, J., *et. al.*, 2019).

3.- Participación de ATG16L1 en neuroinflamación

Las patologías en donde se ha tomado en cuenta el papel de ATG16L1 son pocas, un estudio de relevancia mostró que la autofagia está relacionada a los trastornos neurodegenerativos con frecuencia, esto debido a que durante estas enfermedades hay fallas en la autofagia a lo largo de la vía contribuyendo a la severidad, por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson la autofagia se interrumpe en las neuronas afectadas, en la enfermedad de Huntington si se forman los autofagosomas pero a una velocidad más lenta de lo normal, esto parece ser debido a que los fagosomas parecen estar desprovistos de cargas (Nixon, R. A., 2013).

Otra enfermedad en donde se ha estudiado es la esclerosis múltiple (EM), la cual per se es una patología desmielinizante pero que se asocia a la desregulación de procesos autofágicos, se ha observado que en suero de pacientes con esclerosis autoinmune (EAE) se reducen los niveles de ATG16L2, una isoforma de ATG16L1, se inhibe la formación del complejo ATG12-ATG5-ATG16L1, al estudiar esta patología en un modelo experimental de esclerosis autoinmune (EAE) se observó que al inmunizar con el péptido de la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina los transcritos de ATG5 y de su proteína en sangre se correlacionan positivamente con la gravedad de la EAE (Yang, G. & Kaer, L., 2021).

En un estudio donde se utiliza al virus de la Influenza A que para su eliminación se es necesaria la maquinaria de los lisosomas se observó que la pérdida de la autofagia hace que los ratones sean más sensibles ante el virus aunque tenga una baja patogenicidad, lo que provoca en el huésped murino desregulación de citocinas y una alta mortalidad, el estudio demostró que la infección se controlaba en las barreras epiteliales donde la autofagia actúa como un medio para ralentizar la unión del virus con los endosomas (Wang., *et. al.*, 2021).

4.- JUSTIFICACIÓN

Son escasos los estudios que abordan la participación de la proteína ATG16L1 en la respuesta inmune durante procesos de neuro-inflamación. Los reportes existentes estudian ATG16L1 en el contexto de autoinmunidad en la Encefalitis Autoinmune experimental (EAE), sin embargo, se desconoce cómo es que esta proteína participa durante un proceso infeccioso del SNC, por lo tanto su importancia radica en conocer su papel en inflamación para posteriormente saber si puede ser usado como blanco terapéutico para evitar la gravedad de esta enfermedad.

5.- HIPÓTESIS

La MAP al ser una patología que genera un proceso de neuro-inflamación, los individuos que no expresan de manera normal la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) serán más susceptibles a la infección con *N. fowleri*.

6.- OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Comparar el curso de la infección con trofozoitos de *N. fowleri* entre ratones silvestres (WT) y ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}).

6.2 Objetivos particulares

- Comparar la sobrevida entre ratones WT y ATG16L1^{HM}.
- Determinar si los ratones hembra o macho son más susceptibles a la infección con *N. fowleri*.
- Comparar el daño macroscópico del cerebro y ojos durante la infección con *N. fowleri*.
- Cuantificar el nivel de las citocinas inflamatorias innatas (IL-1 β y TNF α) y de tipo Th2 (IL-4 e IL-13) en sangre así como presentes en sobrenadante de cultivo de órganos linfoides secundarios (bazo y ganglio submandibular) al término de la infección con *N. fowleri*.
- Analizar las poblaciones celulares (linfocitos y neutrófilos) presentes en bazo y ganglio submandibular al término de la infección con *N. fowleri*.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho y hembra silvestres (WT) y ratones hipomórficos de la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) de ambos sexos con fondo genético C57BL/6, de 4-5 semanas de edad. Ambas colonias se mantienen en el bioterio de la FES Iztacala, cada grupo experimental contenía 4 animales, se mantuvieron en cajas de policarbonato con jaulas de acero inoxidable y los ratones no tuvieron restricción de agua o comida, el manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo con los lineamientos de la NOM-062-Z-1999.

7.2 Genotipo

Para mantener el control de las colonias de ratones, se realizó un análisis de PCR para confirmar el genotipo. Se cortó un fragmento de la cola de cada ratón (aproximadamente 0.5 cm de largo) se colocaron en tubos eppendorf que contenían 500 µL de buffer de lisis más 4 µL de proteinasa K (InvitrogenTM), las muestras se incubaron a 56° durante toda la noche para realizar la extracción de ADN, con un volumen final de 30 µL en agua estéril.

Una vez obtenido el DNA se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con un volumen final de 25 µL, esta reacción permite verificar la presencia de los alelos, se utilizó una sonda TaqMan®, master mix (AMPLIQON) y los primers descritos en la figura 9. Las muestras se amplificaron en un termociclador CFX96 BIORAD de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

Gen	Secuencia del primer (5'----3')
ATG16 F	TGG CTG GAG TGC GAT CTTCC
ATG16 R	CAG ACG GCA AAC GAC TGT CCT
ATG6L1 hm1 R	CAC CTG GTT ACA TTG GCA AAC A
ATG16L1 hm1 F	CAG GAT CCT TCT GCA CAC ATT T

Fig. (9). Primers que se utilizaron en la PCR para ampliar los genes especificados.

Para observar las bandas se utilizó un gel de agarosa al 0.7% teñido con 0.3 µL de bromuro de Etidio, posteriormente se realizó una electroforesis a 100 Volts por 20 min., por cada pozo se utilizaron 6 µL de muestra, las bandas fueron capturadas en un fotodocumentador y el sistema Gel Doc™ Ez imaginer (BIO-RAD) mediante el programa Image Lab™

En el gel se observó la banda correspondiente a los ratones WT fragmento de 625 pb y para confirmar el genotipo de los ratones Hipomórficos ATG16L1, el fragmento amplificado es de 330 pb.

7.3 Infección con *N. fowleri*

Los ratones fueron anestesiados en una cámara de éter al 5% y posteriormente se colocaron en posición dorsal para infectarlos con 6×10^3 trofozoitos de *N. fowleri* de la cepa de referencia ATCC 30,808 vía nasal, los trofozoítos de *N. fowleri* fueron obtenidos de un cultivo axenico previo mantenido en la escuela superior de medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional.

Durante el periodo de experimentación se registró el peso de los animales diariamente a la misma hora durante 15 días y se registró durante el proceso de infección los signos tales como pilo erección, contracción de extremidades, caquexia, manifestaciones oculares y baja movilidad.

Se monitoreo la tasa de mortalidad y supervivencia de los organismos de experimentación.

7.4 Análisis Histológico

En los días de sacrificio se recuperó el cerebro y se pesó, se tomaron fotografías y se registraron signos de posibles lesiones, posteriormente se fijaron con formol al 4% durante 24 hrs., posteriormente se realizó la deshidratación del tejido en baños sucesivos en soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico, seguido a una actividad aclaradora o de diafanización con xilol, lo anterior se realizó para llevar a la inclusión en parafina durante 48 hrs.,

De la misma forma se recuperaron los ojos, se tomaron fotografías al observarlos al microscopio óptico y se registraron las posibles lesiones, posteriormente estos fueron fijados con fijador de Zinc, siguiente a esto se realizó la deshidratación en baños sucesivos en soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico, seguido a una actividad de diafanización con butanol, esto con la finalidad de llevarlo a la inclusión en parafina durante 48 hrs.

Pasado este tiempo se realizó la inclusión de las muestras en cubos de parafina, cuando se obtuvieron las muestras incluidas se realizaron cortes de 5µm en micrótomo KD-2258, posteriormente se realizó la tinción con técnica histológica Hematoxilina y Eosina (H&E), las muestras fueron montadas con resina en portaobjetos esmerilados. Los cortes histológicos se observaron en microscopio óptico en los aumentos de 10x para determinar los cambios histológicos en los diferentes grupos experimentales.

7.5 Obtención de muestras de suero

Para analizar los niveles de citocinas en suero de ratones se les extrajo sangre de la vena caudal a los 0, 5, 10 y 15 días post infección, para obtener el suero se utilizaron tubos eppendorf, posterior a la toma de muestra se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, el suero obtenido se congeló a -20°C, al mismo tiempo que se obtenía la muestra de sangre se realizó un hematocrito en tubos capilares, colocando EDTA como anticoagulante, llenándolo al 75% de su capacidad y dejando que se realizara la separación de glóbulos rojos y el plasma, después de 24 horas se midió el tubo capilar y posteriormente cuantificar el contenido celular.

7.6 Cultivo de células totales de nódulos submandibulares

Los días de sacrificio se recuperaron los ganglios submandibulares, estos fueron colocados en 1 ml de medio de cultivo RPMI enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10%, posteriormente se maceraron con la ayuda de un émbolo de jeringa de 5 mL en un filtro celular con poro de 70 μm , posteriormente se tomó de nuevo el mililitro completo para centrifugarlo por 6 minutos a 3500 rpm., las muestras se decantaron y resuspendieron en 1 mL de medio, de este se tomaron 10 μL y se depositaron en una cámara de Neubauer para realizar un conteo celular, las muestras se contaron en un microscopio óptico y se ajustaron a una densidad de 3×10^6 células/mL.

Las células se cultivaron en placas de 24 pozos y se estimularon con Concanavalina A, por 48 horas a 37°C y 5% CO_2 , pasado este tiempo se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf para centrifugarlo por 5 minutos a 3000 rpm. después se tomó el sobrenadante y se colocó en tubos nuevos para ser almacenado a -20°C para posteriormente cuantificar las citocinas por medio de la técnica Elisa.

7.7 ELISA

Se realizó la técnica ELISA sándwich para cuantificar las citocinas IL-4, IL-13, IL-1 β y TNF α en sobrenadantes de cultivo de nódulos y suero sanguíneo.

La técnica se realizó en 3 fases, en la primera fase se realizó la sensibilización de una placa de 96 pozos (Costar), las placas fueron cubiertas con 100 μL /pozo de solución compuesta de 100 μL de anticuerpos de captura diluidos en 10 mL de PBS con una pipeta multicanal (Gilson), se incubó durante 24 hrs. a 4°C.

En la segunda fase la placa fue lavada (PBS/0.5% de Tween 20), posteriormente se colocaron 300 μL / pozo de solución de bloqueo (PBS/ BSA 1%) para evitar pegado inespecífico, se incubó por 2 hrs. a t° ambiente. Pasado este tiempo se realizaron 3 lavados y se colocó 25 μL /pozo de suero y 50 μL /pozo de cultivo, para poder extrapolar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la citocina recombinante murina, ésta se inició con una concentración de 10,000 pg posteriormente se dejó incubando durante 24 hrs. a 4°C.

La tercera fase correspondió al revelado de la placa, después de las 24 hrs. de incubación se hicieron 3 lavados, ya seca la placa se colocaron 100 μL /pozo de anticuerpo acoplado a biotina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se incubó por 2 hrs. a t° ambiente, terminado este tiempo la placa se lavó 3 veces.

Durante este tiempo se preparó una dilución de 1:5000 de enzima streptoavidin peroxidasa en la solución de bloqueo, esto se llevó a un volumen final de 10 mL, de esta solución se colocaron 100 μL /pozo y se dejaron incubar por 45 minutos a t° ambiente, por último, se lavó la placa 6 veces y se colocaron 100 μL /pozo de H_2O_2 al 3% en 11 mL de ABTS. Las placas fueron leídas con una longitud de onda 405 nm en lector de placas (EPOCH) y los valores son presentados como pg/mL.

7.8 Citometría de flujo

La técnica se realizó con las muestras que se obtuvieron anteriormente para el cultivo de bazo y ganglios, estas muestras fueron ajustadas a 1×10^6 y 0.5×10^6 células/mL respectivamente.

