



Universidad de Costa Rica
Sede Rodrigo Facio Brenes
Facultad de Microbiología

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET)
Departamento de Parasitología, Sección de Protozoología Médica

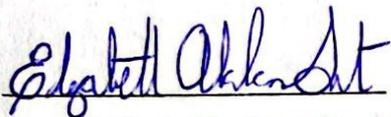
Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica

**Caracterización de dos aislamientos clínicos autóctonos de *Naegleria fowleri*:
determinación de factores de virulencia y susceptibilidad a fármacos comerciales.**

Natalia Chacón Camacho
Carné: B81991

Julio, 2023

Los que aquí firmamos damos fe de que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



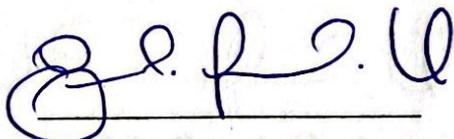
Dra. Elizabeth Abrahams Sandí

Tutora



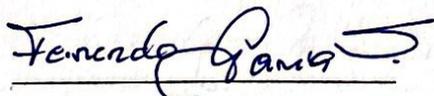
Dra. Lissette Retana Moreira

Lectora



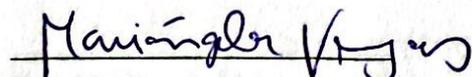
Dra. Erika Camacho Umaña

Lectora



Dr. Fernando García Santamaría

Presidente del Tribunal



Dra. Mariángela Vargas Arroyo

Profesora designada

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por todo el apoyo, motivación, cariño y paciencia durante todos estos años.

Al Departamento de Protozoología Médica de la Facultad de Microbiología, por abrirme las puertas para realizar esta investigación. Especialmente, a la Dra. Elizabeth Abrahams y a la Dra. Lissette Retana, por la confianza, guía, motivación y disposición que tuvieron durante todo este proceso y por haberse convertido en más que tutoras, amigas y consejeras de vida. Además, a María Fernanda Steller, por haber sobrellevado todo este proceso juntas y llegar a ser una gran amiga y un apoyo fundamental.

A mis amigos y compañeros de carrera, especialmente a Diego, Luis Carlos, Lucía, Daniela, Mónica, Erick, José Miguel y Fabián, por haber estado presentes en diferentes etapas de la carrera y ser esa luz que siempre hizo todo más fácil, ligero, divertido e inolvidable.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	- 6 -
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	- 7 -
Justificación	- 7 -
Hipótesis	- 8 -
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	- 9 -
1.1. Amebas de vida libre: <i>Naegleria fowleri</i>	- 9 -
1.2. Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP)	- 11 -
1.3. Patogénesis y respuesta inmune	- 13 -
1.4. Epidemiología y prevención	- 15 -
1.5. Tratamiento de la MAP	- 19 -
1.6. Perspectiva a futuro	- 21 -
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	- 22 -
Objetivo general.....	- 22 -
Objetivos específicos	- 22 -
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	- 23 -
3.1. Aislamientos de la ameba <i>N. fowleri</i>	- 23 -
3.2. Cultivo axénico y mantenimiento de los aislamientos de <i>N. fowleri</i>	- 23 -
3.3. Preparación de lisados celulares	- 23 -
3.4. Preparación de medios condicionados	- 23 -
3.5. Cuantificación proteica de los lisados celulares y medios condicionados.....	- 24 -
3.6. Determinación del perfil proteico e identificación de proteasas.....	- 24 -
3.6.1. Determinación del perfil proteico total.....	- 24 -
3.6.2. Determinación de proteasas mediante zimografía.....	- 25 -
3.6.3. Estudio de proteómica de los medios condicionados para la determinación de proteínas	- 25 -
3.7. Pruebas del efecto citopático	- 26 -
3.7.1. Línea celular	- 26 -
3.7.2. Capacidad de daño celular por parte de los trofozoítos de la ameba y por los medios condicionados	- 26 -

4.	Pruebas de susceptibilidad a fármacos.....	- 30 -
4.1.	Susceptibilidad de las amebas al dimetilsulfóxido (DMSO).....	- 31 -
4.2.	Ensayo de susceptibilidad a la miltefosina, voriconazol y anfotericina B	- 31 -
5.	Análisis estadísticos.....	- 34 -
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....		- 35 -
4.1.	Determinación del perfil proteico total de los lisados completos de <i>N. fowleri</i>	- 35 -
4.2.	Determinación de proteasas en medio condicionado y lisados completos de trofozoítos de <i>N. fowleri</i> mediante zimografía	- 36 -
4.2.1.	Zimografías de los medios condicionados de los aislamientos de <i>N. fowleri</i>	- 36 -
4.2.2.	Zimografías de los lisados completos de los trofozoitos de <i>N. fowleri</i>	- 37 -
4.3.	Estudio de proteómica de los medios condicionados obtenidos del cultivo axénico de los aislamientos clínicos de <i>N. fowleri</i>	- 39 -
4.4.	Pruebas del efecto citopático	- 41 -
4.4.1.	Prueba de viabilidad de células Vero con cristal violeta.....	- 41 -
4.4.2.	Prueba de viabilidad de células Vero mediante medición de deshidrogenasa láctica (DHL).....	- 44 -
4.4.3.	Prueba de viabilidad de las células Vero con los medios condicionados de las amebas	- 45 -
4.5.	Pruebas de susceptibilidad a fármacos.....	- 48 -
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN		- 49 -
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....		- 66 -
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		- 69 -

RESUMEN

Las amebas de vida libre son protozoarios asociados a infecciones incidentales humanas del sistema nervioso central. Existen tres géneros principales causantes de estas infecciones (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, y *Naegleria*), y dentro del género *Naegleria*, la especie termófila *Naegleria fowleri* es la única patógena. Esta ameba está distribuida globalmente y causa una rara y severa enfermedad llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), especialmente en niños y jóvenes que practican actividades acuáticas recreacionales. Debido a la falta de estrategias diagnósticas rápidas y tratamientos eficaces, esta infección tiene una tasa de mortalidad de más del 97%. En Costa Rica se han diagnosticado 3 casos de MAP, todos durante el año 2020, de los cuales fue posible obtener los primeros dos aislamientos en cultivo axénico en la historia del país, denominados Guanacaste (Gu) y Limón (Li). El objetivo del presente trabajo es comparar los factores de virulencia y perfiles de susceptibilidad a fármacos comerciales de estos dos aislamientos autóctonos de *N. fowleri*. Para esto, se realizaron electroforesis SDS-PAGE y zimografías para evaluar el perfil proteico total y de proteasas, respectivamente. Además, se evaluó el efecto citopático de los trofozoítos y los medios condicionados (MC) sobre la línea celular Vero, mediante una serie de experimentos que incluyeron tinciones con cristal violeta, pruebas de viabilidad mediante la cuantificación de deshidrogenasa láctica (DHL), pruebas de viabilidad con el reactivo PrestoBlue® y un estudio proteómico para identificar las principales proteínas secretadas. Finalmente, se evaluaron las concentraciones mínimas inhibitorias 50% (MIC50, por sus siglas en inglés) de la anfotericina B, miltefosina y voriconazol sobre los aislamientos. Los resultados indican que los aislamientos presentan perfiles proteicos similares y proteasas de serina de más de 100 kDa, con una mayor actividad a un pH básico de 8.5. Se identificaron menos proteínas en el aislamiento Li (21) que en Gu (64) y destacó la presencia común de catepsinas, deshidrogenasas, aldolasas, lipasas, ceramidasa, factor de elongación alfa y la fowlerpaína. Al evaluar la liberación de DHL al medio, se evidenció un mayor porcentaje de citotoxicidad a las 5 horas de incubación con células Vero en Gu (23,0%) que en Li (10,3%). Además, se comprobó que ambos MC causan muerte celular por un mecanismo no lítico. Por último, se observó que ambos aislamientos son susceptibles a la miltefosina (MIC50: 2,5 µg/mL, en ambos casos), pero presentaron una elevada MIC50 a la anfotericina B (MIC50: 15,62 µg/mL (Gu) y 31, 25 µg/mL (Li)) y no se vió un efecto inhibitor con el voriconazol.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Justificación

La ameba de vida libre *Naegleria fowleri*, que habita en fuentes de agua natural de muchos sitios turísticos de nuestro país y del mundo, es el agente etiológico de la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), una enfermedad del sistema nervioso central que afecta principalmente a la población infantil y adultos jóvenes. Si bien los casos detectados a nivel mundial son pocos, su alta tasa de letalidad (mayor al 97%) la convierte en un problema de salud pública (Centers for Disease Control and Prevention, 2015).

A pesar de los recientes avances en la comprensión del cuadro, aún no se conoce con exactitud la patogénesis de la enfermedad y, actualmente, la carencia de medicamentos eficaces, así como la ausencia de técnicas para un diagnóstico temprano que permita diferenciarla de cuadros similares (como, por ejemplo, la meningitis bacteriana), se constituyen en los principales retos para los grupos de investigación que trabajan con este agente.

En Costa Rica se tiene registro de cuatro casos de MAP causados por cepas autóctonas de *N. fowleri*, de los cuales tres resultaron fatales. De estos casos reportados, tres fueron reportados y diagnosticados propiamente en el país durante el año 2020 (Abrahams-Sandí *et al.*, 2015; Retana Moreira *et al.*, 2020). En dos de estos últimos casos fue posible aislar la ameba, logrando, por primera vez en la historia del país, su cultivo axénico.

A nivel mundial, debido a la poca cantidad de casos reportados, existen pocos aislamientos clínicos con los que se puedan realizar investigaciones, por lo que contar con los dos primeros aislamientos de *N. fowleri* en Costa Rica es muy valioso para poder describir y comparar el comportamiento de las cepas que circulan a nivel local.

Con este trabajo se pretende caracterizar estos aislamientos para aportar la primera información sobre sus factores de virulencia y comparar la capacidad que estos tienen de causar un daño celular “*in vitro*”. Se incluyen análisis sobre el perfil de susceptibilidad a los medicamentos que más se recomiendan para el manejo de estos cuadros, entre ellos la anfotericina B y la miltefosina, con el fin de guiar los esquemas de tratamiento en futuros

casos que se presenten, para que se haga un manejo rápido e intentar disminuir la cantidad de casos fatales. Se espera que los resultados de esta investigación permitan conocer mejor la biología de estos microorganismos que circulan a nivel nacional y que podrían representar una amenaza para la salud de las personas y el turismo en las aguas de nuestro país.

La investigación que se plantea pretende responder a la siguiente pregunta:

¿Presentan los aislamientos clínicos autóctonos de *N. fowleri* similitudes en sus factores de virulencia y en su patrón de susceptibilidad a fármacos comerciales?

Hipótesis

- Los aislamientos clínicos de *Naegleria fowleri* (Guanacaste y Limón) presentan un perfil de proteasas y un efecto citopático similar.
- Los aislamientos clínicos de *Naegleria fowleri* (Guanacaste y Limón) presentan un perfil de susceptibilidad similar a los fármacos empleados convencionalmente para el tratamiento de la MAP.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1. Amebas de vida libre: *Naegleria fowleri*

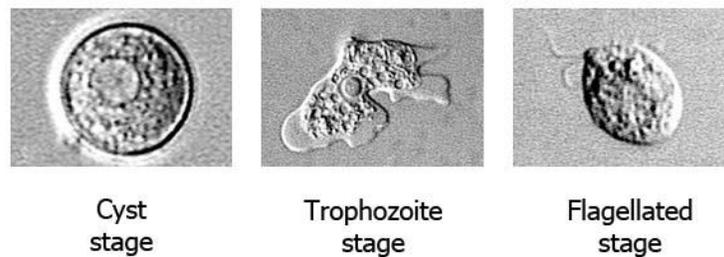
Las amebas de vida libre son protozoarios presentes en gran variedad de hábitats, como fuentes de agua dulce (lagos, ríos, manantiales, piscinas mal mantenidas) y suelos. Se han identificado tres principales géneros como patógenos incidentales para el ser humano: *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Naegleria*. Adicionalmente, se ha reportado solo un caso de afectación al sistema nervioso central en humanos causados por otras dos amebas de vida libre: *Sappinia pedata* y *Paravahlkampfa francinae* (Cope *et al.*, 2015; Benito *et al.*, 2018; Seas & Legua, 2022).

El género *Naegleria* pertenece a la familia Vahlkampfiidae y a la superclase Rhizopoda, la cual alberga especies parasíticas para el ser humano (Centers for Disease Control and Prevention, 2023). Las especies de este género comparten características como poseer vacuola contráctil y cariosoma prominente, ser aerobias y dividirse mediante fisión binaria. Este género posee 47 especies reportadas, de las cuales solo *Naegleria fowleri* es patógena (De Jonckheere, 2011; Guzmán-Téllez, 2020).

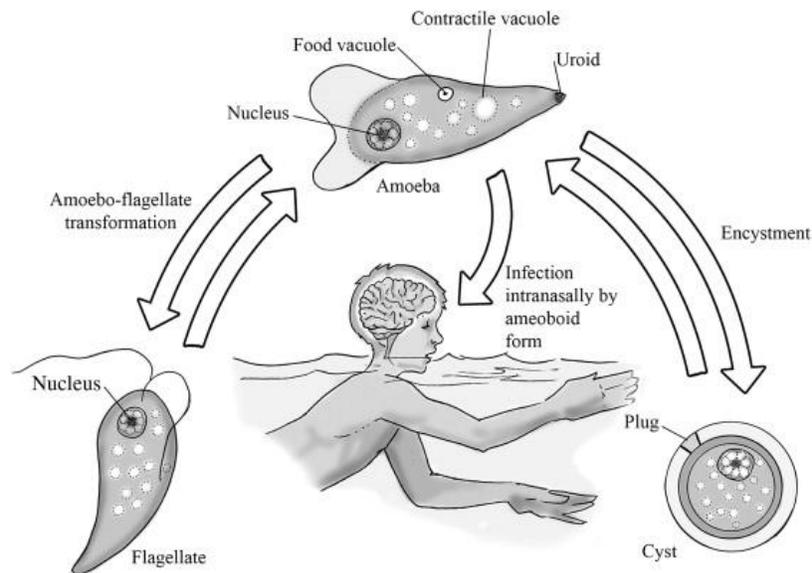
N. fowleri es un ameboflagelado eucariota unicelular que habita en fuentes de agua tibia (lagos, ríos y aguas termales) y que se encuentra distribuida a nivel mundial. El trofozoíto varía en tamaño de 7 a 15 μm y está rodeada por una única membrana flexible. Es termófila, pudiendo crecer en un rango de temperaturas que van desde los 25°C a los 46°C e incluso mayores (Visvesvara & Stehr-Green, 1990). La ameba también puede sobrevivir en el suelo y el polvo, y su crecimiento y multiplicación están influenciados por varios factores ambientales como la temperatura, el pH, la salinidad y la disponibilidad de nutrientes (Cope *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2017). Las condiciones óptimas para su crecimiento son una temperatura de 37 °C, un pH neutral y la presencia de bacterias como fuente de alimento (Visvesvara & Stehr-Green, 1990).

La ameba tiene tres estadios morfológicamente distintos (Figura 1): un trofozoíto vegetativo, un quiste inactivo y una forma flagelada llamada forma biflagelada o de transición

(Marciano-Cabral & Cabral, 2003). El trofozoíto es la forma de alimentación activa que es responsable de causar la enfermedad en los seres humanos. Tiene un pseudópodo anterior que se utiliza para la locomoción y la fagocitosis de bacterias, hongos y otros microorganismos (De Jonckheere, 2011). Los quistes son una etapa inactiva que le permite a la ameba sobrevivir en condiciones desfavorables como bajas temperaturas y desecación (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). La forma biflagelada es una etapa transitoria durante la transformación del trofozoíto al quiste (Visvesvara & Stehr-Green, 1990).



A



B

Figura 1. A) Estadíos evolutivos de *N. fowleri* observados mediante microscopía electrónica (tomados de: Centers for Disease Control and Prevention, 2022). B) Principales componentes de los tres estadíos evolutivos de *N. fowleri*, así como su interconversión. Los trofozoítos (formas ameboides) son el estadio infectante para el ser humano (tomado de: Bogitsh *et al.*, 2018).

N. fowleri es comúnmente conocida como “ameba comecerebros”, ya que causa una infección cerebral mortal en las personas afectadas llamada meningoencefalitis amebiana primaria. Esta es poco común a nivel mundial y ocurre en personas inmunocompetentes, mayormente en personas que practican deportes acuáticos, principalmente en niños y adultos jóvenes (Centers for Disease Control and Prevention, 2015).

Hay diferentes genotipos de *N. fowleri* que pueden ser diferenciados mediante secuencias en el ARN ribosomal 5,8S. Mediante estos estudios de biología molecular se determinó que estas amebas se encuentran en todos los continentes excepto en la Antártica, y que existen 8 genotipos diferentes de este microorganismo. En Europa se han encontrado 7 de los 8 tipos identificados y en América se encuentran el tipo 1, 2 y 3. De estos tipos, no todos han sido aislados en infecciones humanas, a pesar de ser identificados como patogénicos (De Jonckheere, 2011).

1.2 Meningoencefalitis amebiana primaria

Esta rara entidad clínica del sistema nervioso central (SNC) causada por *N. fowleri*, es un cuadro agudo, fulminante y hemorrágico que se caracteriza por una inflamación severa y necrosis del cerebro y las meninges (Fero, 2010; Martínez *et al.*, 2017; Mungroo *et al.*, 2019). Como se mencionó anteriormente, este agente etiológico tiene la capacidad de causar esta infección en individuos inmunocompetentes, especialmente en niños y adultos jóvenes, y el riesgo de contraer es mayor cuando se practican actividades recreativas en agua dulce donde puede estar presente la ameba, ya que la vía de infección es a través de la cavidad nasal del individuo (Centers for Disease Control and Prevention, 2015; Jahangeer *et al.*, 2020).

La forma infectante y diagnóstica de *N. fowleri* son los trofozoítos, los cuales tienen la capacidad de adherirse a la mucosa nasal y migrar a través de los nervios olfatorios para posteriormente ingresar por la placa cribiforme al espacio subaracnoideo y, eventualmente, al parénquima cerebral, razón por la cual, a la hora del diagnóstico, estos trofozoítos son encontrados en el tejido cerebral (Bartrand *et al.*, 2014). Una vez en tejido cerebral,

estructuras en la superficie de los trofozoítos y algunas moléculas citolíticas desempeñan un papel en la destrucción de las células y nervios del hospedero. Esto lleva a una hemorragia cerebral y, finalmente, a la muerte del paciente en un lapso de 3 a 7 días luego del inicio de los síntomas (Marciano-Cabral *et al.*, 2007; Jahangeer *et al.*, 2020).

El período de incubación de la MAP varía de 2 a 15 días, con un promedio de 5 días (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). La combinación de la patogenicidad de *N. fowleri*, y la intensa respuesta inmune que provoca en el hospedero, producen un daño muy significativo al tejido del SNC, cuya manifestación clínica es muy similar a la de una meningitis viral o bacteriana, incluyendo dolor de cabeza, rigidez en el cuello, náuseas, vómitos, anorexia, fiebre entre 38.5 °C - 41 °C, alteración del estado mental, convulsiones y estado de coma (Cope *et al.*, 2015; Grace *et al.*, 2015). Lo anterior, junto con retrasos en el diagnóstico y falta de estrategias de tratamiento adecuadas, resultan en una tasa de mortalidad de más del 97% para esta enfermedad (Centers for Disease Control and Prevention, 2015).