Las muestras fueron centrifugadas 5 min x 3500 rpm, el sobrenadante se decantó y se colocó en cada muestra 300 μL de Buffer de FACS, se bloqueó cada muestra con 10 μL de Suero Fetal Bovino, posteriormente, se colocaron los anticuerpos acoplados a fluorocromos específicos Tonbo Bioscience y Biolegend (FITC-CD3), (NK1.1-APC), (CD8-BV605), (CD4-PerCP), (Ly6G-PE), (F480-PECy7), (Ghost Die- Viol450), las muestras fueron incubadas por 45 min.

Terminado el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron 5 min x 3500 rpm, se decantaron y se colocó buffer de FACS y paraformaldehído al 4% para fijar las muestras y posteriormente puedan ser analizadas en el citómetro de Flujo (Attune, life technologies).

7.9 Análisis Estadístico

Los gráficos y datos se presentarán como promedio \pm error estándar utilizando el software Prism 9 (GraphPad Software INC) y se utilizó la prueba de t no pareada para determinar las diferencias entre grupos. Las curvas de sobrevida se realizaron con la prueba de Mantel Cox.

8.- RESULTADOS

8.1 Gel de Agarosa de PCR.

Para confirmar el genotipo de los grupos experimentales, se realizó la técnica PCR. La siguiente imagen fue obtenida del gel mediante visualización en un transiluminador de luz UV. Se pueden observar las bandas de genes de los ratones WT y ATG16L1^{HM}, con esto se confirma el fondo genético de ambas cepas. Para los ratones WT se observa una banda de 625 pb mientras que los ratones ATG16L1^{HM} se observa un fragmento de 330 pb.

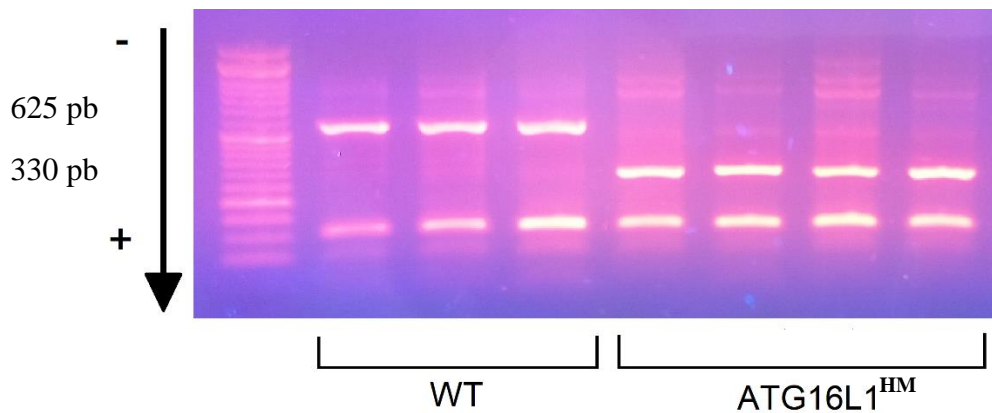
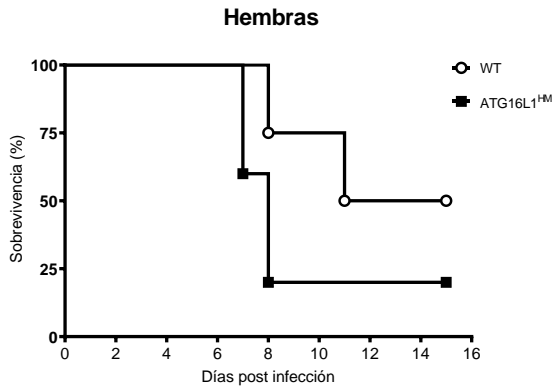


Fig. (10). Gel representativo, en donde se muestra la confirmación de genotipo de ambas cepas, gel de agarosa observado con luz UV.

8.2 Los ratones ATG16L1^{HM} son más susceptibles a la infección con *N. fowleri*

A)



B)

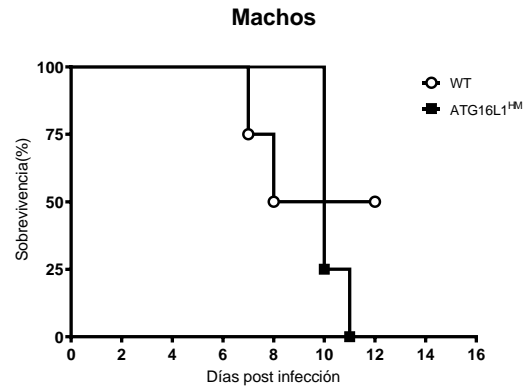


Fig. (11) Gráficas representativas de la supervivencia, se muestra la mortalidad de hembras (A) WT y ATG16L1^{HM} infectados con *N. fowleri*. Las curvas fueron analizadas con el método Mantel Cox aceptando una $p > 0.05$, por lo que se considera que en ambos grupos experimentales no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

Las curvas de supervivencia mostradas de ambos grupos de ratones son mostradas en la figura 11, en donde se muestra que los ratones hembra WT tuvieron una mortalidad del 25% (n=4) al día 8, mientras que los ratones ATG16L1^{HM} tuvieron una mortalidad temprana del 20% (n=5) al día 7, la tasa de mortalidad tardía de los ratones WT fue del 50% al día 15, mientras que la de los ratones hipomórficos fue del 80% al día 15, por lo que se puede observar que los ratones que no pueden expresar de manera normal esta proteína son más susceptibles ante la infección con *N. fowleri*.

Este mismo análisis en machos reveló que los ratones WT tuvieron una mortalidad del 25% (n=4) al día 7, mientras que los ratones ATG16L1^{HM} tuvieron una mayor mortalidad del 75% (n=4) al día 10, la tasa de mortalidad de los ratones WT fue del 50% al día 12, mientras que los ratones hipomórficos fue del 100% al día 11, por lo que se puede observar que los ratones hipomórficos son más susceptibles ante la infección con *N. fowleri*.

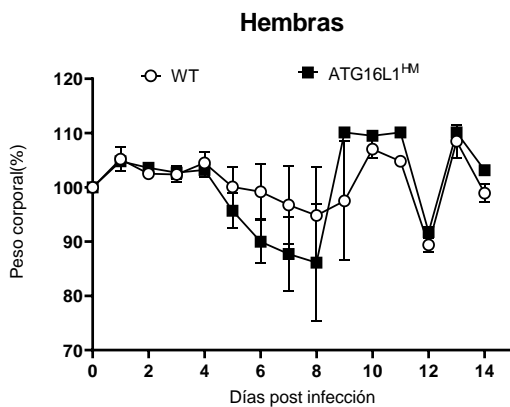
En conjunto estas observaciones, nos muestran que al comparar entre machos y hembras el porcentaje de supervivencia es mayor en las hembras, estos datos sugieren que los machos tienen mayor susceptibilidad ante este patógeno, la cual se exagera en ratones ATG16L1^{HM}.

8.3 Monitoreo del peso

Como anteriormente se refirió, durante las 3 repeticiones experimentales de infección *in vivo*, se registró el peso de los ratones diariamente por la mañana a la misma hora. En la figura 12 A y B se muestra el porcentaje del peso inicial (1 día antes de la infección) contra el aumento y la pérdida de este entre ambos grupos experimentales. En ambos grupos experimentales tanto hembras como machos se observó que a partir del día 5 inició la pérdida de peso, siendo el día 8 el de mayor pérdida de peso, los datos mostraron que en los grupos de ratones hembra WT disminuyeron en un 30%, mientras que en los ATG16L1^{HM} hubo una disminución de hasta el 25% con respecto al peso inicial, en los grupos de ratones macho WT hubo una disminución de hasta el 20% en comparación con los ratones ATG16L1^{HM} que tuvieron una disminución de hasta el 30% del peso inicial.

Como se puede observar la pérdida peso fue mayor en los grupos hipomórficos, lo que nos sugiere que hay mayor daño debido probablemente a la regulación negativa por parte de la proteína ATG16L1^{HM} en la respuesta inflamatoria en los individuos de experimentación .

A)



B)

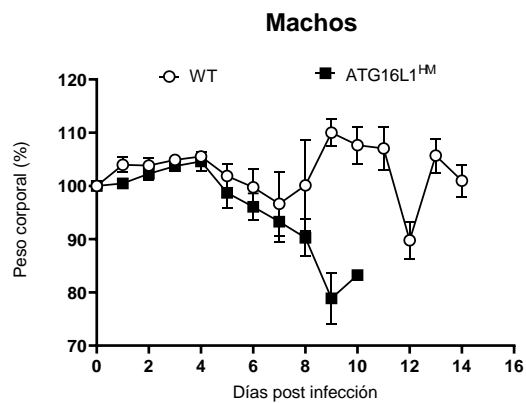


Fig. (12). Gráficas representativas del porcentaje del peso en los diferentes grupos experimentales, hembras (A) y machos (B) WT y ATG16L1^{HM}, durante el proceso de infección con *N. fowleri*. (n=4 por grupo experimental en cada repetición).

8.4 Análisis macroscópicos

8.4.1 Signos observables de la infección

Como parte de los objetivos era necesario monitorear la progresión de la enfermedad incluyendo signos asociados a la infección con *N. fowleri*. Durante las repeticiones experimentales que se realizaron me percaté que los ratones tenían una secreción blanquecina en el ojo, de origen desconocido, por lo tanto, se optó por realizar un estudio prospectivo.

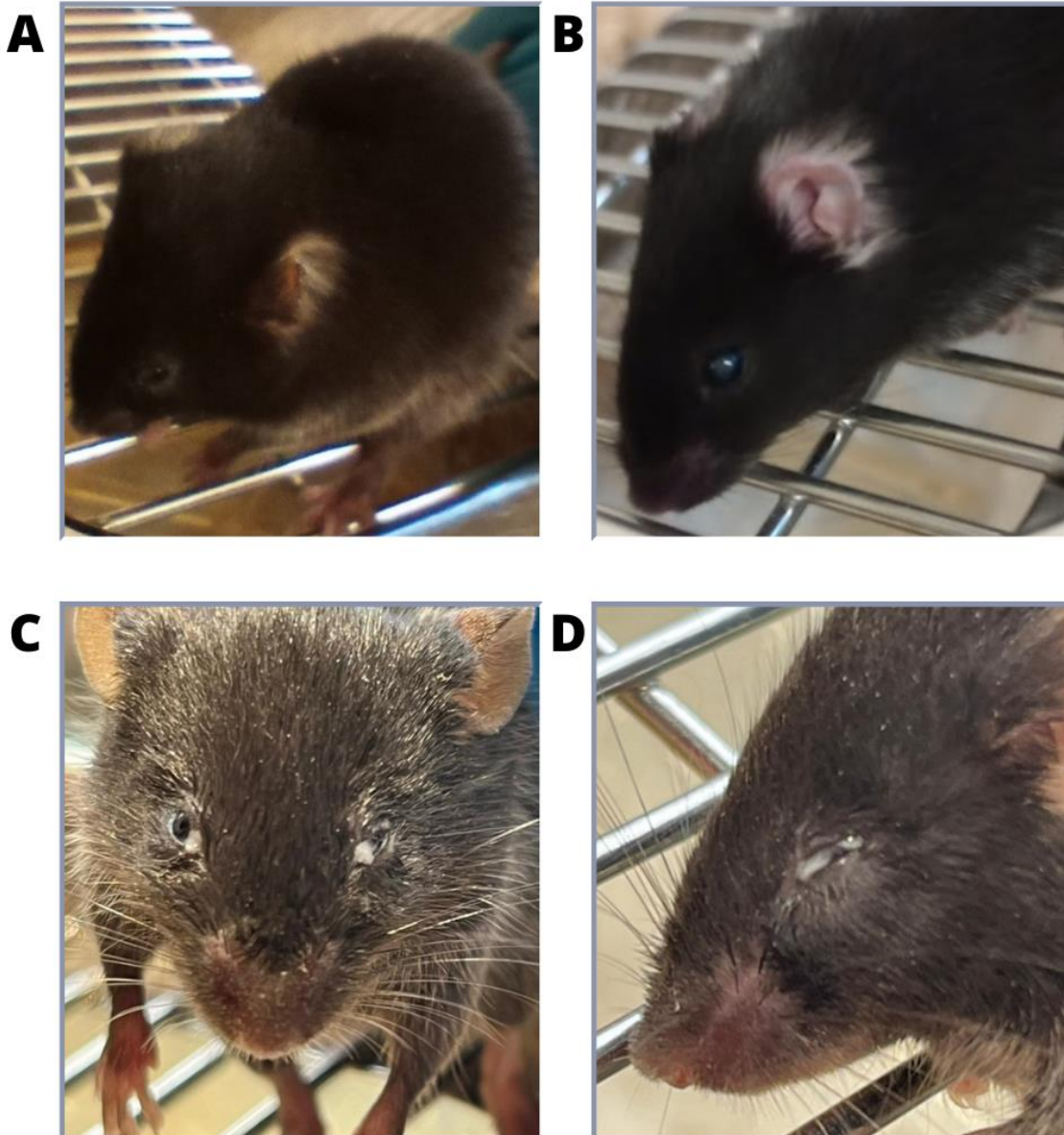


Fig. (13) Fotografías representativas de los signos presentes después de 5 días post infección.

La figura 13 muestra imágenes representativas de diferentes signos de infección, en la fotografía A se observan signos descritos en la literatura como piloerección, retracción de patas delanteras, encorvamiento de la espalda y letargo compatible con el desarrollo de caquexia, la fotografía B muestra la opacidad del ojo izquierdo de un ratón, para confirmar la presencia de lesiones corneales, se tiñó la superficie ocular con fluoresceína y con ayuda de una lámpara de azul de cobalto se observó y documentó la presencia de úlceras o puntilleo en la córnea, acompañado de desepitelización, esta condición fue observada ratones macho WT.

En la fotografía C se observa la presencia de secreción en el lagrimal de los ratones, cabe mencionar que este signo no había sido descrito por otros grupos de investigación; en la fotografía D se muestra la presencia de esta secreción de manera abundante distribuida en la superficie ocular con apariencia lechosa, esto impedía que los ratones logaran abrir los ojos, la presencia de esta secreción fue en todos los grupos experimentales, pero en mayor número de veces en los ratones ATG16L1^{HM} hembras y machos.

8.4.1.1 Presencia de esplenomegalia

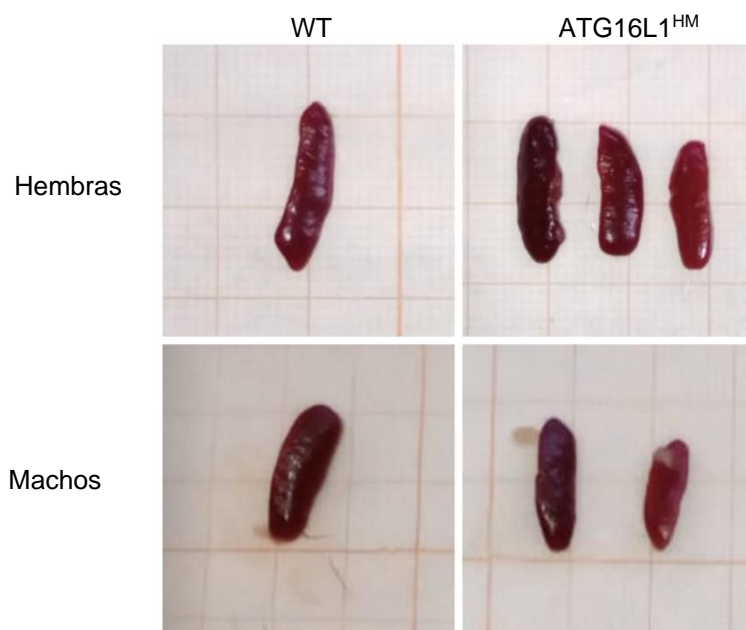


Fig. (14) Fotografías representativas de bazo recolectado a los 15 días post-infección de ratones hembra y macho WT y ATG16L1^{HM}.

En la figura 14 se muestra el bazo de ratones hembra y macho obtenidos el día del sacrificio, es destacable la esplenomegalia que presentan los ratones WT, a pesar de esto la coloración es normal sin embargo los ratones ATG16L1^{HM} presentan ya sea un aumento en la tonalidad rojiza o una disminución en la tonalidad, característica que fue más destacable en varios organismos, en los ratones macho también se denota la esplenomegalia en ratones WT, que no se observa en ratones ATG16L1^{HM}, a su vez en estos ratones se muestra la misma característica de aumento o falta de coloración.

8.4.1.2 La infección con *N. fowleri* causó daño en diversos órganos

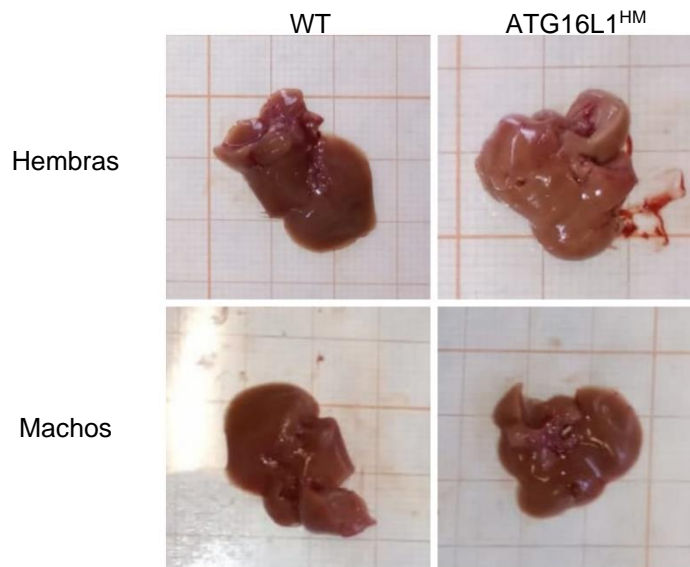


Fig. (15) Fotografías representativas de hígado recolectado a los 15 días post infección de ratones hembra y macho WT y ATG16L1^{HM}.

En la figura 15 se muestra el hígado de ratones hembra y macho al día del sacrificio, es importante destacar que en ratones ATG16L1^{HM} tanto machos como hembras hay una tonalidad más clara que los ratones WT, esto aún no se ha determinado, pero se atribuye a una tormenta de citocinas.

8.4.1.3 Los ratones ATG16L1^{HM} presentan mayor daño en colon



Fig. (16) Fotografías representativas de colon recolectado a los 15 días post infección de ratones hembra y macho WT y ATG16L1^{HM}. graficar longitud y peso del colon

En la figura 16 se muestra el colon de ratones hembra y macho el día del sacrificio, entre ratones hembra WT y ATG16L1^{HM} en se puede observar la presencia de diferencias morfológicas importantes. Los ratones ATG16L1^{HM} presentan mayor daño en el ciego. En ratones macho WT el colon se ve de mayor tamaño en comparación con las hembras y a su vez los ratones ATG16L1^{HM} presentan una mayor longitud y una coloración más oscura.

8.4.2 Lesiones en cerebro

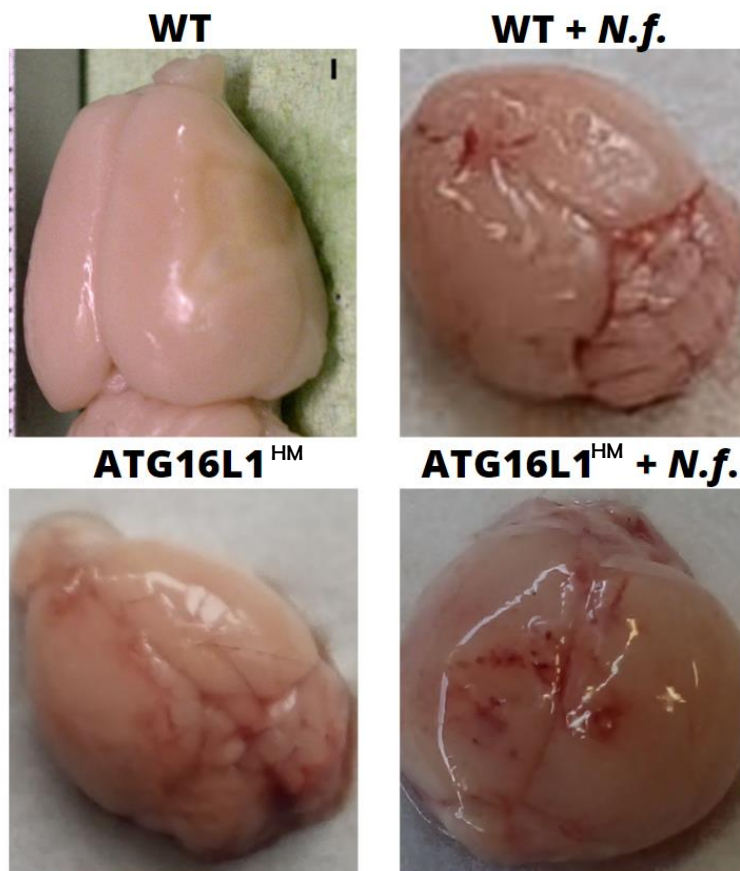
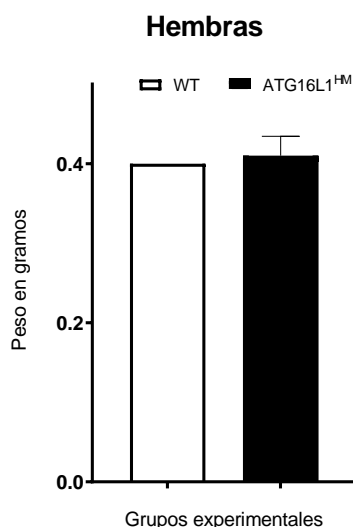


Fig. (17) Fotografías representativas del cerebro obtenidos de ratones WT & ATG16L1^{HM} con y sin infección, es evidente la pérdida significativa de la arquitectura del tejido en animales infectados. Son visibles múltiples lesiones en las meninges, además de la presencia de hemorragias.

En la figura 17 se muestran imágenes representativas del cerebro extraído de ratones WT y ATG16L1^{HM} sanos contra ratones WT y ATG16L1^{HM} infectados con *N. fowleri*, en ambos grupos se observa la pérdida de los surcos característicos de la masa encefálica, además de múltiples laceraciones e incluso hemorragias en lóbulos frontal y parietal. Otro elemento de importancia es la pérdida de firmeza del tejido cerebral, esto fue observado y registrado en todos los grupos experimentales pero en mayor medida en los ratones macho ATG16L1^{HM}.

8.4.2.1 Peso cerebral

A)



B)

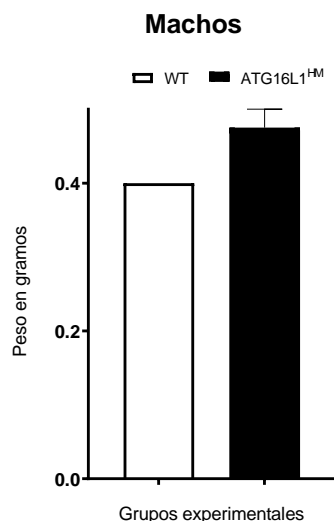


Fig. (18) Gráficas representativas del peso en gramos del cerebro de ratones hembra (A) y macho (B) WT y ATG16L1^{HM}.

Se pesó el cerebro para determinar si la infección con *N. fowleri* causa pérdida de masa encefálica, en la gráfica 18 A perteneciente a ratones hembra se observa que ambos grupos poseen pesos similares de 0.4 gramos, sin embargo, en el grupo de los ATG16L1^{HM} uno de los ratones poseía un peso menor de 0.35 gramos, esto fue asociado a la gravedad de los síntomas que presentaba ya que el ratón tenía casi nula movilidad y un alto daño en la anatomía cerebral, a su vez en la gráfica 18 B perteneciente a los ratones macho el grupo WT presenta un peso de 0.4 gramos mientras que los ratones ATG16L1^{HM} tienen un peso de 0.5 gramos, sin embargo 2 ratones mostraron una disminución de 0.05 gramos, de nuevo esto está asociado a la gravedad de síntomas en los ratones.