Para explicar la mayor prevalencia que esta enfermedad presenta en los niños, se han sugerido diversos factores asociados al comportamiento, respuesta inmune e incluso anatómicos, propios de la edad. Por ejemplo, se dice que los niños suelen participar más en actividades recreativas en agua dulce como nadar, jugar o bucear, teniendo a menudo poca conciencia del riesgo de infección con esta ameba. Son además más propensos a realizar estas actividades acuáticas sin protección adecuada, como por ejemplo el uso de nariceras, o incluso tienden a sumergir la cabeza bajo el agua (Yoder *et al.*, 2010; De Jonckheere, 2014). Otros estudios sugieren que la susceptibilidad a la infección por *N. fowleri* podría estar influenciada por factores inmunológicos, demostrando que la respuesta inmune innata en los niños es menos eficiente que en los adultos, siendo mayor el riesgo a la infección con la ameba (Yoder *et al.*, 2010; De Jonckheere, 2014). Adicionalmente, se ha sugerido que la inmadurez de la placa cribosa en los niños podría favorecer la invasión de la ameba. La placa cribosa es una estructura ósea que separa la cavidad nasal del cráneo y se considera la principal barrera de defensa contra la entrada de patógenos al sistema nervioso central. En los niños, la placa cribosa no está completamente desarrollada y es más delgada, lo que puede

facilitar la entrada de *N. fowleri* en el cerebro a través del nervio olfatorio (Yoder *et al.*, 2012).

1.3. Patogénesis y respuesta inmune

Aunque los mecanismos patogénicos de este microorganismo aún no son completamente comprendidos, existen dos grandes formas en que estas amebas causan daño al ser humano: i) mediante mecanismos directos que involucran la adhesión y la destrucción celular mediante sus copas alimenticias, y ii) mediante la liberación de proteasas que actúan como factores de virulencia sobre las células humanas (Jahangeer *et al.*, 2020).

Luego del ingreso por vía nasal, las amebas migran principalmente hacia el lóbulo frontal del cerebro (por su cercanía anatómica con el bulbo olfatorio), siendo los lóbulos parietales los segundos más afectados (Ong *et al.*, 2017). Los trofozoítos utilizan mecanismos de adhesión a los nervios olfatorios y también presentan el fenómeno de atracción química (quimiotaxis), especialmente por la acetilcolina (Baig, 2016).

En cuanto a los mecanismos de adhesión, hay proteínas extracelulares como la fibronectina, laminina I y colágeno I que son utilizados por *N. fowleri* para adherirse mejor que otras especies no patógenas de *Naegleria*. Los residuos de manosa también se han identificado como esenciales para que la ameba se una a la mucosa nasal. Por otro lado, las proteínas formadoras de poros de estas amebas (naegleriaporos) y los carbohidratos en su superficie, ayudan a que el microorganismo se adhiera a las células humanas. En el caso de los naegleriaporos A y B, estos se consideran tóxicos para los humanos y presentan un alto grado de glicosilación, además de resistencia a proteasas (Martínez-Castillo *et al.*, 2016; Herman *et al.*, 2021). Se ha determinado que la mayoría de los factores de virulencia de *N. fowleri* forman parte de dominios proteicos transmembrana, tráfico vesicular y proyecciones celulares (Zysset-Burri *et al.*, 2014).

Con respecto a las copas alimenticias de *N. fowleri*, estas son estructuras “succionadoras” que están conformadas principalmente por proteínas de actina (Nf-a1 y Nf-actina) y que

pueden digerir pedazos de tejido cerebral humano de una manera directa, proceso que recibe el nombre de trogocitosis. Entre las células que resultan más dañadas destacan las células microgliales, las de neuroblastoma e incluso los eritrocitos. La trogocitosis sólo había sido descrita para células inmunes como los linfocitos y para la ameba intestinal *Entamoeba histolytica* (Martínez-Castillo *et al.*, 2016; Jahangeer *et al.*, 2020; Herman *et al.*, 2021).

Por otro lado, dentro de las sustancias liberadas por estos organismos se encuentran enzimas del tipo proteasas de cisteína (las cuales se cree que son las que producen más daño), neuraminidasas o elastasas (promueven la destrucción de tejidos), hidrolasas, fosfolipasas (causan daño en las membranas celulares), metaloproteasas, enzimas fosfolipolíticas y proteasas de serina, entre otras (Martínez-Castillo *et al.*, 2016; Jahangeer *et al.*, 2020).

Las proteasas más importantes que se han estudiado en la patogénesis de *N. fowleri* incluyen a las metaloproteinasas de matriz de la ameba (MMPs), las cuales degradan la matriz extracelular. Algunas de estas son la MMP-14 gelatinasa A (MMP 2) y gelatinasa B (MMP-9). Adicionalmente, se ha demostrado que las catepsinas también juegan un rol muy importante en la patogénesis de *N. fowleri*, específicamente la proteína similar a la catepsina B de *N. fowleri* y la catepsina B, ya que ayudan a la evasión inmune, invasión tisular, captación de nutrientes y enquistamiento. Ambas han mostrado también un efecto proteolítico sobre inmunoglobulinas, fibronectina, hemoglobina, albúmina y colágeno (Jahangeer *et al.*, 2020). Otros factores de virulencia importantes, reportados para *N. fowleri*, incluyen la proteína de choque térmico 70 (Hsp70), actina 1 y 2 y la proteína de membrana Mp2CL5 (Zysset-Burri *et al.*, 2014).

En cuanto a la respuesta inmune, *N. fowleri* causa una respuesta inflamatoria en su hospedero en las primeras horas de la infección, al interactuar con el moco de la cavidad nasal. Se ha observado que *N. fowleri* induce la expresión y secreción de citocinas como la IL-8, IL-1 β y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por parte de las células mucoepiteliales del hospedero, a través de la activación de los receptores Toll-like, especialmente el TLR-4, con un pico de producción entre las 12 y 24 horas post infección (Martínez-Castillo *et al.*, 2018). Esta respuesta inicial se caracteriza por una infiltración inflamatoria, especialmente de

células polimorfonucleares como macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Estos últimos producen mieloperoxidasa, una especie reactiva de oxígeno que tiene actividad amebicida, además del TNF- α , que facilita la adhesión de la ameba a los neutrófilos, por lo que indirectamente ayuda a la destrucción de esta (Marciano-Cabral & Cabral, 2007).

Durante la movilización de los trofozoítos hacia el bulbo olfatorio no se observa una inflamación importante, pero aproximadamente a las 100 horas post infección, luego de la llegada de las amebas a tejido cerebral, se reporta una reacción inflamatoria exacerbada. Los hemisferios cerebrales y las leptomeninges se ven blandos, hinchados, edematosos y muy congestionados. Además, en los bulbos olfatorios se observan áreas de necrosis con presencia de hemorragia y exudado purulento (la corteza también puede contener áreas hemorrágicas). A nivel microscópico, los hemisferios cerebrales, el tronco encefálico, el cerebelo y la porción superior de la médula espinal se observan con exudado fibrino-purulento con presencia de leucocitos polimorfonucleares, especialmente neutrófilos, eosinófilos y algunos linfocitos y macrófagos. Los trofozoítos se observan en grandes cantidades y agrupados en masa en el tejido necrótico y alrededor de vasos sanguíneos, sin la presencia de leucocitos polimorfonucleares (Visvesvara *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que esta reacción inflamatoria del hospedero es realmente lo que causa el cuadro fatal, ya que lleva a una inflamación del cráneo irreversible y a la muerte, pero esta teoría aún se está estudiando, ya que median muchos factores inflamatorios (Sanders, 2015).

1.4. Epidemiología y prevención

El primer caso clínico causado por *N. fowleri* fue descrito en 1965 en Australia por Malcolm Fowler y Rodney F. Carter, y se presentó en un niño de 9 años con sintomatología de una meningitis aséptica que, en primera instancia, fue confundido como un cuadro causado por *Acanthamoeba* sp. Desde entonces, muchos casos de meningoencefalitis se atribuían a *N. fowleri* basándose en características inmunohistoquímicas y en la identificación de un estadio flagelado del protozoario. Sin embargo, al no tener técnicas diagnósticas definitivas y al

desconocimiento de muchas características de este microorganismo y de su fisiopatología en esas épocas, los datos epidemiológicos mundiales son ambiguos (Oddó, 2006).

De manera retrospectiva, se han atribuido múltiples casos de meningoencefalitis a *N. fowleri*. Por ejemplo, un brote de 16 casos en Praga, República Checa, de 1962 a 1965 y 7 casos en Virginia, USA, en los veranos de 1951 y 1952. Los casos anteriores fueron estudiados por el Departamento de Patología del Colegio Médico de Virginia mediante el análisis de autopsias y este confirmó a *N. fowleri* como el agente causal. Además, en este estudio se propone que el primer caso de *N. fowleri* fue mucho antes que el descrito en Australia, específicamente en 1937 en una niña de 13 años en Estados Unidos (Dos Santos, 1970; Oddó, 2006).

Se cree que, en décadas pasadas, el subregistro de casos, por desconocimiento de la enfermedad o por atribuírsele a fallecidos por MAP otra causa de muerte, ha afectado en la obtención de datos epidemiológicos que brinden una mejor perspectiva estadística. Dichosamente, la visibilización de esta enfermedad ha obtenido una mayor cobertura debido al crecimiento en el número de publicaciones y al papel de los medios de comunicación al referirse a este microorganismo como “ameba comecerebros” (Maciver *et al.*, 2020).

Más recientemente, una revisión epidemiológica retrospectiva determinó que ha habido un total de 381 casos de MAP causados por *N. fowleri* desde 1937 al 2018, de los cuales solo 182 fueron confirmados, siendo el resto casos probables y sospechosos. De estos 182 casos confirmados, solo ha habido 7 sobrevivientes. Además, 145 pertenecían a los Estados Unidos y los otros 223 fueron identificados en otras partes del mundo, en 33 países en total, siendo los países con más casos reportados: Estados Unidos, especialmente los estados del sur (41%), Pakistán, (11%), México (9%), India (7%) y Australia (6%) (Gharpure *et al.*, 2021).

Así, la mayor cantidad de casos se reportan en países de zonas templadas (aunque por la naturaleza de la ameba se espera una mayor cantidad de casos en zonas tropicales) y en un 85% de los casos la infección se da durante la época de verano, en donde la temperatura de las fuentes de agua es mayor. Se estima que los casos de MAP son infra reportados principalmente en países con servicios de salud en vías de desarrollo, sin sistemas de

vigilancia y notificación sistemática para la enfermedad, y sin métodos diagnósticos disponibles (De Jonckheere, 2011; Gharpure *et al.*, 2021).

En Costa Rica se han diagnosticado 3 casos de MAP, todos durante el primer trimestre del año 2020. Estos correspondieron a un adolescente de 15 años, una niña de 5 años y un niño de 1 año, pertenecientes a las provincias de Guanacaste, Cartago y Limón, respectivamente. En estos casos, el microorganismo fue adquirido de aguas termales o de agua de pozo. En dos de ellos los pacientes fallecieron, mientras que uno de los pacientes (proveniente de Cartago) se recuperó satisfactoriamente gracias a la rápida intervención clínica y al diagnóstico temprano (Retana Moreira *et al.*, 2020).

Es importante destacar que, aunque la MAP se ha asociado mayoritariamente a casos en humanos, se han reportado pocos casos en animales, especialmente en ganado. El primer caso reportado de MAP en un hospedero no humano se presentó en 1997 en un tapir sudamericano macho de 6 meses de edad, en un zoológico de Arizona, Estados Unidos. Este mostró hallazgos clínicos e histopatológicos muy similares a los encontrados en los humanos infectados, así como el hallazgo de trofozoítos de *N. fowleri* en el tejido cerebral, que ocasionaron su muerte tres días después del inicio de los síntomas (Lozano-Alarcón *et al.*, 1997). Además de este caso, se han reportado otros casos en animales, por ejemplo, un brote de MAP en novillas en California, Estados Unidos a finales de los años 90, e incluso un caso de una vaca en Costa Rica en el año 2005 (Daft *at al*, 2005; Morales *et al.*, 2006).

Ante la carencia de metodologías diagnósticas que permitan un diagnóstico temprano, así como de tratamientos de alta eficacia, la prevención se convierte en la opción más adecuada para evitar el contagio con la ameba y, por ende, el desarrollo del cuadro clínico.

Entre los métodos sugeridos está mantener un nivel adecuado de cloro en el agua, ya que hay casos de MAP relacionados con el uso de agua inadecuadamente clorada para la natación, las prácticas de ablución y los lavados nasales en ciertas zonas geográficas. Con respecto a la desinfección de las fuentes de agua artificial, los compuestos más utilizados son cloro y cloramina. En el oeste de Australia, por ejemplo, existe una guía para cloración de estas aguas

que recomienda mantener una concentración constante de 0.5 mg/L de cloro para los sistemas de distribución de agua, pero no toman en cuenta la influencia que la materia orgánica y la formación de biopelículas del microorganismo tienen sobre la eficacia de este compuesto, provocando que los quistes de *N. fowleri* sean resistentes a estas concentraciones de cloro. Por lo tanto, recientemente se ha propuesto mantener concentraciones libres residuales de cloro mayores a 1 mg/L por más de 60 días, las cuales han demostrado la eliminación de biopelículas de *N. fowleri* y previenen la recolonización estacional por parte de la ameba (Puzon *et al.*, 2020). Para las prácticas de ablución y lavados nasales en donde no se pueda asegurar una adecuada cloración del agua, es recomendable utilizar agua previamente hervida (Güémez & García, 2021).

Como las fuentes de agua natural no pueden ser cloradas, se debe evitar participar en actividades recreativas como nadar en cuerpos de agua que tengan confirmada la presencia del agente causal, en especial en verano, cuando la temperatura del agua es mayor; o al menos rehusarse a sumergirse y que ingrese agua por la nariz (Yoder *et al.*, 2012).

La concientización pública cumple un papel fundamental en la prevención de MAP, por ejemplo, campañas de educación en escuelas y colegios, hospitales y espacios recreacionales, así como el uso de anuncios o carteles que alerten del riesgo de infección con la ameba en los sitios con fuentes de agua natural como pozas o aguas termales y que recomienden medidas básicas como no sumergirse o lanzar agua a otras personas. En países como Australia y Estados Unidos es frecuente observar estos rótulos en muchos sitios turísticos. Incluso en Costa Rica, a partir del año 2020, el Ministerio de Salud ordenó a los establecimientos que albergan aguas termales colocar rotulación en vestidores, piscinas, parqueos y entradas principales para advertir y prevenir a los usuarios de la posible presencia de este microorganismo, así como la prohibición de toboganes que desemboquen en fuentes de agua natural (Ministerio de Salud Costa Rica, 2020).

1.5. Tratamiento de la MAP

El tratamiento para la MAP constituye uno de los mayores desafíos a nivel clínico, ya que este debe iniciar lo más rápido posible luego de la identificación de un posible cuadro. Actualmente, no existe un medicamento que por sí solo sea eficaz, siendo necesario usar diferentes combinaciones de ellos para generar un efecto sinérgico que intenta aumentar las posibilidades de vida del paciente (Jahangeer *et al.*, 2020). En el cuadro I se muestran tres de las principales combinaciones de fármacos utilizadas en el tratamiento de la MAP.

Cuadro I. Principales combinaciones de medicamentos utilizados en el tratamiento de la MAP (modificado de Taravaud *et al.*, 2021)

Estrategia terapéutica	Porcentaje de supervivencia*
Anfotericina B + azitromicina + fluconazol + rifampicina ± miltefosina	6/34 (18%)
Anfotericina B + (fluconazol, ketoconazol o miconazol) ± rifampicina	8/45 (18%)
Anfotericina B + rifampicina	8/21 (38%)

*Los datos del cuadro se obtuvieron del análisis de 209 casos de MAP alrededor del mundo.

Uno de los medicamentos más empleados es la anfotericina B, la cual tiene como blanco la vía de biosíntesis de ergosterol. Esta vía en las amebas de vida libre es similar a la de los hongos patógenos, por lo que al evaluar los antifúngicos que apuntan a la estabilidad del ergosterol en la membrana, el polieno anfotericina B es el fármaco por excelencia en el tratamiento de *N. fowleri* (Jahangeer *et al.*, 2020). La anfotericina B actúa uniéndose al ergosterol y provocando poros de lisis en la membrana. En *N. fowleri* induce cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos semejantes a una muerte celular programada que incluyen cambios ultraestructurales, aumento de las especies reactivas de oxígeno, externalización de fosfatidilserina, disminución del potasio intracelular, degradación de ADN y la expresión de ciertos genes relacionados con apoptosis como *sir2* y *atg8* (Cárdenas-

Zúñiga *et al.*, 2019). Lamentablemente, solo el 8% de las personas tratadas con este medicamento han sobrevivido a la infección con la ameba (Capewell *et al.*, 2015).

En la búsqueda de nuevos blancos de acción, se ha evaluado la eficacia “*in vitro*” de un agente anti-parásito llamado miltefosina. Este fármaco fue implementado al inicio como un agente antineoplásico para cáncer de mama en la década de 1980, dejándose de utilizar por su toxicidad dependiente de la dosis. En el año 2002, se aprobó su uso como un antiparasitario para la leishmaniasis (utilizado a bajas dosis), y fue en el 2013 cuando la CDC lo empezó a recomendar para el tratamiento de las infecciones por amebas de vida libre, específicamente para la MAP en el año 2016 ((Alli *et al.*, 2021; Martinez *et al.*, 2022).

Desde entonces, al menos 26 casos alrededor del mundo han reportado su uso. Este medicamento penetra la barrera hematoencefálica y se concentra en el tejido cerebral gracias a su estructura fosfolípida y a sus compuestos de alquil fosfocolina. Además, presenta la ventaja sobre la anfotericina B de poder ser administrada vía oral, siendo mejor tolerada por los pacientes ya que solo se reportan quejas intestinales leves. Para este medicamento no se reportan los niveles de toxicidad (especialmente de nefrotoxicidad) tan preocupantes como los observados para la anfotericina B (Alli *et al.*, 2021; Martinez *et al.*, 2022).

Además de estos dos fármacos, el voriconazol, un triazol relativamente nuevo que se ha utilizado en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, ha demostrado ser eficaz contra *N. fowleri* y presenta una buena penetración de la barrera hematoencefálica (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013). Este medicamento ha sido más utilizado para el tratamiento de infecciones por *Acanthamoeba* sp. y, junto, con otros azoles, ha mostrado efectividad en los cuadros de queratitis producidos por esta ameba de vida libre.

Con respecto a su modo de acción, en infecciones invasivas por hongos actúa bloqueando la formación de la membrana celular del microorganismo. “*In vitro*”, ha mostrado tener concentraciones mínimas inhibitorias contra *N. fowleri* de incluso 1 µg/mL, causando lisis de estos microorganismos y sin evidenciar daño al monocapa celular de riñón de mono, lo que indica su baja o nula toxicidad (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

En el horizonte del desarrollo de tratamientos contra la MAP causada por *N. fowleri* se busca el desarrollo de tratamientos eficaces, no tóxicos, de acción rápida y solubles en agua

(contrario a la anfotericina B). Debido al sitio anatómico en el que se desarrolla la enfermedad, los tratamientos que son capaces de permear en la barrera hematoencefálica son considerados potenciales candidatos para el tratamiento de la MAP.