8.4.3 Lesiones en el globo ocular

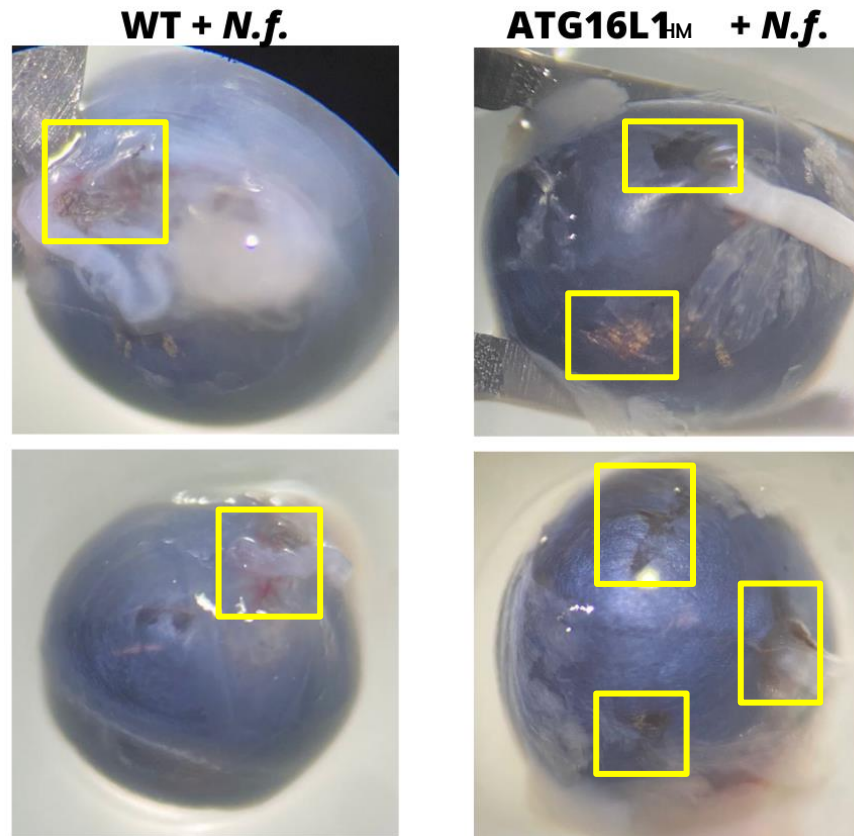


Fig. (19) Imágenes representativas de los cambios macroscópicos tras la infección con *N. fowleri*. Signos oculares como lesiones en el globo ocular.

La figura 19 presenta un panel de fotografías tomadas con el microscópio estereoscópico, en estas se muestra a los ratones macho WT y ATG16L1^{HM} infectados con *N. fowleri*, son imágenes representativas del daño que se observó durante el tiempo post infección en vista lateral y posterior del globo ocular.

En ambos grupos se observan lesiones mostradas en el recuadro amarillo, pero en los ratones ATG16L1^{HM} están presentes en mayor cantidad y más visibles, aún no se determina el papel que juega *N. fowleri* en estas lesiones oculares pero de acuerdo a la literatura éstas lesiones pueden ser cercanas a venas vorticosas.

8.4.3.1 Longitud axial del globo ocular

A)

B)

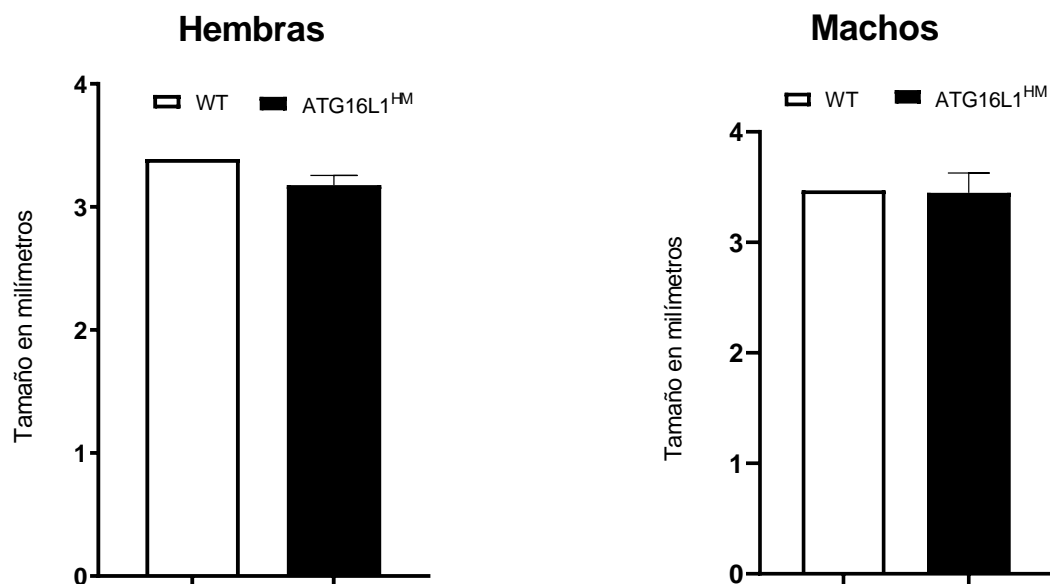


Fig. (20) Gráficas representativas de la longitud axial del globo ocular de ratones hembra y macho WT y ATG16L1^{HM}.

Para continuar el estudio prospectivo y saber si había daños anatómicos posteriores a la infección con *N. fowleri* se midió la longitud axial del ojo derecho, se presentan gráficas representativas de esto, la figura 20 A correspondiente a las hembras muestra que el tamaño del globo ocular es menor en los ratones ATG16L1^{HM}, en la gráfica B se observa un mayor tamaño del globo ocular en comparación con las hembras pero entre los ratones macho WT y ATG16L1^{HM} los ratones hipomórficos presentan una disminución en el tamaño en varios organismos, esto confirma que los ratones ATG16L1^{HM} tienen más daño tisular en diferentes órganos.

8.5 Análisis microscópicos

8.5.1 Cambios histopatológicos en cerebro

Como parte de los objetivos se determinó el daño histopatológico en cerebro resultante de la infección con *N. fowleri* a través de cortes histológicos teñidos con H&E.

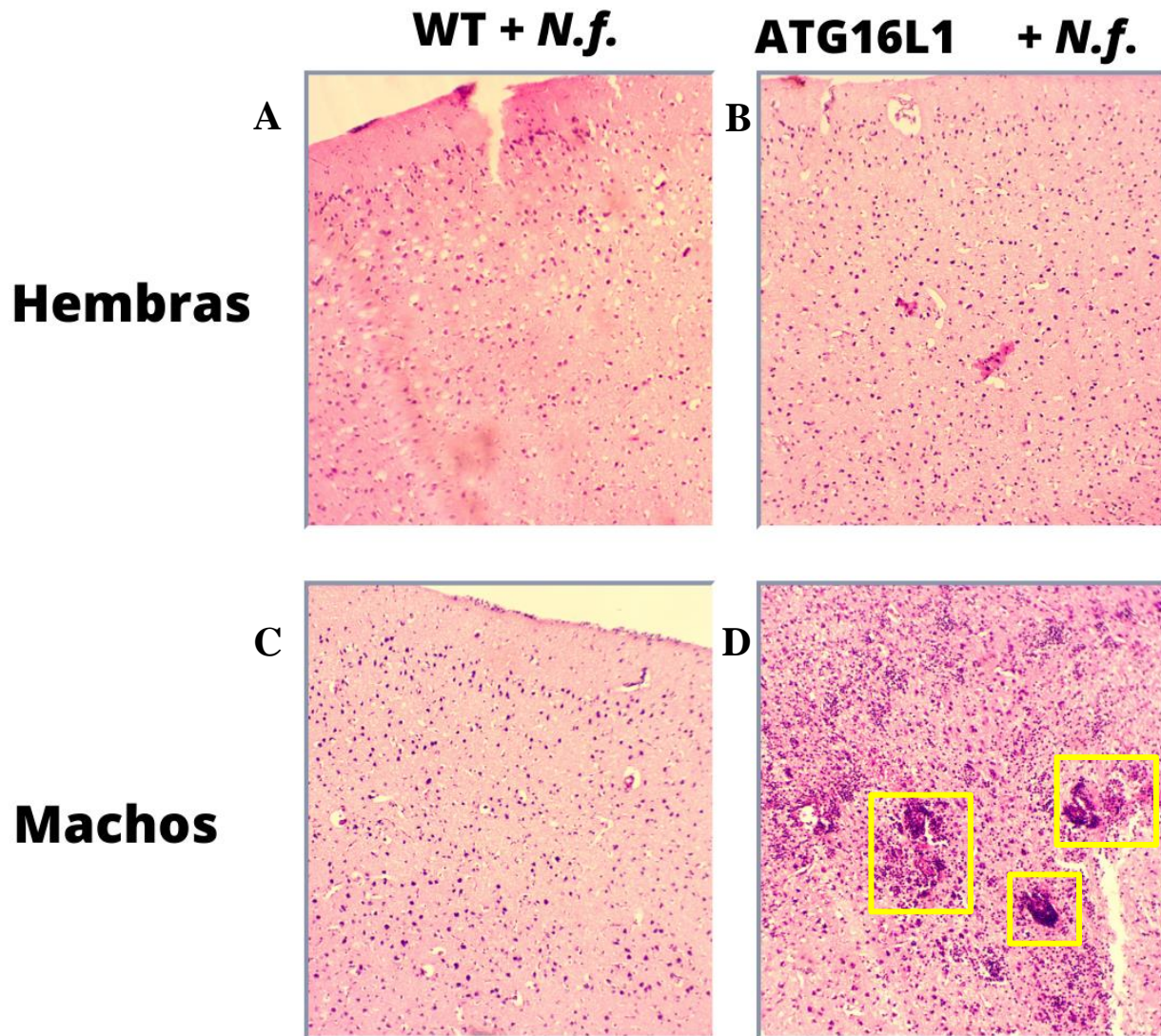


Fig. (21) Imágenes representativas de cortes histológicos del lóbulo frontal del cerebro, vistos al microscopio a 10X.

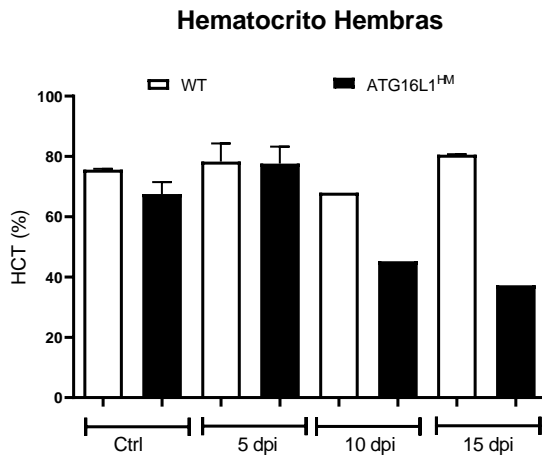
En la figura 21 se observan distintas imágenes representativas de cortes histológicos de cerebro de los 4 grupos experimentales, en el panel A perteneciente a una hembra WT podemos observar espacios que sugieren pérdida del parénquima, al compararlo con el panel B que pertenece a un ratón hembra ATG16L1^{HM} se observa una mayor cantidad de núcleos que sugieren un mayor infiltrado celular.

Si se observa el panel C perteneciente a un ratón macho WT se puede distinguir una mayor cantidad de núcleos de mayor tamaño pero al observar el panel D que es de un macho ATG16L1^{HM} es evidente la presencia de múltiples lesiones resaltadas en amarillo, dichas lesiones son compatibles con hemorragias presentes en lóbulo frontal y una parte del lóbulo parietal como se observa en las fotos de la figura 17, además se observa una mayor cantidad de células presentes en el tejido cerebral.

8.6 Hematocrito

Como parte del seguimiento decidimos realizar un hematocrito, para saber cuál es el porcentaje de células presentes en muestras de sangre total.

A)



B)

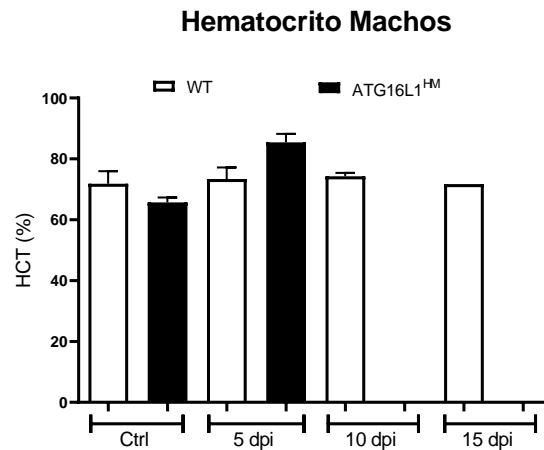


Fig. (22) Gráficas representativas del hematocrito realizado cada 5 días post infección.

En la figura 22 A correspondiente a las hembras podemos observar que en la toma control ya había una disminución de los glóbulos rojos en los ratones ATG16L1^{HM}, al día 5 post infección hubo un aumento del paquete celular en ambos grupos, al día 10 post infección bajo en un 10% en los ratones WT pero en los ATG16L1^{HM} hubo una disminución del 40%, lo que indica una disminución en la respuesta celular, por último al día 15 post infección observamos un aumento del 10% del paquete celular en los ratones WT mientras que en los ratones ATG16L1^{HM} hay una disminución del 5%, esto se correlaciona con la sobrevida de los ratones.

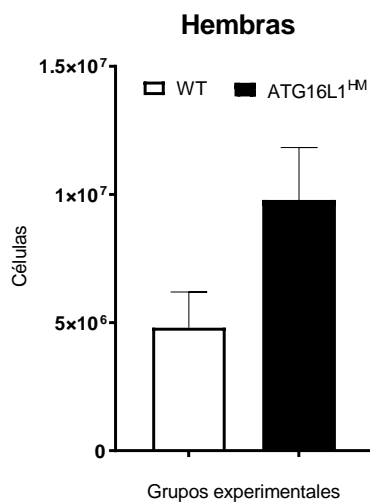
La gráfica B que corresponde a los ratones macho muestra que previo a la infección ya había una disminución en el porcentaje de los glóbulos rojos en los ratones ATG16L1^{HM} similar a los ratones hembra, al día 5 post infección en los ratones WT este porcentaje se mantiene pero en los ratones ATG16L1^{HM} aumenta en un 20%, esto denota un aumento en la proliferación celular, al día 10 post infección; en los ratones WT se mantiene el porcentaje pero al haber muerto los ratones ATG16L1^{HM} ya no se obtiene esta medida, al día 15 post infección baja en un 2% esto indica que la respuesta celular se mantiene de la misma forma que al inicio.

8.7 Cuantificación celular en bazo y ganglio

8.7.1 Ganglio submandibular

Con el objetivo de saber la cantidad de células que había en los ganglios submandibulares y en bazo se realizó el conteo de células totales en los grupos experimentales.

A)



B)

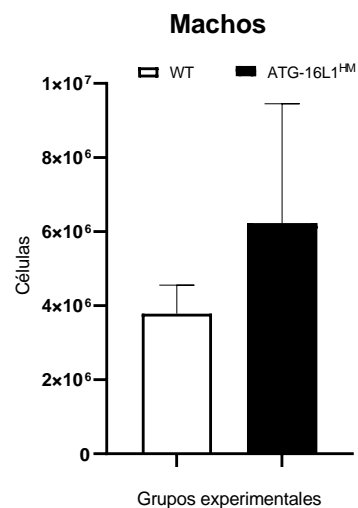
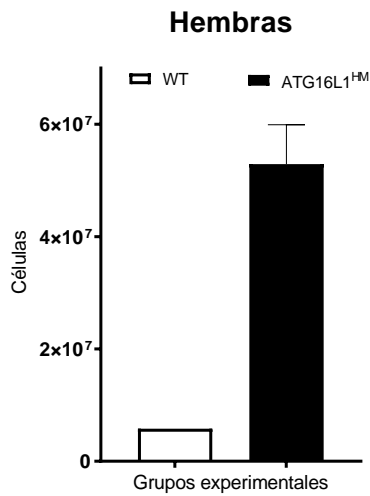


Fig. (23). Gráficas representativas de células totales obtenidas al hacer un macerado de ganglio submandibular. Los datos se muestran como el promedio y el error estándar.

En la figura 23 A se observa que en los ratones WT hay una disminución de estas células y en ATG16L1^{HM} se duplica la cantidad de estas, en la gráfica B se observa una tendencia similar, sin embargo, hay una menor cantidad de células, también se observa una amplia desviación estándar por lo que hubo ratones que no presentaban una proliferación celular indicando que era posible que la respuesta celular iba disminuyendo con el paso de los días.

8.7.2 Bazo

A)



B)

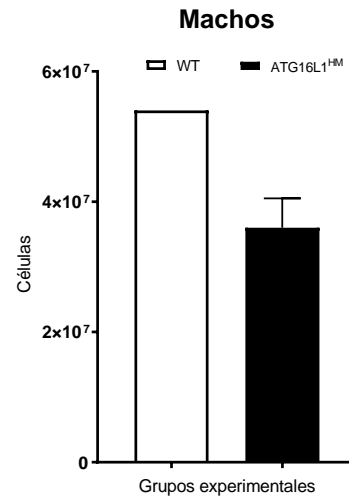


Fig. (24). Gráficas representativas de células totales obtenidas al hacer un macerado de bazo. Los datos se muestran como el promedio y el error estándar.

En la figura 24 A se observan las células de bazo, se puede notar que hay una tendencia similar ya que los ratones WT tienen una menor cantidad en comparación con los ratones ATG16L1^{HM}, pero al comparar con la figura B en donde se observan las células de bazo de ratones macho se encuentra el fenómeno opuesto ya que los ratones WT tienen un aumento en las células mientras que en los ATG16L1^{HM} hay una disminución de estas.

8.8 Cuantificación de interleucinas

Uno de los objetivos de este trabajo era cuantificar la producción de algunas citocinas, en cultivo de ganglio y bazo durante la infección y al término de esta.

8.8.1 Cuantificación de interleucinas en suero

Uno de nuestros objetivos era determinar las citocinas en circulación producidas durante el proceso infeccioso para conocer la progresión de la respuesta inmune a lo largo de 15 días por lo que se determinó en pg/mL las citocinas IL-13, IL-1 β y TNF- α .

8.8.1.1 Niveles de IL-13

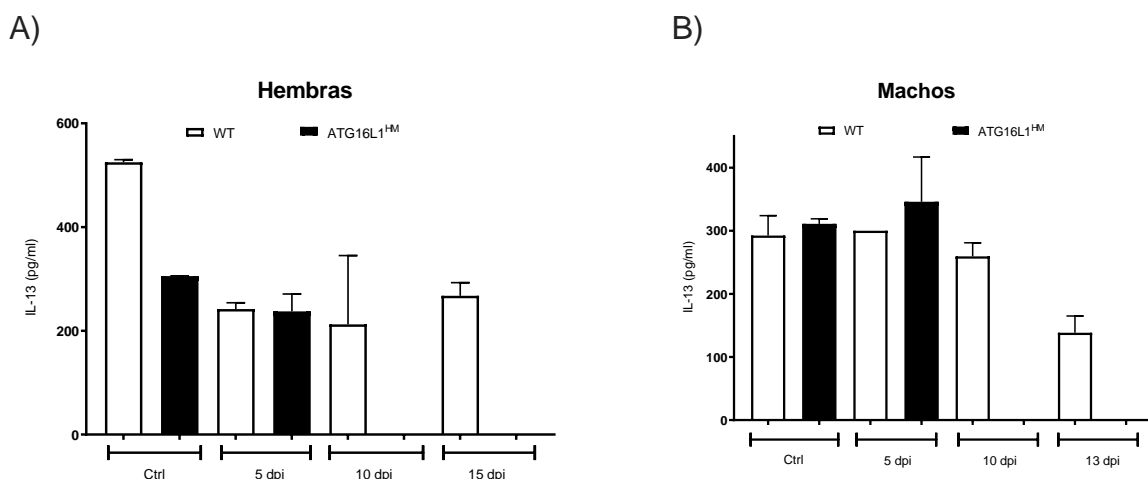


Fig. (25) Gráficas representativas de los niveles de citocina IL-13 en suero sanguíneo cada 5 días post infección.

En la figura 25 A se muestran los niveles IL-13 en sangre de ratones hembra, la toma control muestra que los ratones WT tienen niveles altos mientras que los ratones ATG16L1^{HM} muestran niveles menores, al día 5 post infección se muestra que en ambos grupos hay una disminución de IL-13, sin embargo, en los ratones WT disminuye al 50%, para el día 10 post infección los niveles de esta interleucina casi no disminuyeron pero en los ratones ATG16L1^{HM} ya no se está expresando, el día 15 post infección en los ratones WT hay un aumento de aproximadamente 100 pg y de nuevo en los ratones ATG16L1^{HM} esta citocina tiene niveles mínimos.

En la gráfica B perteneciente a los ratones macho se muestra la producción de citocinas, en donde se observa que previo a la infección las cantidades de ambos grupos son similares a las hembras ATG16L1^{HM}, al día 5 post infección esta citocina mantiene sus niveles en el grupo WT, mientras que en los ATG16L1^{HM} se presenta un aumento muy modesto, al día 10 post infección los niveles de los ratones WT

disminuyen modestamente, pero los niveles en los ratones ATG16L1^{HM} son mínimos, al día 15 post infección se observa que los ratones WT presentan una disminución, mientras que los ratones ATG16L1^{HM} de nuevo presentan niveles bajos.

8.8.1.2 ELISA para detección de IL-1 β

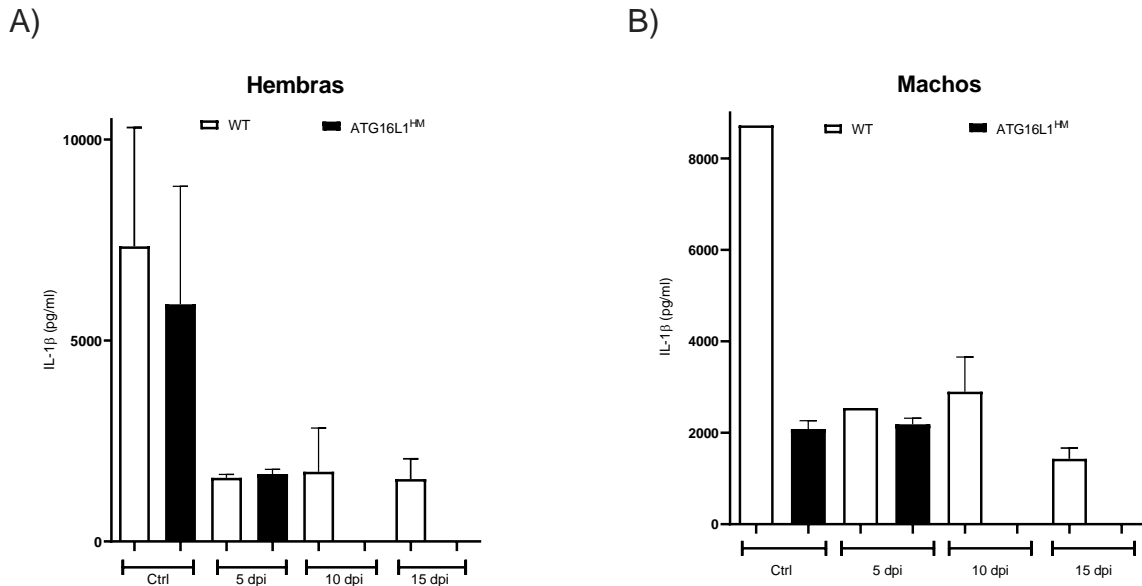


Fig. (26) Gráficas representativas de los niveles de citocina IL-1 β en suero sanguíneo cada 5 días post infección.