Es evidente la gran necesidad que existe del desarrollo de tratamientos eficaces contra la MAP, sin embargo, en opinión de quien escribe, existe poco interés por parte de las compañías farmacéuticas para invertir en la investigación de nuevos medicamentos. Posiblemente, la poca cantidad de casos reportados se traduzca en una relación de costo beneficio que despierte poco interés en este tipo de industria. En este sentido, es importante recordar que, a pesar de que la infección de *N. fowleri* es rara, resulta en la pérdida de vidas preciadas para muchas familias, por lo que todo esfuerzo resulta significativo, especialmente cuando pensamos que las poblaciones más afectadas son niños y adultos jóvenes.

1.6. Perspectiva a futuro

Aunque la MAP todavía es relativamente rara, es probable que la incidencia aumente en los próximos años debido al cambio climático y otros factores ambientales (Cope *et al.*, 2015).

Un área de investigación que aún requiere mucho esfuerzo es la dedicada al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico. Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad se basa en la identificación de *N. fowleri* en muestras de líquido cefalorraquídeo o tejido cerebral, lo que puede ser difícil y llevar mucho tiempo (Martinez *et al.*, 2017), tanto que la mayoría de los diagnósticos se realizan post mortem. El desarrollo de nuevas herramientas, como ensayos de detección rápida de antígenos o pruebas basadas en PCR, podrían permitir un diagnóstico más temprano y preciso de MAP, lo que conduciría a mejores resultados para los pacientes y un aumento de la sobrevida al cuadro.

Además, es necesario comprender mejor la biología y patogénesis de *N. fowleri*. A pesar de décadas de investigación, muchos aspectos del ciclo de vida de la ameba y su interacción con su hospedero siguen siendo poco conocidos (Cope *et al.*, 2015). Una mejor comprensión de estos procesos podría llevar al desarrollo de nuevos tratamientos y estrategias de prevención para la MAP, como por ejemplo el desarrollo de una potencial vacuna.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Objetivo General

- Comparar los factores de virulencia y perfiles de susceptibilidad a fármacos comerciales en dos aislamientos de *Naegleria fowleri*, obtenidos de los primeros casos clínicos de meningoencefalitis amebiana primaria reportados en Costa Rica.

Objetivos específicos

1. Identificar el perfil proteico total y el perfil de proteasas secretadas por los dos aislamientos patógenos de *Naegleria fowleri*.
2. Comparar, mediante un estudio de proteómica, la presencia diferencial de proteínas específicas en ambos aislamientos de *Naegleria fowleri*.
3. Evaluar la actividad citopática de los trofozoítos y de los medios condicionados de ambos aislamientos de *Naegleria fowleri* sobre la línea celular Vero.
4. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias 50% (MIC50) de la miltefosina, el voriconazol y la anfotericina B sobre los aislamientos clínicos de *Naegleria fowleri*.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamientos de la ameba *N. fowleri*

Se trabajó con dos aislamientos clínicos de *N. fowleri* provenientes de dos casos de MAP de las provincias de Guanacaste (Gu) y Limón (Li) de Costa Rica (números de acceso en GenBank: MT090627 y MT210902).

3.2. Cultivo axénico y mantenimiento de los aislamientos de *N. fowleri*

Ambos aislamientos clínicos de *N. fowleri* se mantuvieron axénicamente en frascos de cultivo celular de 75 cm² (Cellstar, Greiner Bio-One, Austria) con 10 mL de medio de caseína hidrolizada al 2% (Merck Millipore, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, USA), 0.5 mg/mL de sulfato de estreptomicina y 0.3 µg/mL de sal de sodio de penicilina G (Sigma-Aldrich, USA). Los cultivos se incubaron a 37°C y se les realizó cambios de medio cada 3 días para su mantenimiento (Rizo-Liendo *et al.*, 2019).

3.3. Preparación de lisados celulares

Para preparar los lisados de amebas, se colocaron las botellas de cultivo con los trofozoítos en refrigeración por 30 minutos. Posteriormente, se recolectó el medio con las amebas suspendidas y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos. El botón resultante de trofozoítos se lavó dos veces con 1 mL de buffer de fosfatos salino (PBS) 0.01 M (Rizo-Liendo *et al.*, 2019) y se resuspendió en 500 µL de PBS. Finalmente, esta solución se sometió a tres ciclos de 30 segundos de sonicación sobre hielo, con 1 minuto de descanso entre ciclos y con un *output* de 25. Se prepararon alícuotas de 100 µL y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.4. Preparación de medios condicionados

Para obtener el medio condicionado (MC), se sustituyó el medio de las amebas por medio de caseína hidrolizada sin suero fetal bovino ni antibióticos (Merck Millipore, USA) y las botellas se incubaron a 37 °C por 5 horas. Pasado este tiempo, se recolectó el medio y se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró (filtro de 0,22 µm) y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.5. Cuantificación proteica de los lisados celulares y medios condicionados

La concentración proteica, tanto de los lisados como de los medios condicionados, se cuantificó mediante el kit Micro BCA Protein Assay, basado en una reacción colorimétrica medible mediante espectrofotometría a 562 nm, en donde el Cu^{2+} es reducido a Cu^{1+} (por acción de las proteínas presentes en medio alcalino), formando un quelato de color púrpura con 2 moléculas de ácido bicinconínico (ThermoScientific, USA). Brevemente, en una microplaca de pocillos planos, se realizó una curva de calibración con patrones de diferente concentración de albúmina de suero bovino (0,1,2,5,10 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) diluidas en la solución de trabajo (buffer alcalino tartrato-carbonato, solución de ácido bicinconínico y solución de sulfato de cobre). Para las muestras (lisados celulares) se colocaron 99 μL de solución de trabajo y 1 μL de los lisados o medios condicionados de cada aislamiento. La placa se incubó 30 minutos a 60 °C y posteriormente se leyó a 562 nm en un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek, USA).

3.6. Determinación del perfil proteico e identificación de proteasas

3.6.1. Determinación del perfil proteico

Para la determinación del perfil proteico, los lisados celulares se sometieron a una electroforesis en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Las muestras se prepararon mezclando 10 μL de muestra y 2,5 μL de buffer de carga 5X (se emplearon los lisados originales de ambos aislamientos, así como 3 diluciones seriadas de cada uno). Las muestras se calentaron a 98 °C por 10 minutos y se colocaron 12 μL en cada pocillo del gel. Se utilizó la escalera de masa molecular de Thermo Scientific™ Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (250 kDa a 10 kDa) (Thermo Scientific, USA). La electroforesis se corrió a 100 V por aproximadamente 1 hora en una minicámara de electroforesis Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad laboratorios Inc, USA). La concentración de los lisados que se cargó en los geles fue de 0,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Gu) y 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Li), con diluciones dobles hasta 1/8 para ambos aislamientos. Los geles se tiñeron tanto con azul de Coomassie como con tinción de plata (Heukeshoven & Dernick, 1988) para comparar la presencia de proteínas totales.

3.6.2. Determinación de proteasas mediante zimografía

Para la determinación de proteasas, se realizaron zimografías de los lisados y de los medios condicionados en condiciones no reductoras con geles de poliacrilamida-SDS al 12% (180 V, en hielo) y con gelatina al 1% como sustrato de proteasas, según el protocolo de Herron y colaboradores (Herron *et al.*, 1986). Las muestras se incubaron con diferentes inhibidores de proteasas por una hora a 37 °C antes de cargarlas en el gel, en un volumen final de 20 µL. Se utilizaron como inhibidores: yodoacetamida 5 µM (Sigma-Aldrich, USA) para las proteasas de cisteína, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 5 mM (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA) para las proteasas de serina y de ácido etilendiaminoteraacético 2 mM (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA) para las metaloproteasas (Vyas *et al.*, 2015; Lam *et al.*, 2017; Retana Moreira *et al.*, 2020). La concentración de los lisados que se cargó en los geles fue de 0,95 µg/µL (Gu) y 1,0 µg/µL (Li), y la concentración de los medios condicionados que se cargó en los geles (Gu y Li) fue de 5,00 µg/µL (Gu) y 4,70 µg/µL (Li).

Posterior a la electroforesis, los geles se lavaron con tritón X-100 al 1% por 30 minutos y se incubaron durante toda la noche a 37 °C en un buffer de sustrato (Retana Moreira *et al.*, 2020). Para el ensayo, se probaron tres buffers de sustrato con diferente pH: i) ácido acético 100 mM/CaCl₂ 2 mM (pH 3), ii) acetato de sodio 100 mM/CaCl₂ 2 mM (pH 5) y iii) Tris-HCl 50mM/CaCl₂ 5 mM (pH 8.5). En el caso de las metaloproteasas, como la inhibición con EDTA es reversible, fue necesario agregar también este inhibidor a cada buffer de sustrato ensayado en el que se incubaron los geles. Luego de la incubación, los geles se tiñeron con Commassie R-250 al 0,2% (p/v) en solución fijadora (metanol 40% y ácido acético al 10% v/v) por 1 hora y se decoloraron para observar las bandas de digestión de las proteasas.

La actividad proteasa se determinó mediante la observación de las bandas de digestión de gelatina, según el método de Hadas & Mazur (1993).

3.6.3. Estudio de proteómica de los medios condicionados para proteasas

Se realizó una electroforesis incompleta en condiciones reductoras SDS-PAGE de los medios condicionados de ambos aislamientos de *N. fowleri*. Las muestras se prepararon mezclando 10 µL de muestra y 2,5 µL de buffer de carga 5X y la electroforesis se dejó correr a 100 V

por pocos minutos (hasta que la banda de proteínas aun sin separar atravesara el gel compactador, sin empezar a migrar por el gel separador). Luego, se detuvo la electroforesis y el gel se tiñó con Coomassie R-250 según se describió arriba. La única banda obtenida con todas las proteínas sin separar se recortó del gel y se envió al Instituto Clodomiro Picado de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica para la realización de estudios de proteómica mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Las concentraciones de los medios condicionados utilizadas fueron de 6,63 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para Gu y 5,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para Li. Los espectros MS/MS obtenidos se procesaron para la comparación y pareo de los péptidos obtenidos con secuencias de proteínas de *Naegleria* sp. contenidas en la base de datos UniProt, utilizando Peaks X® (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, Canadá).

3.7. Pruebas del efecto citopático

3.7.1. Línea celular

Para medir la capacidad “*in vitro*” de daño a las células de los aislamientos de *N. fowleri*, se emplearon células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero) (John & John, 1989). Las células fueron cultivadas en botellas de 75 cm^2 (Corning Incorporated, USA) con medio RPMI al 2% (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, USA), 0.5 mg/mL de sulfato de estreptomicina y 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sal de sodio de penicilina G (Sigma-Aldrich, USA).

3.7.2. Capacidad de daño celular por parte de los trofozoítos de la ameba y por los medios condicionados

Para evaluar el daño producido por los trofozoítos de *N. fowleri* sobre un cultivo celular se emplearon dos técnicas: i) tinción con cristal violeta y ii) determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL). En ambos casos, se empleó una razón de 1 ameba por cada 2 células epiteliales.

Para evaluar el posible efecto de los medios condicionados sobre la monocapa de células se determinó también la actividad de DHL, además de una prueba de viabilidad utilizando el reactivo Presto Blue ® (Invitrogen, USA).

3.7.2.1. Observación del efecto citopático de células Vero tinción con cristal violeta

Células Vero en medio RPMI (Gibco, USA) suplementado con suero fetal bovino al 2% (SFB) (Sigma-Aldrich, USA) fueron sembradas en una placa de 24 pocillos (Corning Costar®, USA) a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo. La placa, así preparada, se incubó a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio RPMI de los pocillos con las células Vero y se les adicionó 0,5 mL de una solución de trofozoítos de *N. fowleri* en una concentración de $1,25 \times 10^5$ amebas/pocillo, en medio de caseína hidrolizada al 2% (sin suplementar con SFB) y se dejaron en reposo por 20 minutos sobre las células Vero.

Para el experimento, se monitoreó la destrucción celular por parte de las amebas cada hora y durante 5 horas en total, con un ensayo por triplicado para cada tiempo. El daño fue determinado mediante una tinción con cristal violeta, utilizando la metodología de Khan y colaboradores (2000) y realizándose la observación al microscopio invertido modelo CK30-F100 de Olympus Optical (Tokio, Japón).

Para la tinción de cristal violeta, se agregaron 200 µL de formalina al 10% (Sigma-Aldrich, USA) a cada uno de los pocillos correspondiente a cada hora. Esta se dejó actuar por 30 minutos, con el fin de fijar las células unidas a los pocillos, y luego se retiró todo el contenido de los pocillos (medio + formalina). Luego, a cada pocillo se les agregó 200 µL de cristal violeta y se dejó actuar a temperatura ambiente por 45 minutos. Seguidamente, se quitó el colorante por inversión de la placa, se dejó secar y se colocó en una cámara de luz para observar el desprendimiento de la monocapa de células Vero en el tiempo.

Para este ensayo se incluyeron además controles de células Vero sin las amebas, los cuales fueron tratados de la misma forma que se describió previamente.

3.7.2.2. Prueba de viabilidad de células Vero mediante cuantificación de deshidrogenasa láctica (DHL)

Se utilizó el kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay (Fisher Scientific, USA) para evaluar la citotoxicidad de las amebas completas y de los medios condicionados sobre las células Vero transcurridas 5 horas de incubación. Brevemente, a una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One CELLSTAR®, Austria) se le agregaron 90 uL por pocillo de una concentración de $2,5 \times 10^5$ células Vero/uL y se incubaron durante 24 horas a 37 °C para obtener una monocapa

confluyente. Posteriormente, y según el ensayo, se agregaron, por triplicado 10 µL de cada una de las siguientes soluciones: amebas de cada aislamiento a una concentración de $1,25 \times 10^5$ amebas/pocillo, medio condicionado de cada aislamiento a una concentración de 5,75 µg/µL para Li y 6,63 µg/µL para Gu, agua para el control de actividad espontánea y buffer de lisis como control de máxima actividad de DHL. Se incluyeron también: un control de medio de caseína hidrolizada sin suero (bactocasitona) para determinar la actividad de fondo de DHL y un control positivo de actividad DHL incluido en el kit, ambos por triplicado. Para el caso de las amebas y los medios condicionados, se monitoreó la actividad de DHL para cada hora durante 5 horas. El esquema de trabajo se muestra en la Figura 2.

La placa del ensayo se incubó a 37 °C y transcurrida cada hora de incubación, se transfirieron 50 µL de los pocillos correspondientes a otra placa de 96 pocillos vacía. Esto se realizó hasta completar las 5 horas de incubación. Seguidamente, se agregaron 50 µL de la mezcla de reacción del kit a todos los pocillos de la segunda placa y esta se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 50 µL de la solución de parada (*stop solution*) a todos los pocillos, se mezcló y se midió la absorbancia a 490 nm y 680 nm en un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek, USA).

Para la determinación del porcentaje de citotoxicidad en cada caso, se utilizó la siguiente fórmula (incluida en el instructivo del kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay):

$$\% \text{ Citotoxicidad: } \frac{\text{Actividad DHL de los trofozoítos ó MC} - \text{Actividad espontánea DHL}}{\text{Actividad máxima DHL} - \text{Actividad espontánea DHL}} \times 100$$

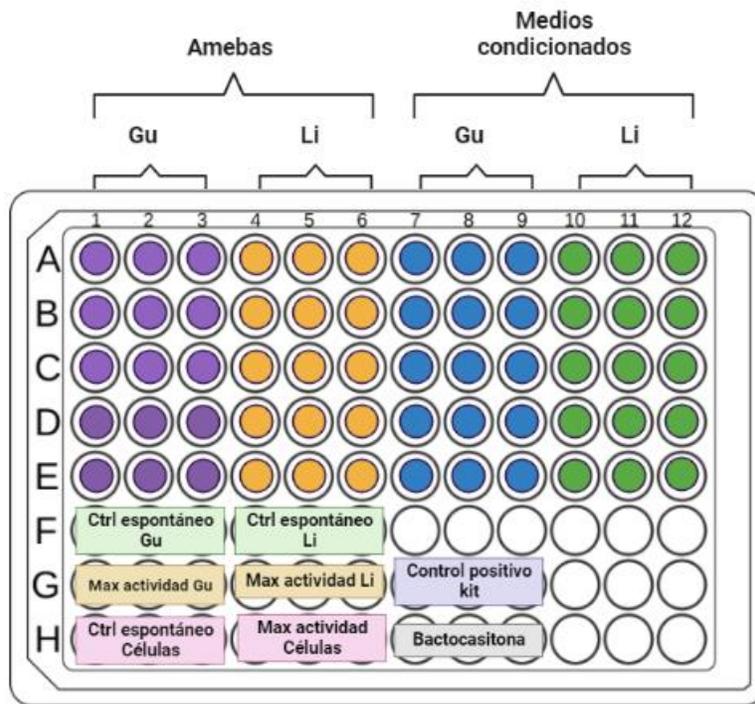


Figura 2. Esquema de preparación de la placa de 96 pocillos utilizada para el experimento de viabilidad, mediante cuantificación de DHL, de células Vero en presencia de trofozoítos y de medios condicionados de ambos aislamientos de *N. fowleri*.

3.7.2.3. Determinación del efecto citopático de medios condicionados

Para evaluar el posible efecto citopático de los medios condicionados se realizó una prueba de viabilidad utilizando el reactivo Presto Blue ® (Invitrogen, USA).

En cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One Cellstar ®, Austria) se agregaron 100 µL de células Vero en medio RPMI al 2% (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, USA), 0.5 mg/mL de sulfato de estreptomicina y 0.3 µg/mL de sal de sodio de penicilina G (Sigma-Aldrich, USA), para una concentración final de $2,5 \times 10^5$ células. La placa se incubó durante 24 horas, con el fin de obtener una monocapa confluyente, y posteriormente se le retiró el medio para agregar 100 µL de medio condicionado de los aislamientos según se describe en la Figura 3. La concentración de los medios condicionados (Gu y Li) fue de 4,20 y 3,60 µg/µL respectivamente.

Los análisis se realizan por triplicado y durante 5 horas de incubación. La placa se mantuvo a 37 °C y para cada hora se retiró el medio de los pocillos correspondientes a cada

aislamiento, el cual se sustituyó por el medio de caseína hidrolizada al 2% sin suero (Merck Millipore, USA). Al finalizar las 5 horas, se añadieron 10 µL del reactivo Presto Blue® (Invitrogen, USA) y se dejó la placa en incubación por 3 horas a 37 °C. Seguidamente, para evaluar la viabilidad celular, se determinó la absorbancia de la placa a una longitud de onda de excitación de 570 nm y emisión de 600 nm, en un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek, USA).

Para este ensayo se incluyeron además controles de medio de caseína hidrolizada sin suero, controles de células Vero y controles de los medios condicionados sin células Vero. Todos fueron tratados de la misma forma que se describió anteriormente.