La figura 26 A muestra los niveles de IL-1 β de hembras, el día previo a la infección se observa que los ratones WT tienen niveles altos, mientras que los ATG16L1^{HM} tenían un nivel menor, al día 5 post infección en ambos grupos observamos una disminución de más de la mitad, al día 10 y 15 post infección en los ratones WT se mantenían los niveles de esta interleucina, pero en los ATG16L1^{HM} los niveles estaban por debajo del nivel de detección.

En la gráfica B se observa el nivel de IL-1 β en el suero de los machos, el día de la toma control los ratones WT mantenían niveles altos de esta interleucina mientras que los ratones ATG16L1^{HM} presentaron un reducción de aproximadamente el 70%, al día 5 post infección los ratones WT presentan una reducción similar mientras que los ATG16L1^{HM} mantienen estos niveles, al día 10 post infección los ratones WT aumentan muy poco estos niveles, mientras que los ratones ATG16L1^{HM} no tenían expresión de

estas citocinas, al día 15 post infección los ratones WT disminuyeron a la mitad esta interleucina mientras que los ATG16L1^{HM} no la expresaban.

8.8.1.3 Determinación de los niveles de TNF- α en muestras sanguíneas

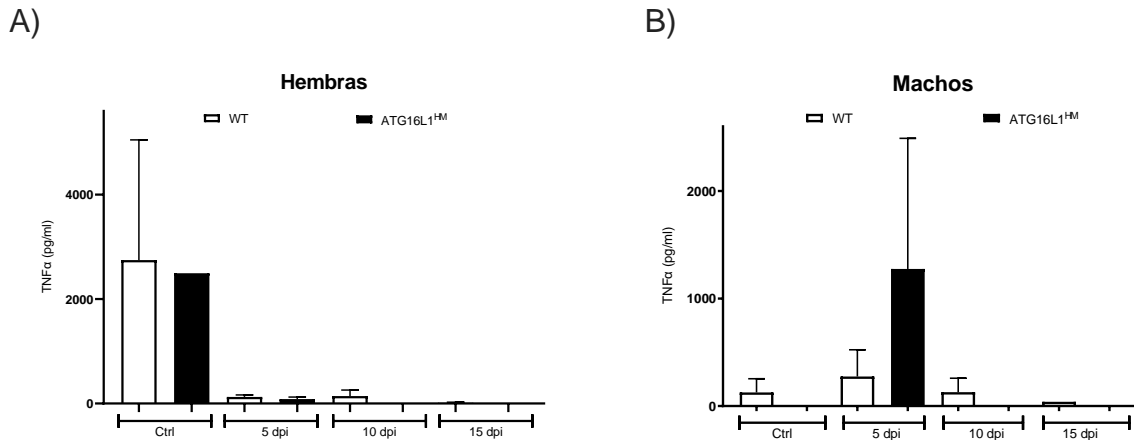


Fig. (27) Gráficas representativas de los niveles de citocina TNF- α en suero sanguíneo cada 5 días post infección.

La figura 27 A perteneciente a los ratones hembra el día de la toma control los ratones WT y ATG16L1^{HM} tienen niveles similares, al día 5 post infección en ambos grupos es el mínimo, el día 10 post infección los ratones WT aumentaron su producción mientras que los ATG16L1^{HM} presentaron niveles muy bajos, al día 15 post infección los WT casi no la expresaban mientras que en los ratones ATG16L1^{HM} no se detectó.

La gráfica B de los machos el día de la toma control los WT tenían muy poca expresión mientras que los ATG16L1^{HM} no la expresaban, el día 5 post infección los WT aumentaron muy poco su producción y los ATG16L1^{HM} la sobre produjeron, al día 10 post infección los WT disminuyeron a la mitad su secreción y los ATG16L1^{HM} de nuevo la dejaron de expresar, los WT al día 15 post infección presentaron cantidades mínimas de esta citocina mientras que los ATG16L1^{HM} mantuvieron la condición anterior.

8.8.2 Cuantificación de interleucinas en cultivo de ganglio

Otra parte de los objetivos era saber si había expresión de esta citocina en órganos linfoides secundarios, por lo que decidimos medir estas citocinas en el ganglio submandibular.

8.8.2.1 Niveles de IL-4

A)

B)

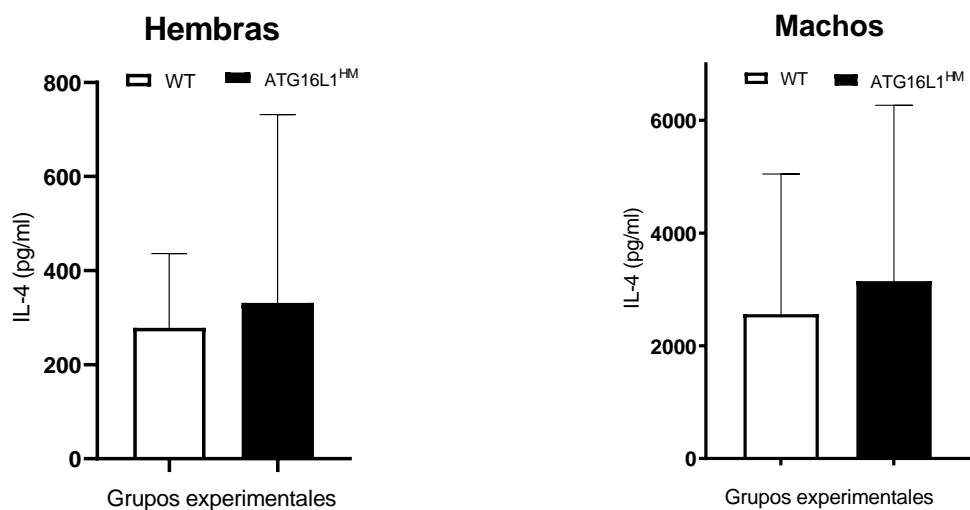
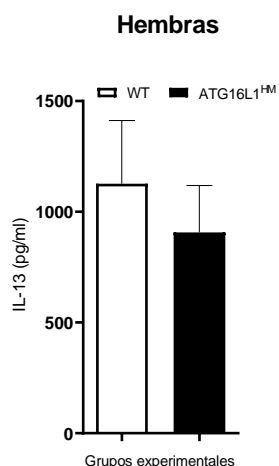


Fig. (28) Gráficas representativas de los niveles de citocina IL-4 en sobrenadante de cultivo de células de ganglio estimuladas con Concanavalina A.

La figura 28 A pertenece a las hembras, los ratones ATG16L1^{HM} producen en mayor cantidad estas citocinas que los ratones WT, en la gráfica B que pertenece a los machos se observa la misma tendencia en la que los ratones ATG16L1^{HM} la expresión de esta citocina es mayor que en la de los WT.

8.8.2.2 ELISA para cuantificación de IL-13

A)



B)

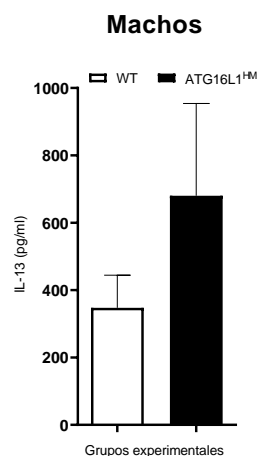
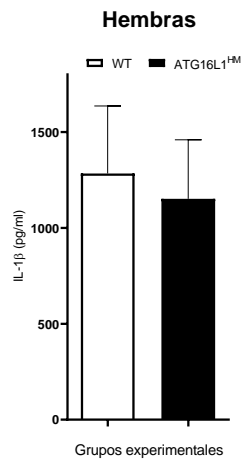


Fig. (29) Gráficas representativas de los niveles de citocina IL-13 en sobrenadante de cultivo de células de ganglio estimuladas con Concanavalina A.

En la figura 29 A de los ratones hembra se observa que los WT tienen una mayor expresión de la IL-13 que los ATG16L1^{HM}, la gráfica B de los machos presenta lo inverso, es decir los WT tienen una menor expresión de esta, a su vez los ratones ATG16L1^{HM} tienen una mayor expresión, además de que en los machos en ambos grupos se expresa en menores cantidades.

8.8.2.3 Niveles de IL-1 β

A)



B)

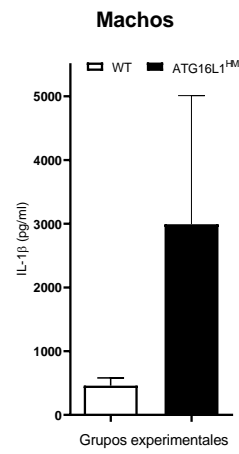
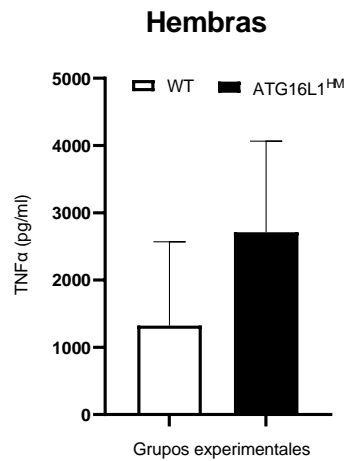


Fig. (30) Gráficas representativas de los niveles de interleucina IL-1 β en sobrenadante de cultivo de células de ganglio estimuladas con Concanavalina A.

En la gráfica A de la figura 30, la producción de la interleucina IL-1 β de las hembras los ratones WT la expresan en mayor cantidad que el otro grupo experimental, aunque no sea significativo, la gráfica B de los machos se invierte esto ya que los ratones WT la expresan en menor cantidad mientras que los ATG16L1^{HM} la sobre expresan.

8.8.2.4 TNF- α

A)



B)

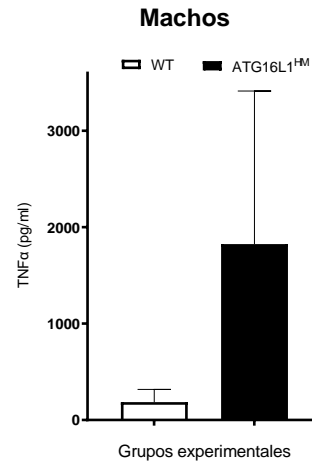


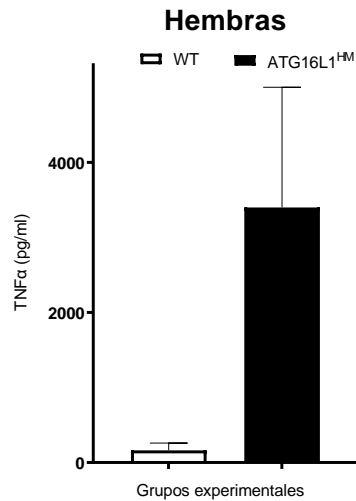
Fig. (31) Gráficas representativas de los niveles de citocina TNF- α en sobrenadante de cultivo de células de ganglio estimuladas con Concanavalina A.

La figura 31 A perteneciente a las hembras, los ratones WT expresan en menor cantidad esta citocina, a su vez en la gráfica B se repite esto, ya que los ratones WT la expresan en menor cantidad que los ATG16L1^{HM} y a su vez los ratones hembra la expresan más, esto en cultivo celular de ganglio obtenido al día 15 post infección y estimulados con Concanavalina A.

8.8.3 Cuantificación de interleucinas en bazo

8.8.3.1 TNF- α

A)



B)

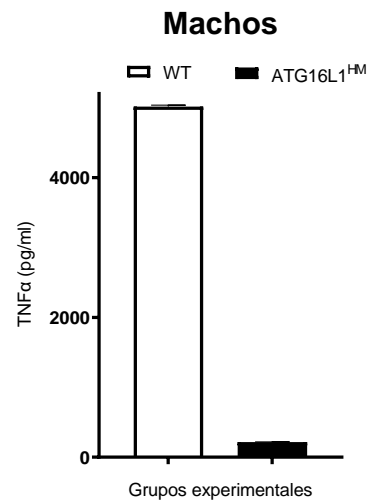


Fig. (32) Gráficas representativas de los niveles de citocina TNF- α en sobrenadante de cultivo de células de bazo estimuladas con Concanavalina A.

La figura 32 A que pertenece a las hembras muestra que los ratones WT casi no expresan TNF- α , mientras que los ratones ATG16L1^{HM} la sobre expresan, al compararla con los machos se ve lo contrario, los ratones WT sobre expresan esta citocina y los ATG16L1^{HM} casi no la expresan.

8.9 Citometría de flujo

Otro de los objetivos fue determinar las poblaciones celulares presentes en el ganglio submandibular, esto con el fin de determinar qué células están actuando de primera instancia en la respuesta inmune frente a la infección por *N. fowleri* a los 5 días post infección.

8.9.1 Análisis de poblaciones de linfocitos T en Ganglio

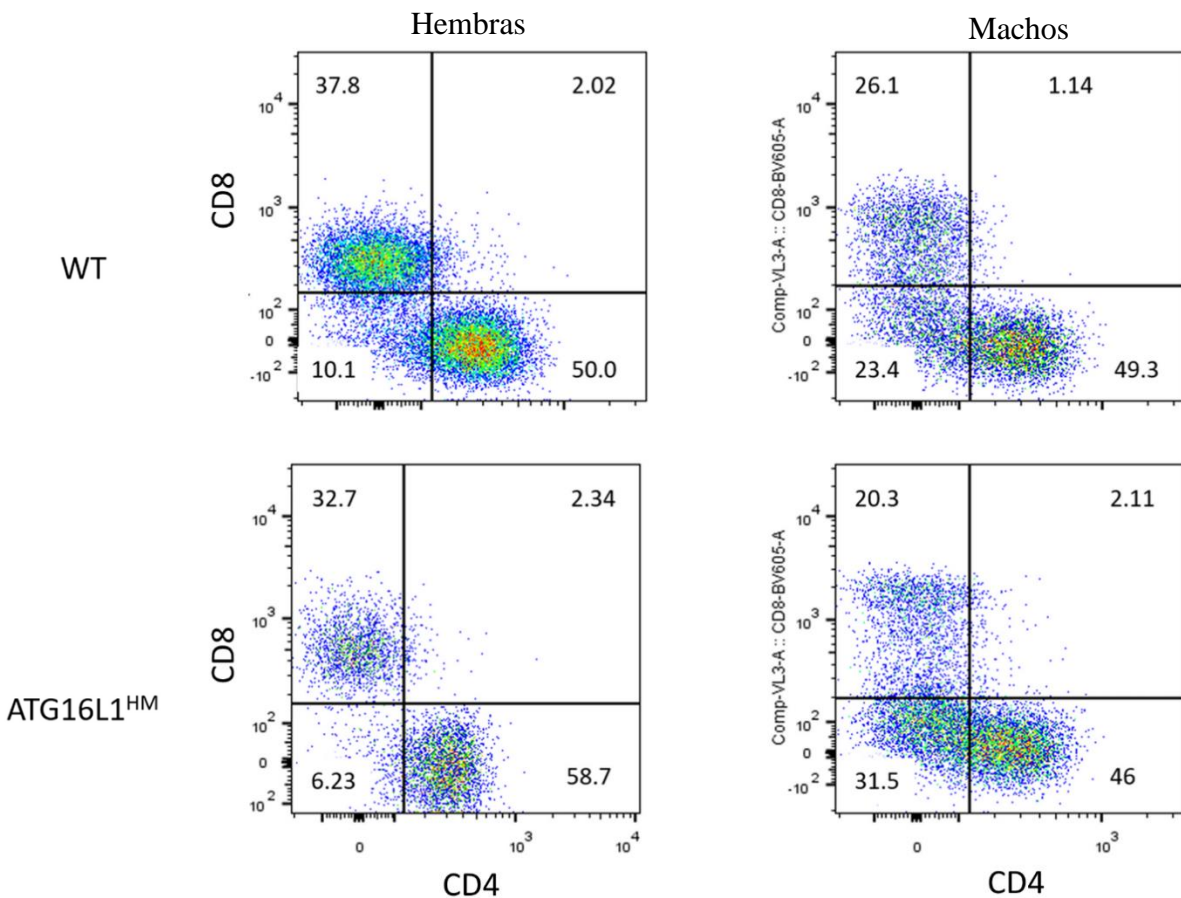


Fig. (33) Fotografía representativa de un plot de citometría de flujo de células de ganglio submandibular de ratones WT contra ratones ATG16L1^{HM} de hembras y machos al término de la infección. Se utilizaron los marcadores CD4⁺ y CD8⁺.

En la figura 33 se observa que en los ratones hembra WT hay una mayor cantidad de poblaciones de linfocitos tanto CD4⁺ como CD8⁺, sin embargo, en los ratones macho WT la población de linfocitos es menor, a su vez en los ratones hembra ATG16L1^{HM} hay una menor cantidad de ambas poblaciones celulares ya que disminuye, pero los ratones macho ATG16L1^{HM} tienen una disminución de más del 10% de ambas poblaciones celulares.

Un resultado importante a resaltar es la presencia de una tercer población de linfocitos en los ratones macho WT y ATG16L1^{HM}, no obstante, no se determinó a que fenotipo de linfocitos pertenece.

8.9.2 Análisis de poblaciones de Bazo

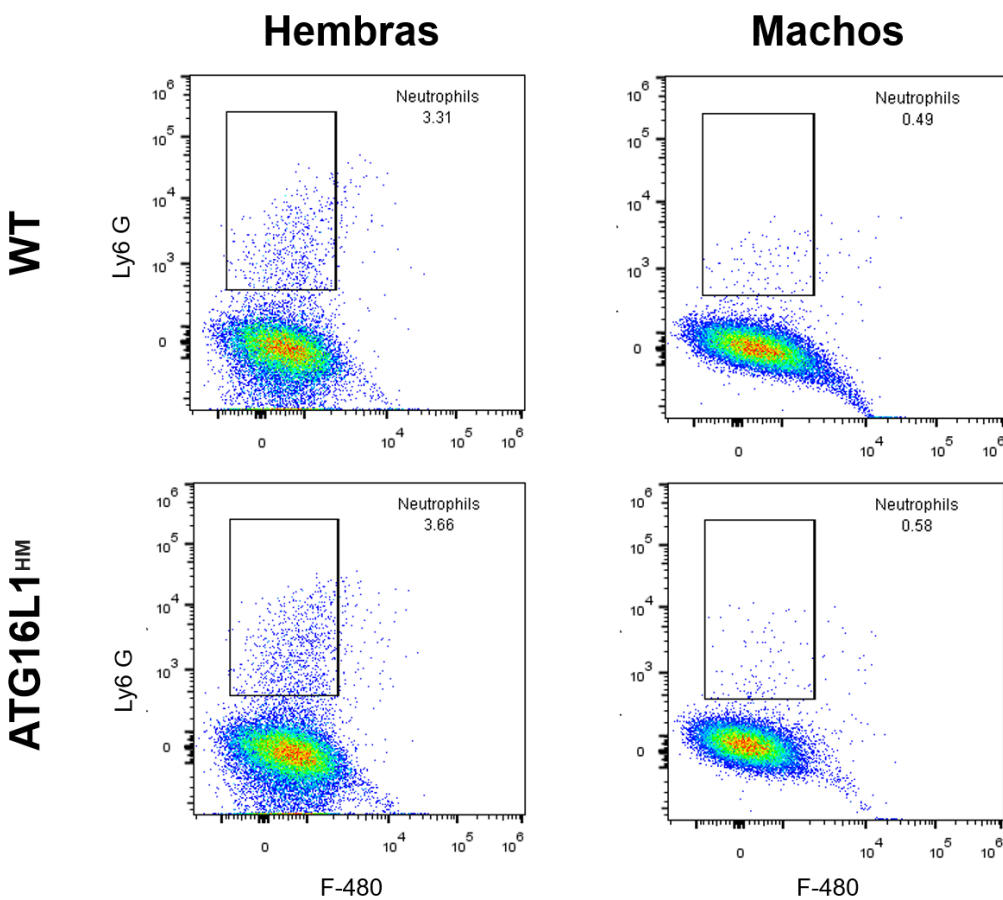


Fig. (34) Fotografía representativa de un plot de citometría de flujo de células de bazo de ratones WT contra ratones ATG16L1^{HM} de hembras y machos al término de la infección. Se utilizaron los marcadores Ly6 G y F-480.

En la figura 34 se observa que en los ratones hembra WT tienen una mayor cantidad de neutrófilos que los ratones WT macho, esta misma situación se repite en los ratones ATG16L1^{HM}, tanto hembras como machos.

9.- DISCUSIÓN

La autofagia es una parte fundamental de la respuesta inmune y las proteínas ATG son reguladores de una gran variedad de procesos que ocurren dentro de esta, hay muy poco conocimiento sobre la participación de la proteína ATG16L1 en patologías infecciosas del sistema nervioso central.

Lo primero que se debe de analizar son los resultados macroscópicos, McMillan en 1977 realizó una revisión de los datos de Stamm obtenidos en 1975 al realizar una tinción por inmunofluorescencia a tejido cerebral embebido en parafina de un prisionero de guerra que había estado desnutrido y debilitado que murió de manera súbita, en un principio se había hecho un diagnóstico de infección por *Iodamoeba bütschlii*, sin embargo al realizar esta tinción se comprobó que la muerte fue causada por *N. fowleri*, esto provocó que la infección se diseminara y provocara daños en diferentes órganos como el estómago provocando úlceras, en el tracto intestinal (intestino delgado, ciego, colon ascendente y transversal), en los ganglios mesentéricos y en ambos pulmones, esto se compara con los resultados que se observan en las figuras 14, 15 y 16 en donde se observa que los ratones ATG16L1^{HM} que poseen un defecto en la expresión de esta proteína tienen un mayor daño anatómico visible en el bazo, colon e hígado.

De acuerdo a los resultados macroscópicos observados en la figura 13 se observan lesiones oculares nunca antes reportadas, sin embargo, en casos de infección por *Acanthamoeba* que también pertenece al grupo de las amebas de vida libre se ha reportado que causa queratitis amebiana, atacando directamente la córnea del individuo (Schuster, F & Visvesvarab, G., 2004), esto se atribuye a falta de higiene al uso de lentes de contacto, las lesiones provocan un trauma por daño físico a la córnea lo que provoca la entrada directa e indirecta al estroma subyacente a la córnea (Jones, D. et. al., 1975).

A su vez Stehr y colaboradores en 1989 recopilaron datos que indicaban que los hombres tenían mayor probabilidad de desarrollar queratitis por infección amebiana directa mientras que en las mujeres es por infección indirecta debido al uso de lentes de contacto, a su vez solo está involucrado uno de los dos ojos, esto se puede comparar con los datos obtenidos durante este trabajo ya que la incidencia de las lesiones oculares fue predominante en los ratones macho WT y ATG16L1^{HM} en el ojo izquierdo.