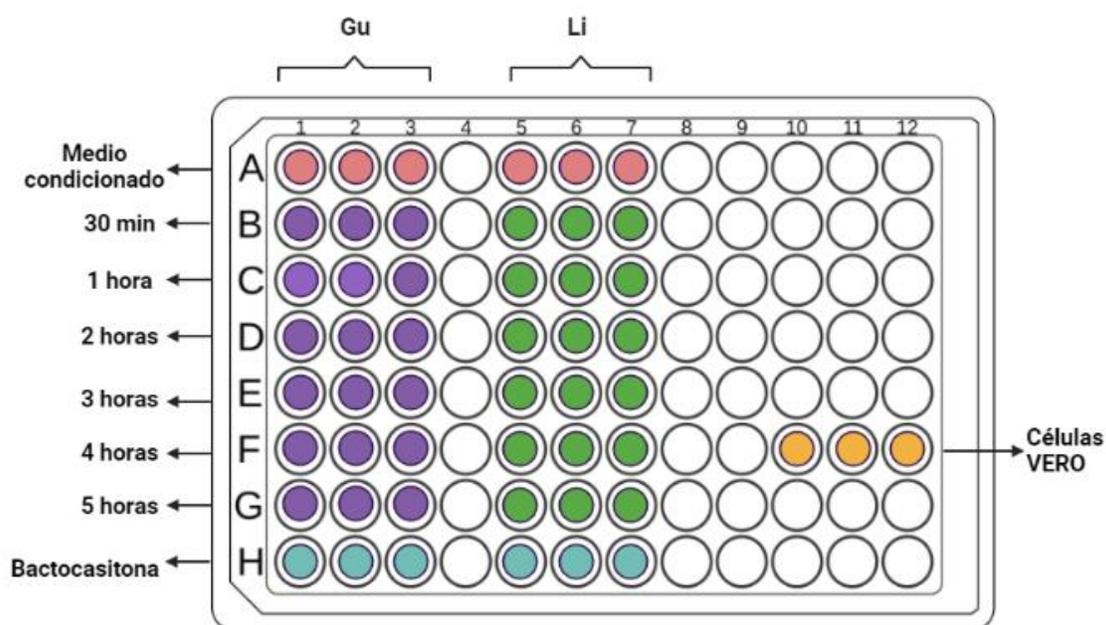


Figura 3. Esquema de preparación de la placa de 96 pocillos utilizada para el experimento de determinación del efecto citopático de medios condicionados de ambos aislamientos de *N. fowleri* mediante la incubación con el reactivo Presto Blue® (Invitrogen, USA).

4. Pruebas de susceptibilidad a fármacos

En este trabajo se evaluó el efecto de tres fármacos contra formas de trofozoítos de *N. fowleri*: anfotericina B, voriconazol y miltefosina. Para los dos primeros se prepararon

soluciones madre en dimetilsulfóxido (DMSO) por su baja solubilidad en agua, por lo que fue necesario llevar a cabo un ensayo previo para determinar la concentración ideal de este diluyente.

4.1. Susceptibilidad de las amebas al dimetilsulfóxido (DMSO)

Para conocer la concentración de DMSO a la cual se provocaba la muerte de las amebas por toxicidad del reactivo y no de los fármacos, se colocaron 50 µL de los trofozoítos de ambos aislamientos en medio de caseína hidrolizada al 2% sin suero (Merck Millipore, USA), en una concentración de 10^5 amebas/pocillo. Posteriormente, se les agregó 50 µL de DMSO en concentraciones de 1,25%, 2,5%, 5%, 7,5% y 10% a tres pocillos de cada uno de los aislamientos (además, se agregó 50 µL de agua destilada en lugar de DMSO a tres pocillos de cada uno de los aislamientos, correspondientes a la concentración de 0%). Posteriormente, se adicionaron 10 µL del reactivo colorimétrico Presto Blue® (Invitrogen, USA) a cada pocillo y las placas se incubaron por 72 horas a 37 °C. Pasado este tiempo, se evaluó visualmente la placa y se determinó la concentración de DMSO a la cual las amebas seguían viables (pocillos completamente rosados).

4.2. Ensayo de susceptibilidad a la miltefosina, voriconazol y anfotericina B

Se ensayaron 8 concentraciones de miltefosina, voriconazol y anfotericina B sobre cada uno de los aislamientos de *N. fowleri*, en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One CELLSTAR®, Austria). En este caso, se colocaron 50 µL de los trofozoítos de ambos aislamientos en medio de caseína hidrolizada al 2% sin suero (Merck Millipore, USA), a una concentración de 10^5 amebas/pocillo. Luego de que las amebas se adhirieron a la placa, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se añadieron 90 µL de las diluciones respectivas de los fármacos, por triplicado. Además, se adicionaron 10 µL del reactivo colorimétrico Presto Blue® (Invitrogen, USA) a cada pocillo y las placas se incubaron por 72 horas a 37 °C. Se realizó la lectura espectrofotométrica en el tiempo final a una longitud de onda de excitación de 570 nm y emisión de 600 nm, en un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek, USA). Para el control de viabilidad se utilizaron amebas sin los fármacos (Chiboub *et al.*, 2019; Lorenzo-Morales *et al.*, 2019; Rizo-Liendo *et al.*, 2019; Rizo-Liendo *et al.*, 2021).

Las concentraciones empleadas de estos fármacos se eligieron según metodologías previas de otros estudios y para poder abarcar un rango amplio de concentraciones, ya que al ser aislamientos clínicos su comportamiento puede ser poco predecible. La concentración inicial de miltefosina fue de 320 $\mu\text{g/ml}$ y se realizaron 7 diluciones seriadas más en la placa (160 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 2,5 $\mu\text{g/mL}$). Las concentraciones iniciales de voriconazol y anfotericina B en la placa fueron de 250 $\mu\text{g/mL}$ y se realizaron 7 diluciones seriadas más de estos fármacos (125 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 15.65 $\mu\text{g/mL}$, 7.81 $\mu\text{g/mL}$, 3.9 $\mu\text{g/mL}$ y 1,95 $\mu\text{g/mL}$). Para estos dos últimos fármacos, las concentraciones iniciales en la placa estaban diluidas de tal manera que la concentración final de DMSO fuera de 1,25%, de acuerdo con los resultados del punto 4.1.

Los controles utilizados incluyeron: medio bactocasitona (sin suero), amebas sin la presencia de los fármacos (control de crecimiento), fármacos sin la presencia de las amebas ni DMSO, DMSO al 1,25% sin la presencia de las amebas (en el caso de la anfotericina B y el voriconazol), y amebas con tritón X-100 como control de destrucción total de estas. Los esquemas de los experimentos se muestran en las Figuras 4, 5 y 6.

Para la estimación de la MIC50, primeramente, se determinó el 50% del valor de la absorbancia del control de crecimiento. Seguidamente, para cada fármaco analizado para cada aislamiento, se identificó la concentración a la cual el valor de absorbancia fuese el más cercano por debajo de ese valor del 50% del control de crecimiento y se identificó como la concentración que causó la inhibición del 50% de las amebas (MIC50).

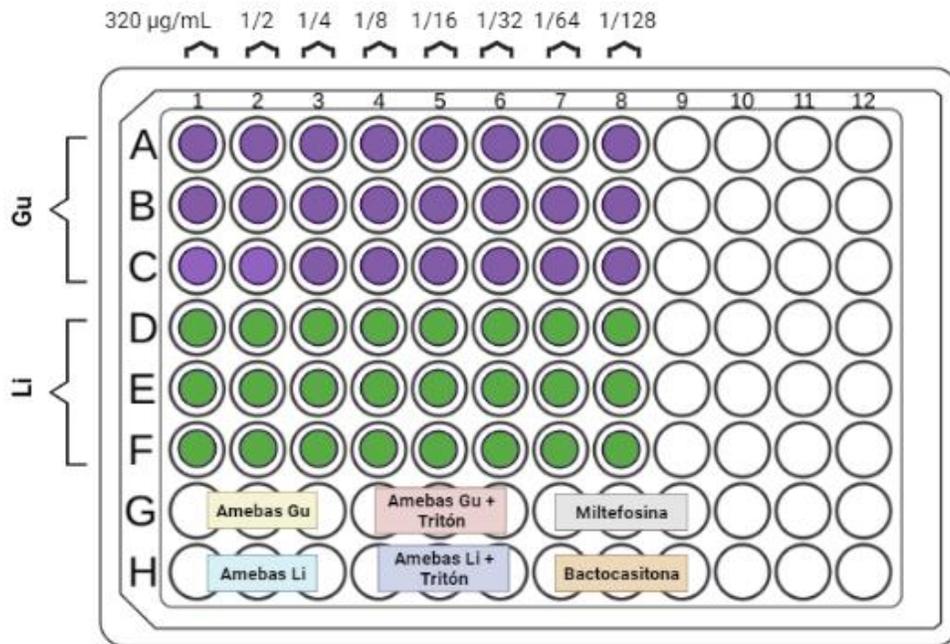


Figura 4. Esquema de la placa de 96 hoyos utilizada para el experimento de susceptibilidad de ambos aislamientos de *N. fowleri* a la miltefosina.

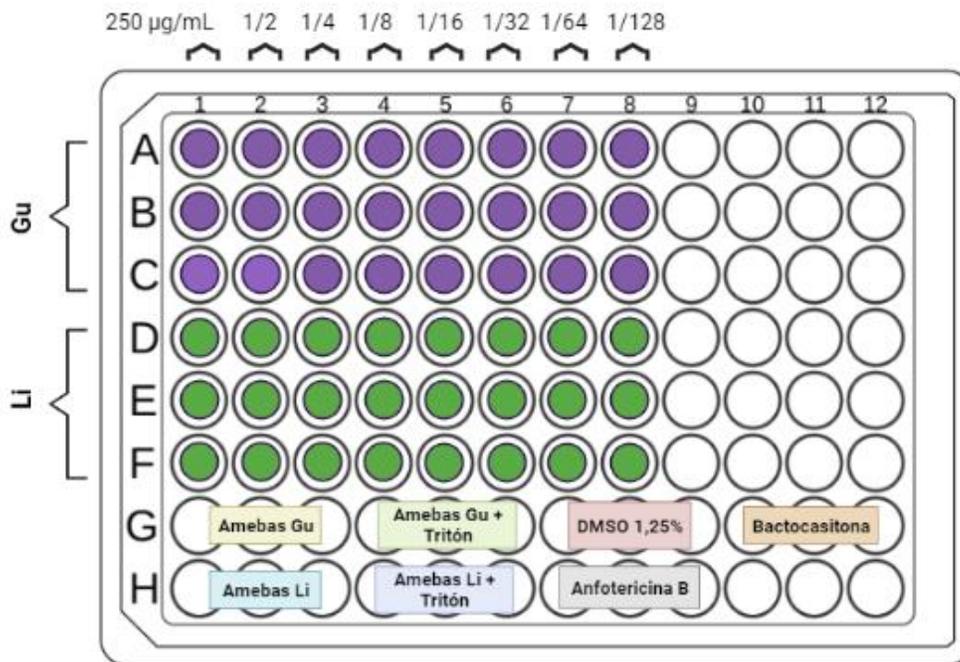


Figura 5. Esquema de la placa de 96 hoyos utilizada para el experimento de susceptibilidad de ambos aislamientos de *N. fowleri* a la anfotericina B.

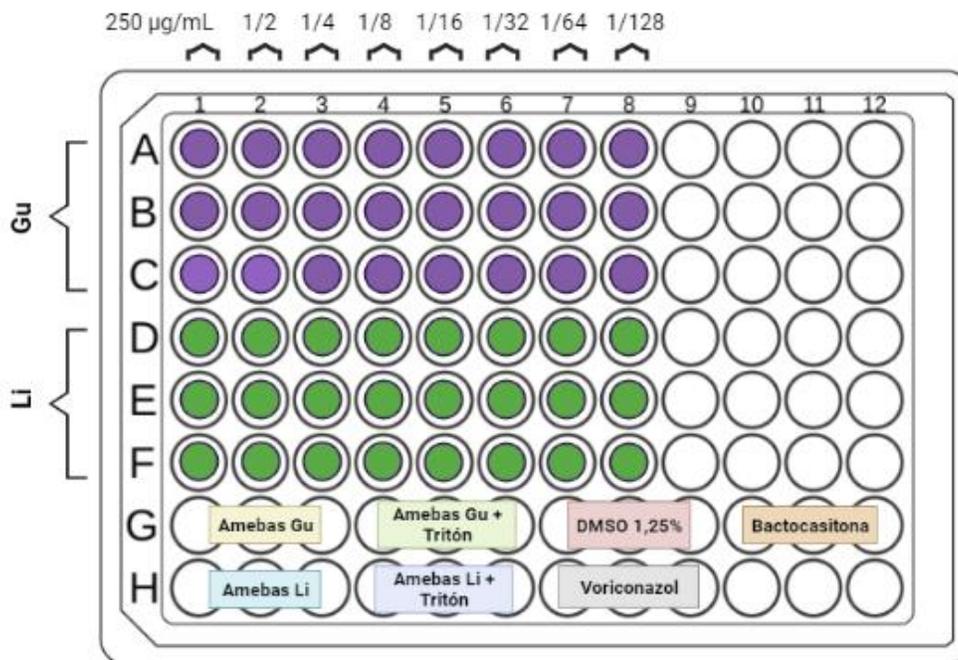


Figura 6. Esquema de la placa de 96 hoyos utilizada para el experimento de susceptibilidad de ambos aislamientos de *N. fowleri* al voriconazol.

5. Análisis estadísticos

Para los experimentos de actividad de DHL, pruebas de viabilidad mediante el reactivo Presto Blue ® y las pruebas de susceptibilidad a fármacos, se realizaron pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para detectar entre cuales tiempos hay diferencias significativas se utilizó una prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0.05$ y se utilizó el programa R.

Para el caso de los experimentos de electroforesis, zimografía y determinación del efecto citopático mediante la tinción con cristal violeta, se realizaron análisis cualitativos comparativos.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1. Determinación del perfil proteico total de los lisados completos de *N. fowleri*

En la Figura 7 se observa el perfil de proteínas totales de los aislamientos axénicos de *N. fowleri* obtenidos de los casos clínicos ocurridos en Costa Rica durante el primer trimestre del 2020. Con el revelado de azul de Coomassie (Figura 7, A) se observaron, para ambos aislamientos, múltiples bandas proteicas entre los 130 y 10 kDa, con la mayor cantidad de ellas bajo los 50 kDa. En ambos casos, se observó una zona de múltiples bandas entre los 35 y los 25 kDa, aproximadamente. Con la tinción de plata (Figura 7, B), se observó la presencia de bandas proteicas de diversos tamaños comprendidos entre los 10 y los 250 kDa, con una zona de múltiples bandas bajo los 35 kDa. En esta tinción es posible observar cuatro bandas proteicas bien definidas entre los 45 y los 60 kDa, aproximadamente, además de una banda muy evidente cercana a los 10 kDa, aproximadamente.

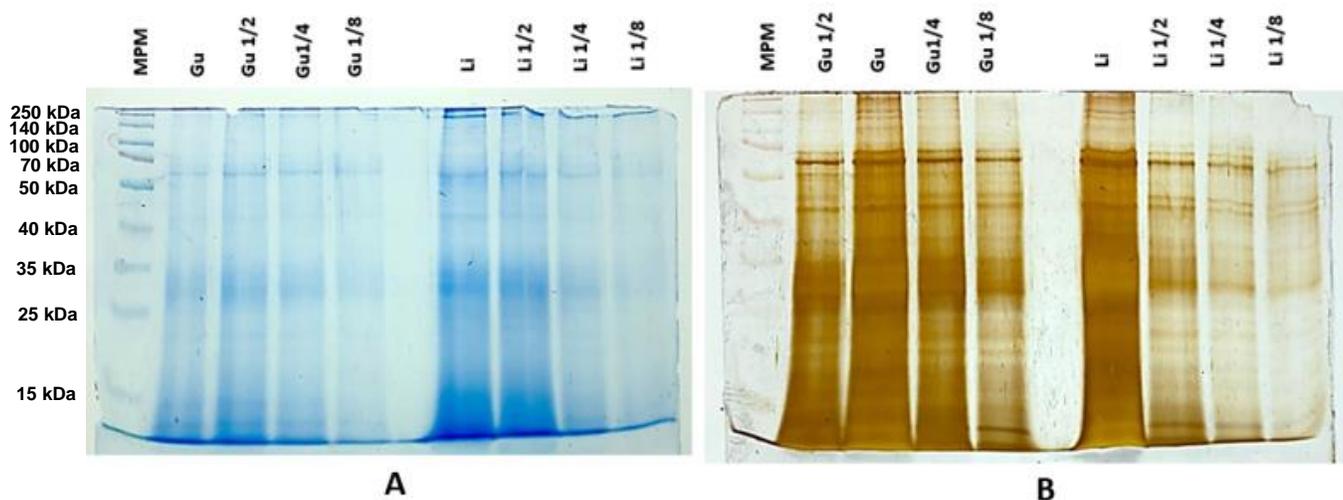


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE de los lisados completos de trofozoítos de los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri*, teñidos con azul de Coomassie (A) y con la tinción de plata (B). La concentración de los lisados que se cargó en los geles fue de 0,95 µg/µL (Gu) y 1,0 µg/µL (Li), con diluciones dobles hasta 1/8 para ambos aislamientos.

4.2. Determinación de proteasas en medio condicionado y lisados completos de trofozoítos de *N. fowleri* mediante zimografía

4.2.1. Zimografías de los medios condicionados de los aislamientos de *N. fowleri*

La Figura 8 muestra la actividad de proteasas de los medios condicionados obtenidos a partir de un cultivo axénico de trofozoítos de los dos aislamientos clínicos de *N. fowleri*. Para ambos aislamientos es posible observar, a un pH de 8.5, dos bandas claras de digestión en el gel, con una masa molecular aproximada de 260 y 140 kDa. Esta actividad fue inhibida al emplear el fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF), indicando que corresponden a proteasas de serina de alta masa molecular. No se detectó la presencia de cisteína ni metalo-proteasas en los aislamientos.

Para las zimografías que emplearon buffer de sustrato con pH 5 y 3 no se observaron bandas de digestión en el gel (no se muestran los resultados).