Al comparar los resultados microscópicos se sabe que los trofozoítos de *N. fowleri* debido a la proximidad con el punto de entrada llegan a los lóbulos frontales y olfatorios, también se han observado en la base del cerebro, el hipotálamo, y el mesencéfalo (Martínez 1985), la figura 17 muestra una reacción inflamatoria severa en los ratones hipomórficos para la proteína ATG16L1, además de necrosis, a su vez se ha reportado que en las regiones perivasculares del cerebro hay grandes cantidades de núcleos (Schuster, F: & Dunnebacke, T., 1977), esto se refleja en la figura 21 en donde se observan células alrededor de estas regiones.

En experimentos *in vitro* con células de la microglia expuestas a *N. fowleri* se liberan citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β (Lee, Y., *et. al.*, 2007), esto fue observado en los experimentos en las figuras 26 y 27 que pertenecen a los datos obtenidos de suero, en ambas se muestran mayores cantidades de estas interleucinas en los machos.

10.- CONCLUSIÓN

La proteína autofágica ATG16L1 es un regulador negativo de la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección experimental con *N. fowleri*, esto a futuro nos puede llevar a la búsqueda de nuevas formas de aumentar su expresión impidiendo la exacerbación de la inflamación durante la patogenia.

11.- ANEXOS

+ Bromuro de Etidio

Stock 1000 x solución 0.5mg/mL

50mg Bromuro de Etidio

10mL Agua

Diluir 1:1000, proteger de la luz.

+ Buffer de lisis (Laird, W. P., *et. al.*, 1991)

200 mM NaCl

5 mM Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA)

0.2% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)

100 mM Tris HCL pH8.5

Se afora a 1L.

+ Fijador de ZINC

2.12g Tris Base

0.1g Acetato de Calcio

160mL Agua

1g Acetato de Zinc

1g Cloruro de Zinc

Se afora a 200mL, pH 7.2-7.4

+ Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA)

0.17M Tris base

0.16g NH₄Cl

300 mL Agua

✚ PBS- Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos

80g NaCl
11.6g Na_2PO_4
2g KH_2PO_4
2g KCl

Para 10L, pH 7.4

✚ Sustrato ABTS

150mg ABTS
500mL Agua
0.1g Ácido cítrico

Llevar a un pH 4.35 con NaOH.

✚ Buffer de FACS

0.1% Azida de Sodio (NaN_3)
1% Suero fetal Bovino (SFB)

En 1L de PBS.

12.- REFERENCIAS

12.1 Bibliografía citada

Adl, S. M., Simpson, G. A., Andersen, A., Anderson, O. R., Barta, J.R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensible, R. A., Frederiq, S., James, T., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Carril, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 52:5, 399-451.

Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C. D., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S., & Virgin, H. W., 4th (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456:7219, 259–263.

Cervantes, I., Serrano, J., Meza, P., Arroyo, R., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2009). *Naegleria fowleri* induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation. *Microbiology*. 155:11, 3739-3747.

Cervantes, I., Serrano, J. J., Pacheco, J., Silva, A., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2010). Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expresión of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitology Research*. 106, 695-701.

CDC. (n.d.). <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/index.html>

Cline, M., Carchman, R. & Marciano-Cabral, F. (1986). Movement of *Naegleria fowleri* stimulated by mammalian cells *in vitro*. *The Journal of Protozoology*. 33:1, 10-13.

Cursons, R. T., Brown, T. J. & Keyes, E. A. (1978). Virulence of pathogenic free- living amoebae. *J. Parasitology*. 64, 744-745.

Chang, S. L. (1979). Pathogenesis of pathogenic *Naegleria amoeba*. *Folia Parasitologica*. 26:3, 195-200.

Chu, T., Ferguson, T., Marciano, F. (2005). Protein Kinase Activation and Protein Phosphorylation in *Naegleria fowleri* Amebae in Response to Normal Human Serum. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47:1, 40-47.

Chu, D. M. T., Ferguson, T. J. & Marciano, F. (2005). Protein Kinase activation and protein phosphorylation in *Naegleria fowleri* amebae in response to normal human serum. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47:1, 40-47.

Ferrante, A. & Thong, Y. H. (1979). Antibody induced capping and endocytosis of Surface antigens in *Naegleria fowleri*. *International Journal for Parasitology*. 9:6, 599-601.

Fowler, M. y Carter, R.F. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br. Med. J.* 2, 740-742.

Fritzinger, A. E. & Marciano, F. (2004). Modulation of a "CD59-like" Protein in *Naegleria fowleri* Amebae by Bacteria. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51:5, 522-528.

Fritzinger, A. E, Toney, D. M., MacLean, R. C. & Marciano, F. (2006). Identification of a *Naegleria fowleri* Membrane Protein Reactive with Anti-Human CD59 Antibody. *Infection and Immunity*. 74, 1189-1195.

Hamaoui, D. & Subtil, A. (2021). ATG16L1 functions in cell homeostasis beyond autophagy. *The Febs Journal*. 289:7, 1779-1800.

Han, K.L., Lee, H. J., Shin, M. H., Shin, H. J., Im, K. I. & Jung, P. S. (2004). The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitology Research*. 94, 53-60.

Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F. & Leippe, M. (2002). Pore-forming Polypeptides of the Pathogenic Protozoon *Naegleria fowleri**. *Journal of Biological Chemistry*. 277:25, 22353-22360.

Herbst, R., Marciano-Cabral, F. & Leippe, M. (2004). Antimicrobial and Pore-forming Peptides of Free-living and Potentially Highly Pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *Journal of Biological Chemistry*. 279:25, 25955-25958.

Huang, J. & Brumell, J. H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nature reviews. Microbiology*. 12:2, 101-114.

Hysmith, R. M., Franson, R. C. (1982). Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Lipids and Lipid Metabolism*. 711:1, 26-32.

Im, K. I., Ryu, J. S. & Lee, K. T. (1987). Immunodepression during experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. *Parasites, Hosts and Diseases*. 25:2, 195-198.

Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, UeA., Tahir, IM., Akram, M., Ali Shah, SM., Zulfqar, A., Zainab, R. (2020). *Naegleria fowleri*: sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 47, 199 – 212.

Jonckheere, J. F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*. 11:7, 1520-1528.

John, D. T., Cole, T.B. Jr. & Bruner, R. A. (1985). Amebostomes of *Naegleria fowleri*. *Journal of Protozool.* 32, 12-19.

Jones, D. B., Visvesvara, G. & Robinson, N. (1975). *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveítis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol. Soc. Uk.* 95, 221-232.

Laird, W. P., et. al., (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research.* 19:15, 4293).

Lee, Y. J., Kim, J. H., Jeong, S. R., Song, K. J., Kim, K., Park, S., Park, S. P. & Shin, H. J. (2007). Production of Nfa1-specific monoclonal antibodies that influences the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* trophozoites on microglial cells. *Parasitology Research.* 101, 1191-1196.

Maciver, S. K., Piñero, J. E. & Lorenzo, J. (2020). Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite?. *Trends Parasitology.* 36:1, 19-28.

Marciano- Cabral, F. (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Reviews.* 52:1, 114-133.

Martínez, A. J. (1977). Free-living amebic meningoencephalitides: comparative study. *Neurol Neurocir Psiquiatr.* 18:2-3, 391-401.

Martínez, A. J. (1985). Free- living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. CRC Press, Boca Raton. 156.

Mao, J., Lin, E., He, L., Yu, J., Tan, P. & Zhou, Y. (2019). Autophagy and Viral Infection. *Advances in experimental medicine and biology.* 1209, 55-78.

McMillan, B. (1977). Diagnostic review of Derrick's case of generalized amoebiasis (? *Iodamoeba butschlii*). *Pathology*. 9:1, 76.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell*. 15:3, 1101-1111.

Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine*. 19, 983-997.

Ortolano, S., Fernández, J. J. & San-Millán, B. (2021). Primary Amoebic Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and Treatments. *Biomolecules*. 11:9, 1320.

Piñero, J. E., Chávez, B., Omaña, M. & Lorenzo, J. (2019). *Naegleria fowleri*. *Trends in Parasitology*. 35:10, 848-849.

Rojas, S., Jarillo, A., Rodríguez, M., Moreno, L. & Campos, R. (2004). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitology Research*. 94, 31-36.

Shin, H. J., Cho, M. S., Jung, S. Y., Kim, H. I., Park, S., Kim, H. J. & Im, K. I. (2005). Molecular Cloning and Characterization of a Gene Encoding a 13.1 kDa Antigenic Protein of *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 48:6, 713-717.

Schuster, F. L. & Dunnebacke, T. H. (1977). Ultrastructural Observations of experimental *Naegleria* Meningoencephalitis in mice: Intranuclear Inclusions in Amebae and host cells*. *The Journal of Protozoology*. 24:4, 489-497.

Schuster, F. L. & Rechthand, E. (1975). In vitro effects of Amphotericin B on Growth and Ultrastructure of the Amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 8, 591-605.

Schuster, F. & Visvesvarab, G. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 34:9, 1001-1027.

Siddiqui, R., Ibne, K. A., Cope, J. R., y Naveed, A. K. 2016. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Tropica*. 164, 375-394.

Song, K. J., Jang, Y. S., Lee, Y. A., Kim, K. A., Lee, S. K. & Shin, M. H. (2011) Reactive oxygen species dependent necroptosis in Jurkat T cells induced by pathogenic free-living *Naegleria fowleri*. *Parasite Immunology*. 33:7, 390-400.

Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. (22 de agosto del 2001). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Stehr-Green, J, Bailey, T. & Visvesvara, G. (1989). The epidemiology of *Acanthamoeba keratitis* in the United States. *Am. J. Ophthalmol*. 107, 331-336.

Symmers, W. C. (1969). Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br. Med. J*. 449-454.

Visvesvara, G. S. (2013). Chapter 10- Infections with free- living amebae. *Handbook of Clinical Neurology*. 114, 153-168.

Visvesvara, G. S., Moura, H. & Schuster, F. L. (2006). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba spp.*, *Balamunthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 50:1, 1-26.

Wang, Y., Sharma, P., Jefferson, M., Zhang, W., Bone, B., Kipar, A., Bitto, D., Coombes, J. L., Pearson, T., Man, A., Zhekova, A., Bao, Y., Tripp, R. A., Carding, S. R., Yamauchi, Y., Mayer, U., Powell, P.P., Stewart, J. P. & Wileman, T. (2021). Non-canonical autophagy functions of ATG16L1 in epithelial cells limit lethal infection by influenza A virus. *The EMBO Journal*. 40, e105543.

Xiong, Q., Li, W., Li, P., Yang, M., Wu, C. & Eichinger, L. (2019). The role ATG16 in Autophagy and the Ubiquitin proteasome system. *Cells*. 8:1, 2.

Yang, G. & Kaer, L. V. (2021). Therapeutic targeting of Immune Cell Autophagy in Multiple Sclerosis: Russian Roulette or Silver Bullet. *Front Immunogy*. 12, 724108.

Young, J. D. & Lowrey, D. M. (1989). Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic amoeboid flagellate *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem*. 264, 1077-1083.

12.2 Bibliografía consultada

Cooney, R., Baker, J., Brain O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D. J., Campbell, B. J., Jewell, D., Simmons, A. (2011) NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 16, 90-97.

Li C, et. al. (2006). Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J Immunol.* 177:5163–5168.

Levine, B. y Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 767-777.

Munz, C. (2009). Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev. Immunol.* 27, 423-449.

Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature.* 455:396–400.

Paludan, C., et. al. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science.* 307:593–596.

Schmid, D., Pypaert, M. y Munz, C. (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*, 26:79–92.

Schmid, D. y Munz, C. (2007). Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity.* 27: 11-21.

Wong, W. T., Li, L. H., Rao, Y. K., Yang, S. P., Cheng, S. M., Lin, W. Y., Cheng, C. C., Chen, A. & Hua, K. F. (2018). Repositioning of the β -Blocker Carvedilol as a Novel

Autophagy Inducer that Inhibits the NLRP3 Inflammasome. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01920>

Young, J. D. & Lowrey, D. M. (1989). Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic amoebic flagellate *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* 264, 1077-1083.