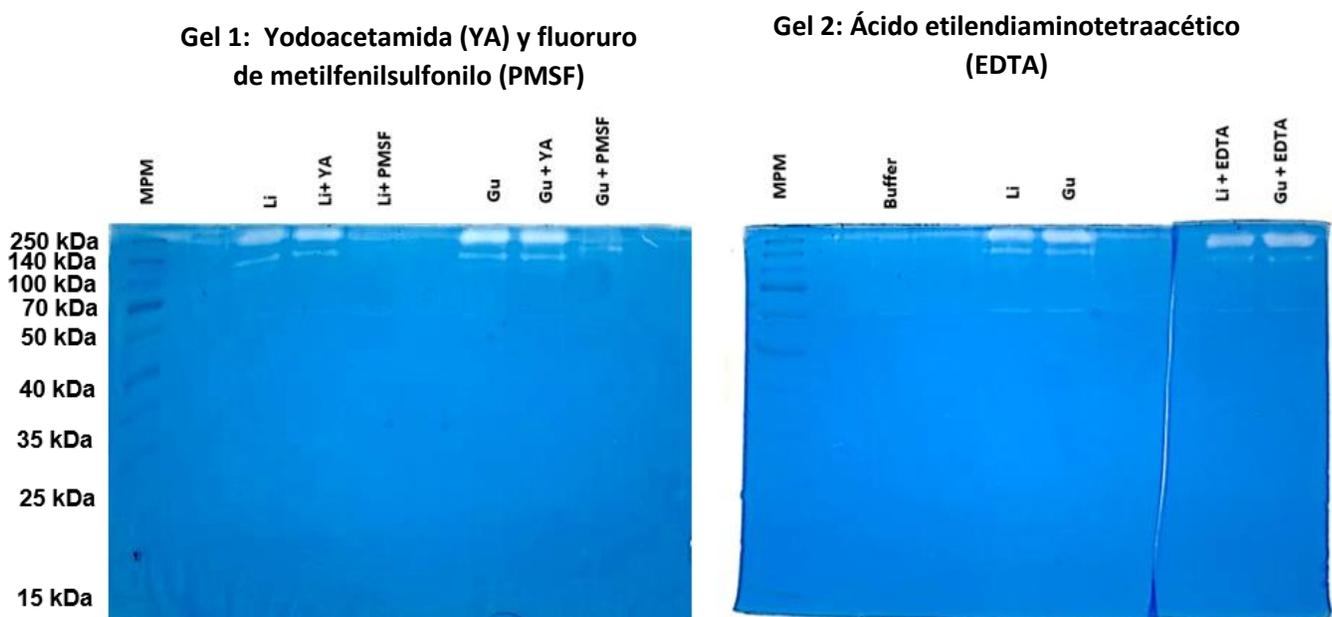


Figura 8. Zimografía que muestra las bandas de digestión de gelatina por parte de los medios condicionados de los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri*, para analizar actividad proteasa con diferentes inhibidores: yodoacetamida (YA) para proteasas de cisteína, fluoruro

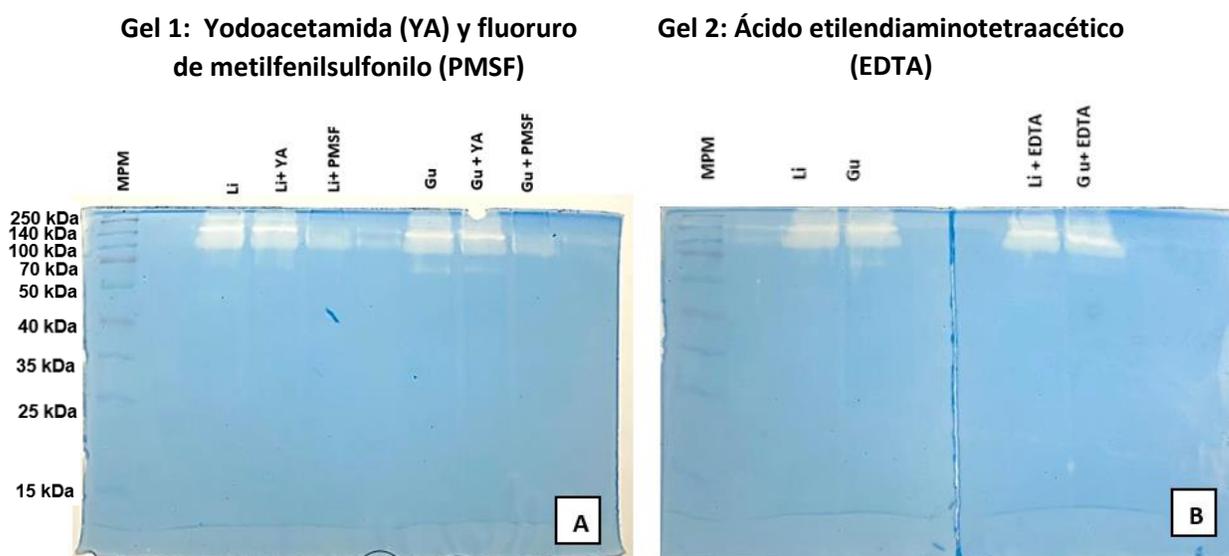
de metilfenilsulfonilo (PMSF) para proteasas de serina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para metaloproteasas. Se utilizó un buffer de sustrato a pH 8.5 (Tris-HCl 50 mM/ CaCl₂ 5 mM). La concentración de los medios condicionados que se cargó en los geles (Gu y Li) fue de 5,00 y 4,70 µg/µL, respectivamente.

4.2.2. Zimografías de los lisados completos de los trofozoítos de *N. fowleri*

En las zimografías de los lisados completos de las amebas (Figura 9) se observó la presencia de actividad de proteasas principalmente sobre los 70 kDa, con una actividad más intensa a un pH de 8,5 para ambos aislamientos. Esta actividad fue inhibida por el PMSF indicando la presencia de proteasas de serina.

Importante destacar que a un pH de 5.0, el aislamiento Li también mostró la presencia de actividad de proteasas entre los 70 y 40 kDa, la cual no fue visible en el aislamiento Gu. Parte de esta actividad fue inhibida también por el PMSF.

La menor actividad se detecta a un pH 3, siendo inhibida por completo al emplear el inhibidor PMSF.



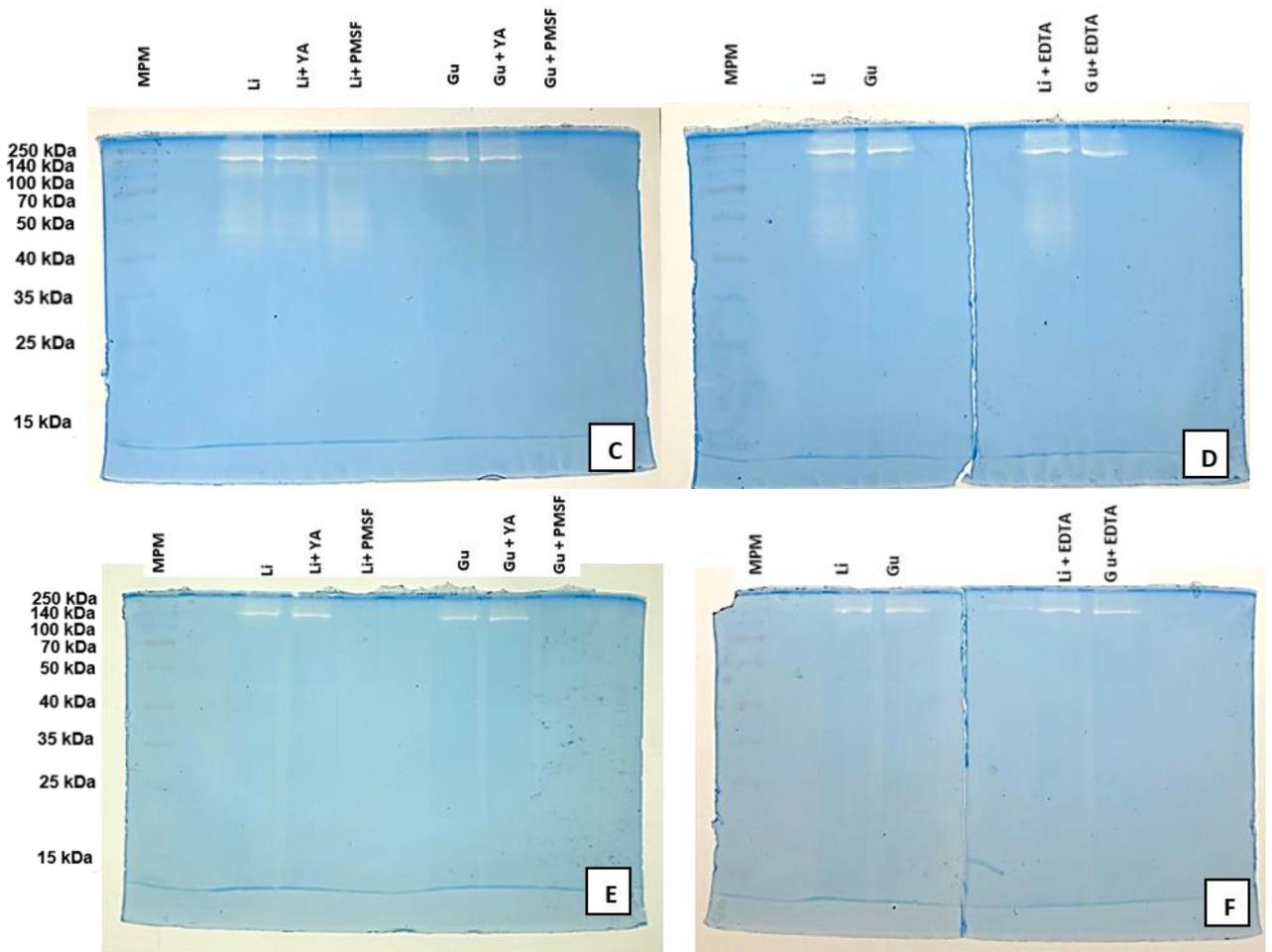


Figura 9. Zimografías mostrando las bandas de digestión de gelatina por parte de los lisados completos de los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri*. Para identificar el tipo de proteasa se emplearon diferentes inhibidores: yodoacetamida (YA) para proteasas de cisteína, fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) para proteasas de serina y ácido etilendiaminoteraacético (EDTA) para metaloproteasas. La actividad fue medida a diferentes pH: **A-B:** pH 8.5 (Tris-HCl 50 mM/ CaCl₂ 5 mM); **C-D:** pH 5 (acetato de sodio 100 mM/ CaCl₂ 2 mM); **E-F:** pH 3 (ácido acético 100 mM/ CaCl₂ 2 mM) La concentración de los lisados que se cargó en los geles fue de 0,95 µg/µL (Gu) y 1,0 µg/µL (Li).

4.3. Estudio de proteómica de los medios condicionados obtenidos del cultivo axénico de los aislamientos clínicos de *N. fowleri*

Como se observa en los Cuadros 2 y 3, en el aislamiento Gu se lograron identificar un número mayor de proteínas de excreción/secreción (64) que en el aislamiento Li (21). Dentro de las proteínas identificadas en ambos aislamientos destaca la presencia de catepsinas, deshidrogenasas, aldolasas, lipasas, ceramidasa, factor de elongación alfa y una proteasa de cisteína específica de *N. fowleri* denominada fowlerpaína.

De las 64 proteínas identificadas del aislamiento Gu, 22 aún no están caracterizadas en la base de datos, así como 5 de las 21 proteínas identificadas en el aislamiento Li.

Cuadro 2. Proteínas representantes por “Protein group” del medio condicionado obtenido del aislamiento Gu de *N. fowleri**

Protein group	Accession	Protein	Mass (Da)
1	A0A1L1XWF9	Fowlerpain-2	33944
2	B5M6J9	Actin (Fragment)	41726
3	A0A6A5BF81	Fructose-bisphosphate aldolase	38294
4	A0A4V8H039	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36595
5	A0A6A5C7K8	CYTOSOL_AP domain-containing protein	59142
6	A0A6A5C6Q4	Lipase_3 domain-containing protein	64041
7	A0A6A5BMB9	Pept_C1 domain-containing protein	27782
8	A0A6A5BZJ4	Uncharacterized protein	23562
9	A0A6A5BVB3	Uncharacterized protein	24508
10	A0A6A5CEE5	Pept_C1 domain-containing protein	35038
11	A0A6A5CFU9	Peptidase A1 domain-containing protein	42776
12	A0A6A5BL20	Uncharacterized protein	95157
13	A0A6A5CD16	VWFA domain-containing protein	245382
14	A0A6A5BUH9	Dihydrolipoyl dehydrogenase	53729
15	A0A6A5BPM9	Thioredoxin domain-containing protein	21652
16	A0A6A5BTR4	Uncharacterized protein	58609
17	X5D761	Cathepsin B protein	38387
18	A0A6A5BUK4	Uncharacterized protein	98523
19	A0A6A5CFJ9	Uncharacterized protein	41447
20	A0A6A5BIT9	Superoxide dismutase	22306

21	A0A6A5C8E9	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	65714
22	A0A6A5BT30	Uncharacterized protein	54916
23	A0A6A5BE22	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (CoA acylating)	58093
24	A0A6A5BD42	Neutral ceramidase	82209
25	A0A6A5BYK8	Adenosylhomocysteinase	51810
26	A0A6A5CAR5	Elongation factor 1-alpha	48776
27	A0A6A5BTZ3	Uncharacterized protein	23727
28	D2VT25	Uncharacterized protein	74484
29	A0A1L1XWF4	Fowlerpain-1	39079
31	A0A6A5BJJ6	Coronin	60814
32	D2VQM7	GlcNAc kinase	37898
35	A0A6A5CIY0	VWFA domain-containing protein	37131
36	A0A6A5BZ92	BPI2 domain-containing protein	59536
37	A0A6A5BAD0	Uncharacterized protein	43672
38	A0A6A5BYE0	Cathepsin J	55166
39	A0A6A5CDG3	Cathepsin J	59326
40	A0A6A5CI59	Uncharacterized protein	74203
41	A0A6A5BAB4	Uncharacterized protein	138332
42	A0A6A5BMI3	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	44324
43	A0A6A5BJM7	Superoxide dismutase	28167
44	A0A6A5BXT8	Phosphoglycerate kinase	44024
45	A0A6A5BJS8	Uncharacterized protein	21433
46	A0A6A5C751	Uncharacterized protein	138248
47	A0A6A5CB00	Formyltetrahydrofolate synthetase	79044
48	A0A6A5C949	Uncharacterized protein	54631
49	A0A1L1XWG7	Fowlerpain-3	38958
52	A0A6A5BSJ3	Peptidase S53 domain-containing protein	60876
53	A0A6A5BIB7	Ubiquitin	14659
54	A0A6A5BR74	Malate dehydrogenase	35799
56	A0A6A5BHG4	Uncharacterized protein	25091
57	A0A6A5BKG2	Uncharacterized protein	121459
58	A0A6A5BDZ7	Uncharacterized protein	89884
59	A0A6A5BEV3	Cathepsin X	32533
60	A0A6A5BX63	Uncharacterized protein	92957
61	A0A6A5CBD3	Uncharacterized protein	43677
62	A0A6A5BQM0	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	53450
63	A0A6A5BQY6	Uncharacterized protein	45773
64	A0A6A5C2L4	Uncharacterized protein	58228

* La concentración del medio condicionado utilizada del aislamiento Gu fue de 6,63 µg/µL.

Cuadro 3. Proteínas representantes por “Protein group” del medio condicionado obtenido del aislamiento Li de *N. fowleri**

Protein group	Accession	Protein	Mass (Da)
1	B5M6J9	Actin (Fragment)	41726
2	A0A4V8H039	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36595
3	A0A1L1XWG9	Fowlerpain-2	33925
4	X5D911	Cathepsin B-like protein	34137
5	A0A6A5C7K8	CYTOSOL_AP domain-containing protein	59142
6	A0A6A5BUH9	Dihydrolipoyl dehydrogenase	53729
7	A0A6A5CFU9	Peptidase A1 domain-containing protein	42776
8	A0A6A5BF81	Fructose-bisphosphate aldolase	38294
9	A0A6A5C751	Uncharacterized protein	138248
10	A0A6A5CFJ9	Uncharacterized protein	41447
11	A0A6A5C8E9	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	65714
12	A0A6A5BHH3	BPP domain-containing protein	52372
14	A0A6A5C6Q4	Lipase_3 domain-containing protein	64041
15	A0A6A5CAR5	Elongation factor 1-alpha	48776
16	X5D761	Cathepsin B protein	38387
17	A0A6A5BE22	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (CoA acylating)	58093
18	A0A1L1XWG7	Fowlerpain-3	38958
19	A0A6A5BJS8	Uncharacterized protein	21433
20	A0A6A5BBI3	Uncharacterized protein	88092
21	A0A6A5BTR4	Uncharacterized protein	58609

* La concentración del medio condicionado utilizada del aislamiento Li fue de 5,75 µg/mL.

4.4. Pruebas del efecto citopático

4.4.1. Prueba de viabilidad de células Vero con cristal violeta

Los resultados de los ensayos para determinar el daño a la monocapa de células Vero por parte de los trofozoítos de *N. fowleri* se muestran en las Figuras 10 y 11. Para ambos aislamientos, mediante la tinción de cristal violeta, se pudo observar que a las 3 horas post infección se inicia la destrucción de la monocapa. Mientras que para el aislamiento Li se tuvo una destrucción casi completa de la monocapa a las 4 horas post infección, para el aislamiento Gu se requirió de 5 horas para lograr ver un efecto mayor sobre las células.

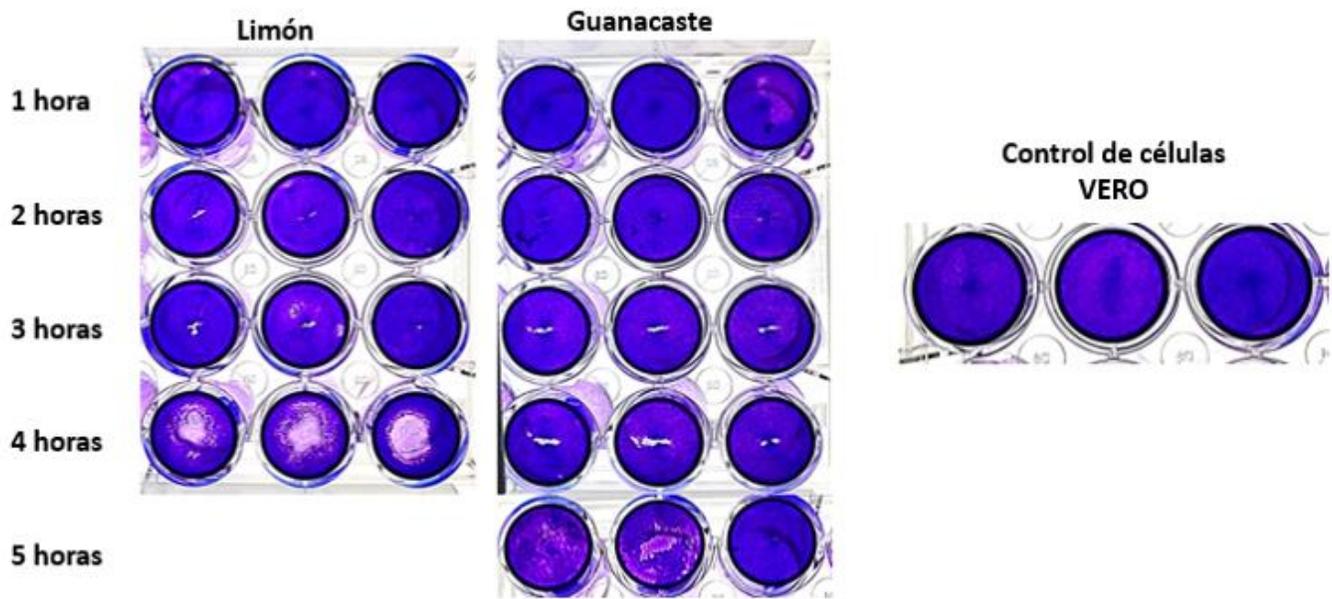


Figura 10. Efecto citopático observado, mediante la tinción con cristal violeta, de los aislamientos clínicos de *N. fowleri* sobre la línea celular Vero. Se emplearon $2,5 \times 10^5$ células/pocillo con un inóculo de amebas de $1,25 \times 10^5$ /pocillo, para una relación de 1:2 amebas por cada dos células. La destrucción del monocapa celular se monitoreo por 5 horas a 37°C .

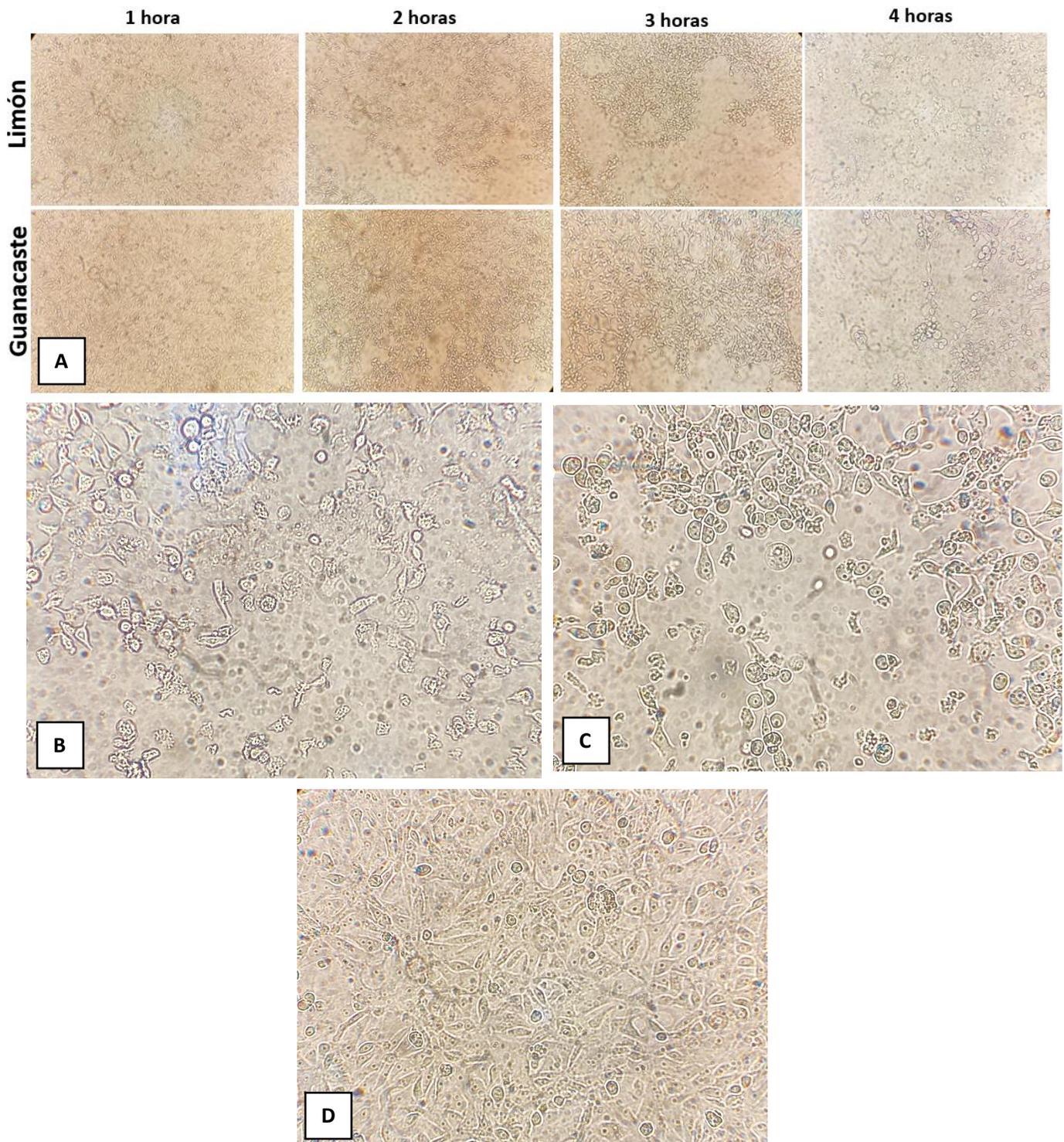


Figura 11. Vista microscópica del efecto citopático de los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri* sobre la línea celular Vero. Se emplearon $2,5 \times 10^5$ células/pocillo con un inóculo de amebas de $1,25 \times 10^5$ /pocillo, para una relación de 1:2 amebas por cada dos células. La destrucción del monocapa celular se monitoreo por 5 horas a 37°C . **A:** Destrucción de la monocapa celular por ambos aislamientos a través del tiempo. **B y C:** Vista ampliada de la

destrucción de la monocapa celular a las 4 horas por parte de Li y Gu, respectivamente. **D:** control de células vero a las 4 horas sin destrucción por parte de las amebas.

4.4.2. Prueba de viabilidad de células Vero mediante cuantificación de deshidrogenasa láctica (DHL)

Para determinar el daño producido por los trofozoítos y medio condicionado de los aislamientos clínicos de *N. fowleri* sobre células Vero, se empleó como indicador la liberación de DHL al medio. El kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay se basa en la liberación de la DHL al medio por parte de las células con la membrana dañada. La DHL se puede detectar por espectrofotometría a 490 nm gracias a una doble reacción enzimática que lo convierte en un producto de formazán rojo (Fisher Scientific, USA).

En el caso de los trofozoítos, los resultados obtenidos indicaron que, a partir de las 3 horas, se inició el proceso de daño, con un aumento sostenido de la enzima liberada hasta el final del experimento (5 horas). El aislamiento Gu presentó un porcentaje de citotoxicidad significativamente mayor (23,0%) al aislamiento Li (10,3%) en la última hora de incubación. Por otro lado, para el caso del experimento con los medios condicionados de los aislamientos, no se observó un aumento en la liberación de DHL al medio con el pasar del tiempo (Figura 12).

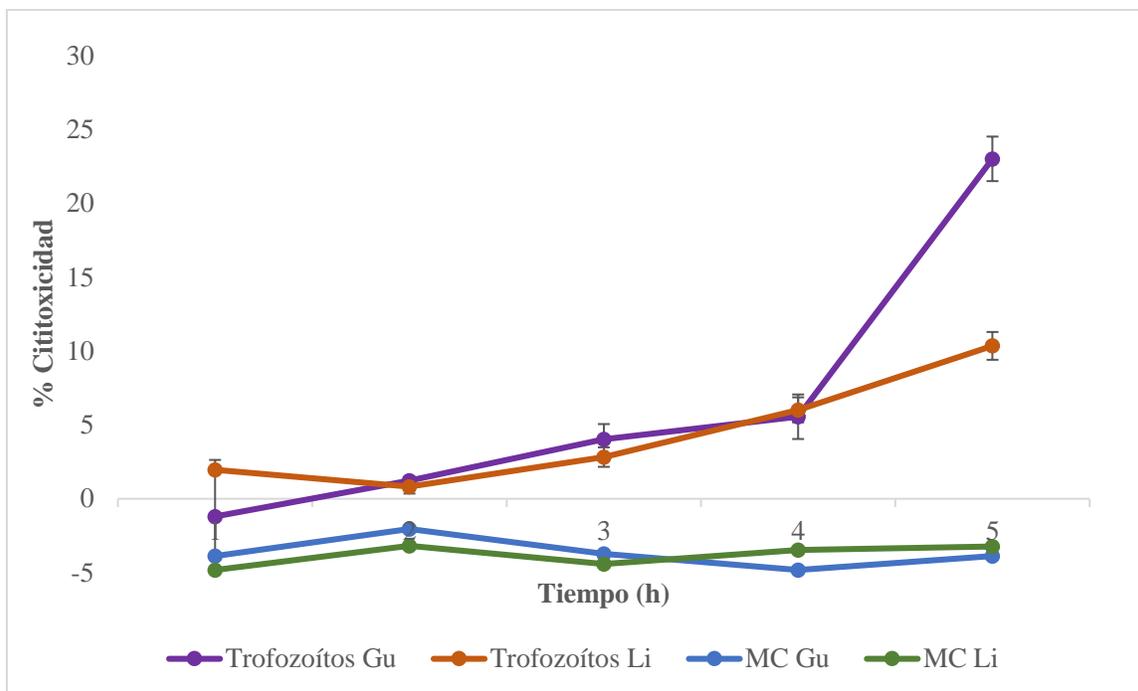


Figura 12. Monitoreo de la muerte celular a través del tiempo de células Vero incubadas con trofozoítos y medios condicionados de los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri*. La muerte celular se cuantificó mediante la liberación de DHL al medio como resultado de la lisis celular. La actividad DHL se monitoreo por 5 horas. La concentración utilizada amebas de ambos aislamientos fue de $1,25 \times 10^5$ amebas/pocillo y la de los MC fue de $5,75 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para Li y $6,63 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para Gu. Los datos se encuentran normalizados con respecto al control de células (actividad espontánea de DHL). No se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos de *N. fowleri* entre la hora y las 4 horas ($p > 0,05$), pero sí hubo diferencias significativas a las 5 horas entre ambos aislamientos ($p < 0,05$). En el caso de las amebas incubadas con los medios condicionados, no se observaron diferencias significativas entre aislamientos ni entre tiempos de incubación ($p < 0,05$).

4.4.3. Prueba de viabilidad de las células Vero con los medios condicionados de las amebas

La Figura 13 muestra el resultado cualitativo de la prueba de viabilidad celular utilizando el reactivo Presto Blue®. Este ensayo es basado en una reacción de oxidación-reducción del

reactivo. Este es un colorante e indicador de óxido-reducción que emite fluorescencia y cambia de color cuando se da el crecimiento celular, como resultado de la reducción química de este dentro de las células metabólicamente activas (ThermoScientific, USA). Como consecuencia, las células viables viran el medio a color rosado, mientras que las células muertas son incapaces de virar el color y lo mantienen azul.

De la Figura se puede observar una disminución de la actividad metabólica celular a partir de los 30 minutos en aquellos pocillos donde se añaden los medios condicionados de las amebas. El resultado cuantitativo del ensayo se muestra en la Figura 14. Los datos confirman el efecto sobre la actividad metabólica de las células Vero. No se observan diferencias significativas entre los dos aislamientos.

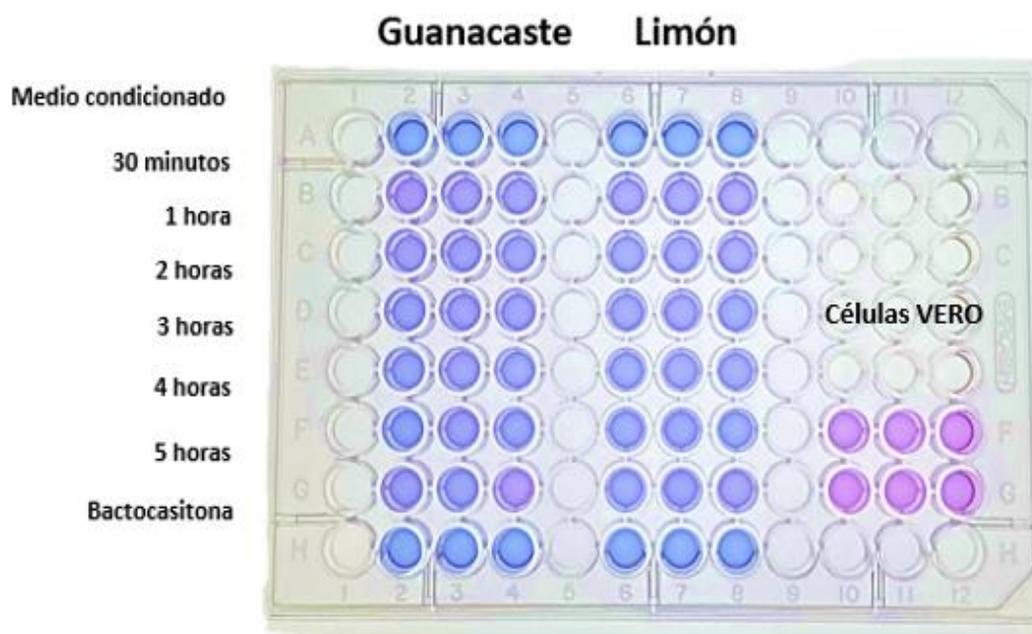


Figura 13. Vista cualitativa de la actividad metabólica a través del tiempo de células Vero incubadas con medios condicionados de los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri*, monitoreada mediante el reactivo Presto Blue®. La concentración de los medios condicionados (Gu y Li) empleados fue de 4,20 y 3,60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente. La actividad metabólica se monitoreo por 5 horas, y la lectura se hizo a las 3 horas luego de añadir el

reactivo Presto Blue® mediante medición espectrofotométrica a una longitud de onda de excitación de 570 nm y de emisión de 600 nm.

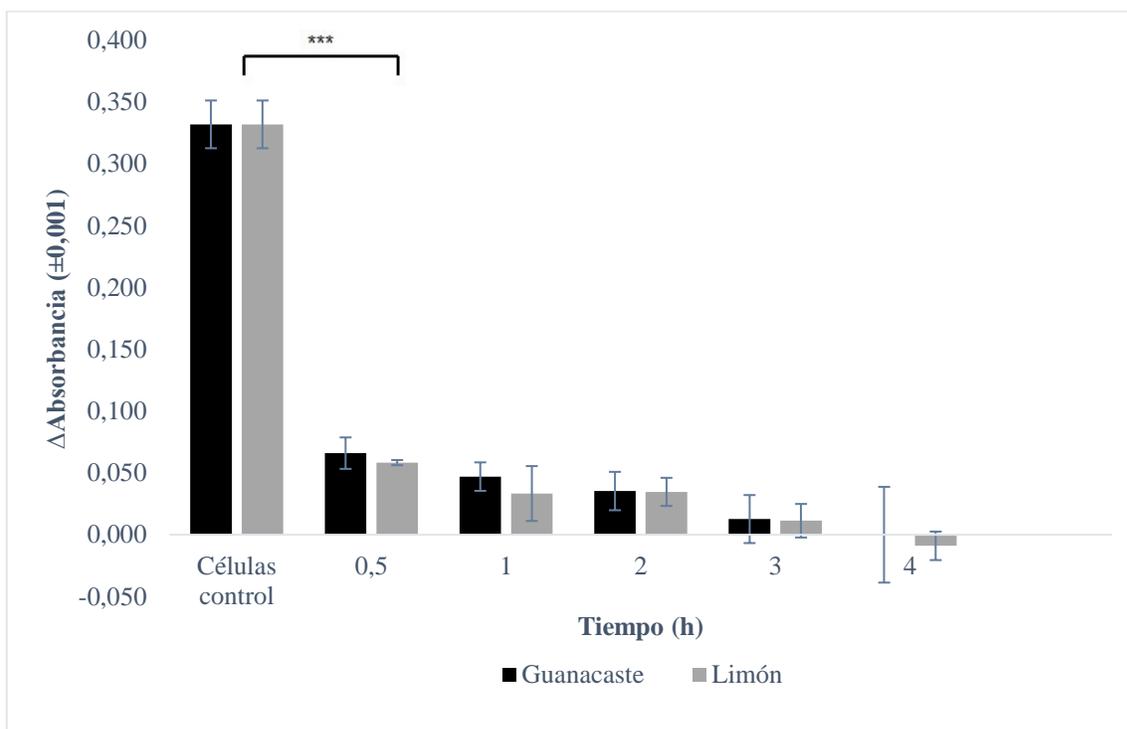


Figura 14. Actividad metabólica a través del tiempo de células Vero incubadas con medios condicionados de los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri*, monitoreada mediante análisis utilizando el reactivo Presto Blue®. La concentración de los medios condicionados (Gu y Li) empleados fue de 4,20 y 3,60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente. La actividad metabólica se monitoreó por 5 horas, y la lectura se hizo a las 3 horas luego de añadir el reactivo Presto Blue®, mediante medición espectrofotométrica a una longitud de onda de excitación de 570 nm y de emisión de 600 nm, llegando a la muerte total a las 4 horas (no se muestran los datos de las 5 horas). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad metabólica de las células control y todos los tiempos de monitoreo ($p < 0,001$), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad metabólica entre ambos aislamientos ($p > 0,05$).

4.5. Pruebas de susceptibilidad a fármacos

En el Cuadro 4 se observan las concentraciones mínimas inhibitorias del 50% de la miltefosina y la anfotericina B contra ambos aislamientos de *N. fowleri*. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las MIC para ambos aislamientos con ninguno de los dos fármacos ($p > 0,05$).

Para el caso del voriconazol, no se alcanzó una inhibición del 50% para ninguno de los aislamientos.

Cuadro 4. Concentraciones mínimas inhibitorias 50% (MIC50) de la miltefosina y la anfotericina B sobre los aislamientos clínicos Gu y Li de *N. fowleri*

	Anfotericina B	Miltefosina
Aislamiento Gu	15,62 µg/mL	2,5 µg/mL
Aislamiento Li	31,25 µg/mL	2,5 µg/mL

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

La meningoencefalitis amebiana primaria es una enfermedad de curso agudo y fulminante producida por *Naegleria fowleri*, una ameba de vida libre con distribución cosmopolita. A nivel mundial, la MAP se considera una enfermedad rara, con un total de 381 casos descritos, la mayoría de ellos reportados en los Estados Unidos (Gharpure *et al.*, 2021). La inexperiencia del personal de salud, combinada con la carencia de metodologías de uso rutinario para su diagnóstico, podrían ser las responsables del subregistro de esta enfermedad, principalmente en las regiones tropicales del planeta (Soontrapa *et al.*, 2022). En el primer trimestre del año 2020 se diagnosticaron en nuestro país los primeros tres casos de MAP en humanos. Para dos de ellos, la posible fuente de infección con la ameba fueron las aguas termales visitadas por las víctimas, mientras que en uno de los casos, fue el agua de uso doméstico obtenida de un pozo artesanal, la que se relacionó con la infección del niño afectado (Retana Moreira *et al.*, 2020).

A partir de los líquidos cefalorraquídeos de dos de los pacientes fue posible el aislamiento de la ameba, logrando, a nivel de laboratorio, su cultivo axénico. Los aislamientos fueron identificados como Guanacaste (Gu) y Limón (Li), por el sitio de origen de los casos. A la fecha, estos se constituyen en los únicos aislamientos clínicos que se registran para la región centroamericana, por lo que su estudio y caracterización podría contribuir al conocimiento de la biología de estos microorganismos que están presentes en las aguas del país y que representan una amenaza a la salud de las personas. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue comparar el perfil proteico y factores de virulencia de ambos aislamientos, así como evaluar su susceptibilidad a fármacos comerciales, con el fin de establecer si existen diferencias significativas entre ellos.

Los resultados de las electroforesis reveladas con azul de Coomassie y tinción de plata evidenciaron que los aislamientos de *N. fowleri* presentan homogeneidad en el perfil de proteínas totales, ya que comparten bandas de la misma masa molecular con algunas variables en la intensidad de las bandas (Figura 7). De acuerdo a lo esperado, la tinción de plata permitió una visualización mayor de componentes proteicos, ya que puede detectar cantidades de hasta 0.1 ng, siendo la tinción ideal cuando se quieren identificar proteínas que

están presentes en baja concentración (Park, 2011). Los perfiles de ambos aislamientos mostraron bandas entre los 10 y 250 kDa, destacándose la presencia de dos pares de bandas con masa molecular cercano a los 45 y 65 kDa respectivamente, además de múltiples bandas bajo los 40 kDa (Figura 7). Lo anterior sugiere que las cepas patógenas circulantes en el país de *N. fowleri* podrían ser bastante conservadas en cuanto a su perfil proteico, a pesar de haber sido aisladas de diferentes lugares. Esto se constituye en una gran ventaja a la hora de pensar en desarrollar nuevas estrategias de tratamiento o de prevención de la infección (como la creación de vacunas), ya que permitiría el uso de blancos compartidos por estas cepas circulantes.

Aún no se tiene suficiente información sobre gran parte del perfil proteico de *N. fowleri* y de su potencial papel como factores de virulencia. Sin embargo, perfiles proteicos similares a los descritos en este trabajo han sido descritos en estudios previos realizados con la ameba. Por ejemplo, en 1982, Woodworth *et al.* demostraron que la mayoría de las proteínas de *N. fowleri* tenían un rango de tamaño entre los 20 y 80 kDa, con predominio de aquellas con una masa molecular entre los 45 y 70 kDa (Woodworth *et al.*, 1982). Kim *et al.*, trabajando con extracto crudo de la cepa ATCC30215 de *N. fowleri*, reportaron la presencia de bandas proteicas entre los 80 y 20 kDa, con una mayoría de bandas bajo los 55 kDa (Kim *et al.*, 2009).

Más recientemente, Flores-Huerta *et al.* observaron, en el extracto crudo de la cepa ATCC30808 de *N. fowleri*, un perfil proteico con bandas de masa molecular entre los 19 y 250 kDa, con predominancia bajo los 70 kDa (Flores-Huerta *et al.*, 2020) y Gutiérrez-Sánchez *et al.* identificaron proteínas en lisados de *N. fowleri* entre los 12 y 250 kDa y se observó que algunas proteínas se encuentran en mayor concentración en *N. fowleri* que en lisados de *N. lovaniensis* (especie no patógena). También, se demostró la presencia de proteínas de 250, 24, 19 y 15 kDa que estaban solo presentes en *N. fowleri* y no en *N. lovaniensis* (Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2020).

En el presente trabajo, por razones de índole presupuestario, no se llevó a cabo la identificación de las proteínas mayoritarias de los lisados; sin embargo, algunos de las masas moleculares observadas podrían coincidir con el de componentes ya descritos en otros

estudios. Por ejemplo, en la cepa ATCC 30894 de *N. fowleri* se describen proteínas con una masa molecular de 100, 75 y 50 kDa que se han identificado como un fragmento de actina, miosina II y proteína de choque térmico, respectivamente (Jamerson *et al.*, 2012). Además, en extractos crudos de la cepa ATCC 30808 y en aislamientos clínicos de *N. fowleri* (cepa Mexicali y JFF), se reporta la presencia de glicoconjugados (relacionados con los procesos de adhesión de la ameba) en proteínas con una masa molecular de 63, 55, 51, 50, 40, 38, 32, 29, 26, 14, 10 y 5 kDa. Aquellos glicoconjugados que contienen α -D-manosa y α -D-glucosa están presentes en un 70% de las cepas de *N. fowleri* y solo un 25% en las de *N. gruberi*, una especie no patogénica que se encuentra en los mismos hábitats ambientales que *N. fowleri* (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2010).

También, se podría sugerir la presencia de la proteína de membrana plasmática Nf-23 (23 kDa), que se ha propuesto como un factor de virulencia de *N. fowleri* ya que está sobreexpresada hasta 40000 veces en esta especie, en comparación con *N. lovaniensis*. Además, se comprobó que el efecto citopático de *N. fowleri* se vió disminuido en presencia de anticuerpos anti-Nf23, mientras que en cultivos con *N. lovaniensis* no hubo daño a la monocapa celular (Flores-Huerta *et al.*, 2020).

Se sugiere que la zona del gel con presencia de muchas bandas de un tamaño pequeño, entre 10 y 35 kDa, aproximadamente, podría abarcar a la fowlerstefina, la proteína de membrana Mp2CL5, y la proteína MUC5AC, entre otras. La fowlerstefina (13 kDa) es un inhibidor de proteasas de cisteína de la familia de las estefinas que produce una respuesta inflamatoria “*in vitro*”, al inducir la expresión de las citoquinas IL-6 y TNF-1 en cultivos de células microgliales, las cuales causan una respuesta inmune exacerbada que contribuye a la patogénesis de la MAP causada por *N. fowleri* (Thái *et al.*, 2020). La proteína de membrana Mp2CL5 (19 kDa) está localizada en los pseudópodos de la ameba y se cree que participa en la unión o detección de nutrientes y otras señales ambientales externas (Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2020; Joseph *et al.*, 2021). Por otro lado, la proteína MUC5AC (250 kDa) se ha observado solo en *N. fowleri* y tiene actividad mucolítica contra la mucina MUC5AC (Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2020).

El análisis del perfil de proteínas es útil no solo para comparar distintas cepas de la misma especie, sino también para determinar las diferencias que pueden existir con especies no patógenas, lo que ayuda a identificar posibles factores de virulencia. Con respecto a esto, se ha demostrado que la especie más cercana filogenéticamente a *N. fowleri* es *N. lovaniensis*, mientras que *N. gruberi* se considera filogenéticamente más distante (Rodríguez-Anaya *et al.*, 2021). Igualmente, existen proteínas que están presentes en mayor cantidad en las cepas de *N. fowleri* que en las cepas no patógenas, por lo que se les ha asociado a factores de virulencia (Joseph *et al.*, 2021). Pendiente para este trabajo quedó la comparación de los aislamientos Gu y Li con cepas de referencia tanto patógenas como no patógenas. Recientemente, gracias a una pasantía realizada en la Universidad de La Laguna en Tenerife, fue posible obtener las cepas ATCC 30808 y ATCC 30215, con las que podrá ser factible realizar estos estudios próximamente.

En cuanto a la determinación de proteasas en los presentes aislamientos, los geles resultantes de las zimografías, tanto de los lisados completos de las amebas como de los medios condicionados, se muestran en la Figura 8 y el patrón de bandas de digestión observadas en estas fue muy similar para ambos aislamientos. Las proteasas o peptidasas son enzimas producidas por diversos organismos en respuesta a los diferentes ambientes en los que se encuentren. Algunas de ellas han sido asociadas con la adquisición de nutrientes, transformación de estadios evolutivos o como respuesta a cambios en el pH del medio. En infecciones producidas por protozoarios se les ha identificado como factores de virulencia, participando en la invasión y el egreso de parásitos intracelulares, en la modulación de la respuesta inmune o incluso en el daño directo a tejido. En el caso particular de las amebas de vida libre, estas enzimas se han asociado a un incremento de la permeabilidad de la célula y de la membrana mitocondrial, así como en la degradación de la matriz extracelular, inducción de apoptosis y muerte de la célula (Retana Moreira *et al.*, 2022).

Para los medios condicionados se determinó, principalmente, una actividad de proteasa del tipo serina, con bandas sobre los 100 kDa y solamente a un pH básico de 8,5. La masa de estas bandas coincidió con algunos de las masas moleculares de las proteasas observadas en las zimografías de los lisados completos (Figura 9), lo que puede indicar que estas son proteasas secretadas al medio por los trofozoítos. Es importante destacar que el pH en el cual

se observa esta actividad es cercano al pH fisiológico, por lo que podría postularse que durante la invasión a un hospedero estas proteasas secretadas podrían tener participación en la patogénesis del cuadro clínico.

Con respecto a las zimografías de los lisados completos (Figura 9), fue posible observar en ellos un mayor número de bandas de digestión que en los MC, con una actividad dependiente del pH del buffer de sustrato. La actividad más intensa fue del tipo serina y se dio a un pH de 8.5, con bandas de digestión con una masa molecular entre los 100 y 140 kDa. A diferencia de los MC, se detectó también actividad de proteasas a pH 5 y pH 3. A pH 3, se observa que la mayoría de proteasas ya no muestran actividad, a excepción de una serina proteasa de alta masa molecular en ambos aislamientos.

Cuando se compara la zimografía de los lisados de ambos aislamientos, los patrones de bandas de digestión resultan muy similares. Sin embargo, es importante destacar que al emplear el buffer de sustrato con pH 8,5, el aislamiento Gu presenta una proteasa de serina de aproximadamente 65 kDa que está ausente en el aislamiento Li. Además, para el aislamiento Li y a un pH de 5.0, se observa una actividad de proteasas, entre los 40 y 70 kDa, que está ausente en el aislamiento Gu. En este último caso, las proteasas no fueron inhibidas significativamente por ninguno de los compuestos utilizados, indicando que puede corresponder a otro tipo de proteasa para la cual no se empleó el inhibidor adecuado. En este sentido, se ha demostrado que, aunque las cisteín-, serin- y metalo-proteasas son los tipos de proteasas más comúnmente analizados, existen las hidrolasas y fosfolipasas que también se han identificado en *N. fowleri* y otros microorganismos (Visvesvara *et al.*, 2007; Coronado-Velásquez *et al.*, 2018).

En otros estudios se ha reportado la presencia de serina proteasas de masas moleculares más bajas que las halladas en las presentes zimografías, como elastasas capaces de degradar proteínas del tejido conectivo (10-40 kDa) (Ferrante & Bates, 1988; Vyas *et al.*, 2015) o la serina proteasa S81 específica de *N. fowleri* (81 kDa), la cual contiene dominios de unión a lisozima de tipo invertebrado (ilys) y a peptidoglicano (Herman *et al.*, 2021).

Contrario a esto, las bandas de alta masa molecular obtenidas en los presentes resultados (más de 100 kDa) podría deberse a la formación de complejos proteicos entre las mismas

proteasas o con otras proteínas, incluyendo proteínas regulatorias como chaperonas, activadores, sus propios inhibidores y otras enzimas que pueden incluso modular su actividad o especificidad, evidenciándose en los geles como bandas de alta masa molecular. Lo anterior se ha reportado en muchas bacterias y organismos eucariotas (como *Plasmodium falciparum*) (Kress *et al.*, 2009; Ah Young, 2015). El hecho de que “*in vitro*”, las proteasas puedan formar complejos con sus inhibidores, también representa una posible fuente de falsos negativos en los resultados, ya que, al estar estas inhibidas, no se podrían evidenciar en los geles de las zimografías.

A la fecha, las proteasas de serina descritas para amebas de vida libre se han relacionado con la degradación de sustratos de la matriz extracelular, especialmente colágeno, laminina, fibrinógeno, fibronectina, fibrina, albúmina, plasminógeno y hemoglobina. Además, en el caso de *Acanthamoeba*, se han relacionado con la invasión y destrucción no solo de tejido cerebral sino de otros tejidos del hospedero, especialmente del estroma ocular, además de estar involucradas en la evasión del sistema inmune al degradar proteínas inmunes como las inmunoglobulinas A y G, interleucina 1 y ciertas citoquinas del hospedero (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; de Lacerda & Lira, 2021).

Los resultados del presente trabajo difieren de los publicados por Serrano-Luna *et al* (2007), quienes determinaron que la principal actividad de proteasas en aislamientos de *N. fowleri* es del tipo cisteína, aunque su expresión también se determinó que dependía del pH del sustrato empleado. Esta discrepancia en el tipo de proteasa ya había sido observada recientemente por nuestro grupo de investigación cuando, trabajando con estos mismos aislamientos, se determinó que las proteasas incluidas en las vesículas extracelulares tenían una mayor actividad del tipo serina, con una baja presencia de proteasas de cisteína y metaloproteasas. Estas exovesículas son moléculas lipídicas pequeñas a las que se les ha asociado funciones de comunicación intracelular, inmunomodulación y patogénesis (Retana Moreira *et al.*, 2022).

En *N. fowleri*, estas proteasas de cisteína han mostrado tener actividad a pH ácido (entre 4,5 y 6,5), siendo su máxima actividad a pH de 4,5, y han mostrado un tamaño de 34 y 38,4 kDa, respectivamente. Además, a un pH neutro, estas proteasas se vuelven inestables y a un pH de 8 se ha visto que pierden su actividad (Lee *et al.*, 2014). También, a pH de 7, se ha observado

la presencia de proteasas de cisteína de masas moleculares de 172, 135, 80 y 60 kDa (Lee *et al.*, 2014; Martínez- Castillo *et al.*, 2015; Jahangeer *et al.*, 2020).

Es importante recalcar que, para los aislamientos utilizados en este trabajo, no es posible descartar la producción de proteasas de cisteína por parte de las amebas porque se ha visto en estudios previos que estas se ven inhibidas al no contar con sustratos específicos de la matriz extracelular que inducen su secreción y/o las condiciones de mantenimiento en las que se encuentren al momento del ensayo (Jamerson, 2011; Vyas *et al.*, 2015). En las zimografías realizadas no se utilizó ningún sustrato adicional a la gelatina, por lo que esto podría explicar la ausencia de bandas de digestión de este tipo de proteasas.

Por ejemplo, en experimentos relacionados con la capacidad de invasión de la cepa ATCC 30894 de *N. fowleri* y de *N. lovaniensis*, Jamerson (2011) reportó niveles bajos de expresión de proteasas en MC, previo al contacto de las amebas con Matrigel (un sustrato que imita la matriz extracelular) y colágeno. Posterior a esta exposición, le fue posible evidenciar la presencia de bandas de digestión de 65 y 37 kDa (cuando se usó Matrigel) y de 250 y 55 kDa (cuando se emplea colágeno). Resultados similares fueron reportados por Vyas *et al.* (2015), quienes detectaron una proteasa de cisteína de 58 kDa, tanto en lisados como en medios condicionados de *N. fowleri* al exponer las amebas a un contacto previo con Matrigel, sugiriendo además que esta proteasa podría estar involucrada en el paso de la ameba hacia sistema nervioso central, ya que, al usar inhibidores de proteasas de cisteína, la migración a través del matrigel se inhibía (Vyas *et al.*, 2015).

Finalmente, en el caso de las metaloproteasas, aunque en la literatura está descrita la presencia de estas en *N. fowleri* (como MMP-2 (gelatinasa A), MMP-9 (gelatinasa B) y MMP-14 (metaloproteína de matriz tipo-1 de membrana)), en el presente trabajo no se vio actividad proteasa de este tipo de enzimas ni en los lisados ni en los medios condicionados de ambos aislamientos (Lee *et al.*, 2014; Jahangeer *et al.*, 2020). Serrano-Luna *et al.*, obtuvieron resultados similares y proponen que el efecto del pH es un factor muy importante que influye en los patrones de proteasas observados en las zimografías. Los trofozoítos pueden tener diferente actividad de proteasas a diferentes pHs como estrategia de la ameba para poder tener acceso a nutrientes de diferentes ambientes, incluyendo tejidos humanos. También, demostraron que el pH y la temperatura óptima para actividad proteolítica, tanto

en lisados como medios condicionados, es de 7.0 a 35 °C, sugiriendo que estas están activas cuando los trofozoítos infectan al ser humano, al ser pH fisiológico (Serrano-Luna *et al.*, 2007).

Adicionalmente, las metaloproteasas son proenzimas que necesitan ser activadas mediante un corte proteolítico a cargo de otra metaloproteasa o de su respectivo endopéptido. Si estas enzimas no son activadas, su actividad no se va a observar en las zimografías y puede dar la falsa impresión de que no están presentes. La funcionalidad de estas proteasas se puede ver inhibida por inhibidores tisulares o proteínas extracelulares. Por ejemplo, Lam *et al.*, observaron la presencia de las metaloproteasas MMP-2 (gelatinasa A), MMP-9 (gelatinasa B) y MMP-14 (metaloproteínasa de matriz tipo-1 de membrana) mediante Western blot, tanto en los lisados como en los medios condicionados de *N. fowleri*, pero MMP-9 no se pudo observar en las zimografías (Lam *et al.*, 2017).

Una diferencia en la expresión de proteasas también ha sido observada entre las cepas de *N. fowleri* que se mantienen por inoculación intranasal en ratones y las que se mantienen “*in vitro*” en medios axénicos. En el primero de los casos, los trofozoítos mantienen una alta virulencia y tienden a expresar una mayor concentración de proteasas (serina, cisteína y metaloproteasas), posiblemente por la necesidad de movilidad e invasión al sistema nervioso del ratón; mientras que aquellos que se mantienen en medios axénicos van perdiendo virulencia con el tiempo y los niveles de expresión de estas proteínas disminuyen y podrían no llegar a detectarse (Lam *et al.*, 2017). En el caso de las presentes zimografías, estas se realizaron con cultivos de *N. fowleri* mantenidos “*in vitro*” por varios meses, lo que pudo contribuir a que se detectaran tan pocas proteasas. Sin embargo, también podría deberse a diferencias reales en el perfil de proteasas de las cepas.

Para obtener más información sobre el tipo de proteínas presentes en los medios condicionados de ambos aislamientos de *N. fowleri*, mediante el análisis por espectrometría de masas en tándem se lograron identificar más proteínas de excreción (64) en el aislamiento Gu que en el aislamiento Li (21) que se pueden observar en los Cuadros 2 y 3. En total, 18 de las 21 proteínas del aislamiento Li son compartidas con Gu, a excepción de una proteína similar a catepsina-B (X5D911), una proteína que contiene el dominio BPP (A0A6A5BHH3) y una proteína no caracterizada (A0A6A5BBI3). El aislamiento Gu presentó por su parte, 46

proteínas que no se identificaron en el aislamiento Li. Dentro de las proteínas identificadas destaca en ambos aislamientos la presencia de las catepsinas discutidas anteriormente, deshidrogenasas, aldolasas, lipasas, coroninas, proteasas aspárticas, ceramidasa y una cisteína proteasa única de *N. fowleri* denominada fowlerpaína, que podría considerarse un posible factor de virulencia de estas amebas de vida libre.

Otras investigaciones han comprobado que las proteasas similares a catepsina-B se encuentran presentes en otros protozoarios como *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* y *Leishmania* sp. (Siqueira-Neto *et al.*, 2018; Rawat *et al.*, 2021). Otras proteasas como proteasas aspárticas también se han descrito en *N. fowleri* (Nfa1) y en otros organismos como *Leishmania* sp. y *T. cruzi* (O Santos *et al.*, 2013).

En el caso de las catepsinas J y X, no hay reportes en la literatura de su presencia en otros protozoarios, siendo las que más se reportan las catepsinas B y L. La coronina, involucrada en la organización y regulación del citoesqueleto, así como en el tráfico y la señalización de la membrana, también es expresada por *E. histolytica*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *P. falciparum*, *T. gondii* y *Leishmania* sp. (Gupta *et al.*, 2015). La ceramidasa neutral juega un papel importante en la regulación del metabolismo de los esfingolípidos (conversión de ceramida en esfingosina, que tiene funciones a nivel de la modulación de la apoptosis y del sistema inmune del hospedero). Esta vía metabólica también es de suma importancia en otros parásitos como *Leishmania* sp., *T. cruzi* y *T. brucei* (Booth & Smith, 2020).

Finalmente, las fowlerpaínas 2 y 3 son peptidasas con actividad cisteín- proteasa que son expresadas únicamente en *N. fowleri* y podrían cumplir un papel importante en la degradación de proteínas del tejido del hospedero (Retana Moreira *et al.*, 2022). Otros protozoarios presentan este tipo de proteasas específicas, pertenecientes a la familia de las proteínas similares a la papaína como por ejemplo las falcipaínas de *Plasmodium falciparum* y las vivapaínas de *P. vivax* (Rawat *et al.*, 2021).

Por lo tanto, existe una gran superposición en los tipos de proteasas que se encuentran en *N. fowleri* y otros protozoarios, lo que indica que estas proteasas probablemente estén involucradas en procesos celulares conservados en una amplia gama de organismos

eucariotas. Sin embargo, las funciones y roles específicos de estas proteasas pueden diferir entre diferentes organismos y pueden ser específicos de su patogenicidad.

De las 64 proteínas de excreción identificadas del aislamiento Gu, 22 aún no están caracterizadas en la base de datos, así como 5 de las 21 proteínas identificadas en el aislamiento Li. Esto evidencia la falta de información que aún existe sobre estos microorganismos y sobre sus factores de virulencia, y refuerza la necesidad de hacer más investigaciones para poder entender mejor sus mecanismos de patogénesis. Por ejemplo, se necesitan más estudios utilizando cepas con virulencia potenciada (al inocularlas en ratones) o bien más estudios proteómicos y genómicos que ayuden a dilucidar mejor el perfil de proteasas de los aislamientos, teniendo siempre en cuenta que este es variable de acuerdo a las condiciones del medio (pH, nutrientes y temperatura), presencia de inhibidores, grado de virulencia, entre otros posibles factores.

En cuanto al estudio del efecto de los factores de virulencia de los aislamientos de *N. fowleri*, se observa en la Figura 10 el daño a la monocapa al incubar las células Vero con ambos aislamientos de las amebas y se evidencia que el aislamiento Li presentó mayor agresividad en comparación con el aislamiento Gu. A las 4 horas, la destrucción por parte del aislamiento Li era casi completa, mientras que para Gu aún a las 5 horas no se lograba ver un efecto de esa magnitud. Igualmente, en la Figura 11 se observa que con el pasar de las horas las células Vero empiezan a despegarse primero entre ellas y luego de la botella para adquirir formar esféricas inviables. Además, se ve como en el aislamiento Li a partir de las 2 horas de incubación ya se observan agujeros más grandes en la monocapa (a nivel microscópico), en comparación con el aislamiento Gu.

A pesar de estos resultados, fue el aislamiento Gu el que tuvo un porcentaje de citotoxicidad mayor a las 5 horas de incubación sobre células Vero, como se discutirá más adelante. En otras dos ocasiones, nuestro grupo de investigación sí observó mayor destrucción de la monocapa celular por parte del aislamiento Gu, lo cual se correlaciona mejor con los resultados obtenidos en este trabajo.

Muchos factores pueden afectar los resultados de un ensayo cualitativo como el presente. Desde factores humanos y físicos como la habilidad de pipeteo o el material de la placa

utilizada que podría causar desprendimientos inespecíficos de las células, hasta factores asociados a los microorganismos, los cuales al ser seres vivos presentan fluctuaciones en su comportamiento dependientes enormemente de las condiciones ambientales y experimentales. Por ejemplo, este comportamiento y la virulencia de estos puede variar significativamente debido a las condiciones del cultivo axénico como la disponibilidad de nutrientes, estrés por competencia (por diferencias en la confluencia celular en las botellas) y número de pasajes. Estos factores pueden disminuir la virulencia “*in vitro*” y causar diferencias entre experimentos. Sin embargo, en general, los aislamientos mostraron una capacidad de destrucción celular muy similar, en donde en las primeras horas de incubación no se observan grandes diferencias entre ellos y es hasta las últimas horas en donde surgen estas discrepancias.

Para obtener resultados más reproducibles, sería valioso estandarizar algunas condiciones de cultivo que no se tomaron en cuenta en los presentes experimentos como la densidad de las amebas en las botellas e incluso se podría potenciar la virulencia de estas mediante la inoculación intranasal de los trofozoítos en ratones. Igualmente, el ensayo con cristal violeta es cualitativo y carece de sensibilidad al ser afectado por muchos factores como los ya mencionados. Por eso, siempre es recomendable utilizar al menos un segundo método que sea cuantitativo y con una mayor precisión, que proporcione un resultado medible que permita hacer comparaciones, como el ensayo de medición de liberación de DHL por parte de una línea celular, que se discutirá más adelante. Con estos, se obtienen resultados menos subjetivos, más confiables y que permiten hacer comparaciones más fidedignas entre diferentes aislamientos.

Otras investigaciones han realizado estudios semejantes en otras especies de amebas de vida libre patógenas como *Acanthamoeba* sp. y *Balamuthia mandrillaris*, demostrando que estas especies ejercen una destrucción celular en períodos mucho más prolongados que van desde las 24 hasta las 240 horas para especies como *Acanthamoeba* sp. Además, para esta especie, se ha visto que el daño se da por un mecanismo contacto-dependiente y que factores solubles como proteasas no alteran la monocapa celular, a diferencia de *N. fowleri*, en donde las proteasas secretadas han sido muy estudiadas como posibles factores de virulencia (Takaoka-Sugihara *et al.*, 2012; González-Robles *et al.*, 2014; Alsaadawi *et al.*, 2019). En el caso de

B. mandrilaris, se ha visto que el daño celular empieza desde los 4 hasta los 8 días aproximadamente, alcanzando una destrucción total hasta incluso 16 días después, mediante un mecanismo de picnosis (Yera *et al.*, 2015). Lo anterior evidencia la alta virulencia que tiene la especie *N. fowleri* en comparación con otras especies de amebas de vida libre, ya que es capaz de generar una destrucción celular “*in vitro*” en muy pocas horas, comparado con los días que son necesarios para que otras especies alcancen ese nivel de destrucción.

Los presentes resultados demostraron, además, que las amebas causan una destrucción celular contacto-dependiente ya que, como se observa en la Figura 12, hubo un aumento de la actividad de la DHL con el pasar del tiempo en las células Vero incubadas con los trofozoítos completos de *N. fowleri*. En el caso de la producción de DHL, sólo se observó una diferencia significativa a las 5 horas, con una mayor liberación por parte de las células expuestas al aislamiento Gu (porcentaje de citotoxicidad de 23,0% comparado con el 10,3% del aislamiento Li). Para el resto de los tiempos, la diferencia en los resultados no fue significativa entre los dos aislamientos. Por otro lado, al evaluar la capacidad citopática de los medios condicionados, no se observó un aumento en la liberación de DHL por parte de las células Vero en ninguno de los tiempos ensayados (Figura 12), lo que indica que los MC no son capaces de lisar las células.

Los mecanismos por los cuales *N. fowleri* es capaz de hacer daño a las células se dividen en contacto-independientes y contacto-dependientes. En el primero, participan las proteasas secretadas por estos microorganismos, como ya se discutió anteriormente, además de la producción de citoquinas inflamatorias en las células, inducida por las amebas.

En cuanto al daño contacto-dependiente, es bien sabido que los trofozoítos de estas amebas llevan a cabo un proceso de trogocitosis en donde fagocitan trozos de la membrana celular de las células mediante sus copas alimenticias, causando la lisis de estas. Se ha demostrado que este proceso está mediado principalmente por una proteína de actina (Nfa1). Nfa1 es una proteína única de *N. fowleri* de 54 kDa que se encuentra principalmente en citoplasma, pseudópodos y copas alimenticias. Se ha observado que se localiza en las copas alimenticias especialmente cuando las amebas están en contacto con otras células. Este proceso requiere de la polimerización de monómeros de G-actina sobre filamentos de F-actina (Shin *et al.*,

2010; Sohn *et al.*, 2010). Además, esta proteína muestra actividad de adhesión hacia sustancias como fibronectina, colágeno I y fibrinógeno (Shon *et al.*, 2019).

También, se ha comprobado que los trofozoítos interfieren con las uniones intercelulares estrechas. Específicamente, *N. fowleri* disminuye la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés) aumentando la permeabilidad de la membrana epitelial e induciendo cambios en los anillos apicales de actina y desestabilización de las proteínas ZO-1, claudina-5, ocludina y caludina-1 y, por lo tanto, facilitando la invasión de los trofozoítos de *N. fowleri* por una ruta para celular, lo que también probablemente facilita su penetración a través del epitelio olfatorio e invasión al sistema nervioso central. También, las amebas expresan moléculas inflamatorias que contribuyen al proceso de patogénesis como VCAM-1 e ICAM-1 y la producción de IL-8, IL-1b, TNF-a, IL-6, caspasa-1, así como de óxido nítrico (Shibayama *et al.*, 2013; Coronado-Velázquez *et al.*, 2018). De igual manera, proteínas asociadas al citoesqueleto como paxilina y vinculina también se ven degradadas en la incubación con las amebas, y se ha visto que la liberación de DHL de las células se da de una manera tiempo y dosis-ameba dependiente (Song *et al.*, 2011). El otro mecanismo por el cual *N. fowleri* causa lisis celular es mediante necroptosis a partir de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de NADPH oxidasa (NOX) (Song *et al.*, 2011).

Los resultados del presente trabajo evidenciaron también que, aun sin lisar las células, las proteasas secretadas en los medios condicionados provocaron una detención del metabolismo, ya que como se observa en las Figuras 13 y 14, hubo una disminución de la actividad metabólica de las células con el pasar del tiempo, llegando a una actividad de 0 a las 4 horas. Lee *et al.* observaron que las proteasas secretadas de *N. fowleri* podrían causar apoptosis en células microgliales, observándose cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina celular y liberación de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6, and IL-1 β , sin causar la lisis de la célula (Lee *et al.*, 2011). Kim *et al.* también demostraron que algunas moléculas de excreción-secreción de *N. fowleri* inducían una apoptosis temprana en células microgliales humanas (aproximadamente 30 minutos), demostrando un daño independiente de contacto. El porcentaje de apoptosis de las células fue mayor que el porcentaje de apoptosis de las células en presencia de los lisados de *N. fowleri*. Además, se observó un porcentaje de apoptosis bajo en *N. gruberi* (Kim *et al.*, 2008).

Al analizar estos resultados cobra sentido que, en el experimento de liberación de DHL, el porcentaje de citotoxicidad de los medios condicionados fuera incluso menor al del control de liberación espontáneo de células (por debajo de 0%), indicando que los medios condicionados alteran y frenan el metabolismo celular, lo cual se puede manifestar como una disminución en la producción y consecuente liberación de DHL al medio.

Finalmente, los resultados de las pruebas de susceptibilidad a fármacos del presente trabajo mostraron que la miltefosina y la anfotericina B tuvieron actividad quimioterapéutica contra los aislamientos autóctonos de *N. fowleri* (Cuadro 4), sin evidencia de diferencias en cuanto a la susceptibilidad a estos medicamentos entre ambos aislamientos. Para la miltefosina, ambos aislamientos mostraron ser sensibles a la última dilución empleada en este trabajo, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, siendo más baja que la reportada en la literatura y sugiriendo que este fármaco parece ser altamente eficaz y se podría considerar en el esquema terapéutico de casos de MAP en el país. En el caso de la anfotericina B, la concentración mínima inhibitoria fue de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para Li y 15,62 $\mu\text{g/mL}$ para Gu, siendo mucho mayor al promedio reportado en la literatura. Con respecto a esto, estudios “*in vitro*” han determinado que las MIC50 para cepas de referencia de *N. fowleri* corresponden a 0,78 $\mu\text{g/mL}$ (Kim *et al.*, 2008) para la anfotericina B, así como valores entre 25 $\mu\text{g/mL}$ (Kim *et al.*, 2008) y 40 μM (36,96 $\mu\text{g/mL}$) (Schuster *et al.*, 2006) para la miltefosina. Recientemente, Russell & Kyle (2022) determinaron las MIC50 de distintos fármacos para aislamientos clínicos de *N. fowleri*, incluyendo anfotericina B y miltefosina, y reportaron valores muy variables entre 0,63 μM (0,15 $\mu\text{g/mL}$) y 1,73 μM (1,60 $\mu\text{g/mL}$) para la anfotericina B, así como entre 18,6 μM (7,6 $\mu\text{g/mL}$) y 116 μM (47 $\mu\text{g/mL}$) para la miltefosina.

Por otro lado, el voriconazol no alcanzó una concentración inhibitoria del 50% “*in vitro*” contra ninguno de los aislamientos de *N. fowleri*. Al analizar los datos no se obtuvo ninguna curva de regresión que se ajustara a estos, por lo que se necesitan probar concentraciones más altas “*in vitro*” para llegar a una mejor conclusión, lo cual se ve dificultado por la baja solubilidad de estos compuestos en agua, a diferencia de la miltefosina que es soluble en agua y permitió la evaluación de concentraciones más altas en el experimento.

En el caso de la anfotericina B, estos resultados suponen una situación preocupante al ser este medicamento el único aprobado por la CDC como tratamiento de primera línea para la

MAP y el cual se ha utilizado en todos los casos de pacientes sobrevivientes, aunque la tasa de supervivencia con su uso ha sido solo de un 5%. El hecho de que para las cepas autóctonas de nuestro país se obtenga una MIC tan alta supone un problema para el manejo de los eventuales pacientes con MAP en el país, ya que probablemente no dará resultados positivos (al menos si se usa como monoterapia) y además expondrá a los pacientes a la alta toxicidad que deriva de este medicamento. Como los pacientes más afectados por estas infecciones son niños, la nefrotoxicidad derivada de la administración de anfotericina B supondría un daño sistémico que muy probablemente tendría consecuencias a largo plazo y afectaría su calidad de vida. Además, presenta otros efectos secundarios como escalofríos, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, anorexia y cuadros de disnea (Bellini *et al.*, 2018). El uso de este fármaco es discutido porque no se dirige a nada específico del parásito, si no que participa en la lisis de las membranas celulares al interactuar con los esteroides de estas, tanto en los hongos como en los parásitos y presenta una baja solubilidad que trae consigo problemas de absorción, biodisponibilidad y eliminación (Martín-Ecolano *et al.*, 2021).

Es importante tomar en cuenta que la mayoría de investigaciones de susceptibilidad a fármacos se han realizado con aislamientos de hace muchos años, o bien, con cepas de referencia ATCC de *N. fowleri*, ya que existen escasos aislamientos clínicos de este microorganismo alrededor del mundo, incluidos los del presente trabajo. Por lo tanto, obtener resultados que reflejen mejor la realidad de la patogenicidad de este parásito en la naturaleza es muy valioso para poder encaminar mejor la prospección de nuevas estrategias terapéuticas.

Las cepas de referencia mantenidas bajo condiciones de laboratorio controladas pueden mostrar comportamientos muy discrepantes y virulencias disminuidas en comparación con los de las cepas salvajes que se encuentran en las fuentes de agua natural. Debido a esto, la susceptibilidad a la anfotericina B entre aislamientos clínicos y de referencia podría variar muy significativamente, lo que podría tener que ver con la baja tasa de supervivencia que se ha observado al utilizar este fármaco en la clínica, ya que se podrían estar usando concentraciones muy por debajo de concentración terapéutica ideal e incluso pasando por alto posibles resistencias a este u otros fármacos. Es por esto que se hace importante la búsqueda de drogas que sean eficaces contra las infecciones por *N. fowleri*.

Muchos estudios han demostrado que el éxito en el tratamiento de la MAP radica en usar combinaciones de fármacos (lo cual muestra porcentajes de supervivencia más altos que las monoterapias), además de una rápida sospecha clínica, un diagnóstico temprano y específico y el adecuado manejo de la presión intracraneal. Muchas investigaciones proponen, además, la prospección de drogas eficaces contra la MAP, utilizando las que ya están aprobadas para otras patologías en lugar de la prospección de nuevos medicamentos, ya que estos últimos demandan mucho tiempo, corren muchos riesgos de no funcionar y requieren muchos recursos económicos para poder estudiarlos. Por ejemplo, se necesitan experimentos que incluyan el estudio de morfología y conteo de amebas, ensayos de viabilidad que requieren semanas, grandes volúmenes de medios de cultivo para los ensayos o medición de ciertos metabolitos indicadores de daño como la liberación de lactato deshidrogenasa.

Por la razón anterior, se han estudiado ciertos medicamentos y se ha visto que algunos tienen efectos prometedores sobre *N. fowleri* “*in vitro*”. Por ejemplo, la rifampicina ha mostrado resultados inhibitorios al ser combinada con la anfotericina B, la clorpromazina (un antipsicótico que interacciona con moléculas lipofílicas de las membranas celulares o con el cambio de proteínas involucradas en el metabolismo del calcio) se ha estudiado por su capacidad de acumulación en tejido cerebral y su baja toxicidad en hígado y riñones, y la corifungina, un antifúngico de la misma familia de la anfotericina B, que ha mostrado una toxicidad “*in vitro*” e “*in vivo*” menor a la anfotericina B y un 100% de supervivencia en ratones, comparado al 60% de supervivencia al usar anfotericina B. Se demostró que, en *A. castellanii*, este fármaco ocasiona hinchazón de las mitocondrias, desorden de la cromatina nuclear y degeneración de la arquitectura citoplasmática, además de la inducción de enquistamiento y posterior lisis de los quistes de las amebas (Debnath *et al.*, 2014).

Otros fármacos que se están estudiando para evaluar su potencial terapéutico son la higromicina B, rokitamicina, roxytromicina, las diamidinas, estatinas (como fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina y pitavastatina) y ciertos péptidos antimicrobianos como tritriptica (Trp), los cuales por sus características fisicoquímicas comprometen la invasión a la membrana celular, rompen las interacciones proteicas y perturban la capacidad de penetración celular, además de poder atravesar la barrera hematoencefálica (Tiewcharoen

et al., 2014; Rizo-Liendo *et al.*, 2020; Rizo-Liendo *et al.*, 2021). Dentro de las nuevas opciones terapéuticas que están en estudio para el tratamiento de la MAP también destacan el uso de formulaciones liposomales o coloidales de anfotericina B para mantener el efecto disminuyendo los efectos secundarios, nano encapsulación y el uso de conjugación de fármacos con nanopartículas de plata (especialmente compuestos azólicos). Sin embargo, con estos últimos no se ha evaluado su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica ni los mecanismos de acción específicos que han llevado a aumentar el efecto amebicida “*in vitro*”, por lo que requieren de más estudios (Anwar *et al.*, 2020).

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Con los resultados del presente trabajo, es posible aceptar ambas hipótesis planteadas previo a la realización de la parte experimental. En términos generales, los resultados del presente estudio indicaron que, en cuanto al perfil proteico y tipo de proteasas secretadas, ambos aislamientos de *N. fowleri* son muy similares, concluyéndose que probablemente comparten diversos factores de virulencia. En ambos casos se demostró la presencia y producción predominante de proteasas de serina de alta masa molecular, que muy probablemente estén involucradas en el proceso de patogénesis de la MAP.

En cuanto al tipo de proteasa detectada (proteasas de serina), nuestros resultados difieren de estudios previos, ya que son las proteasas de cisteína las que se reportan en la literatura como más abundantes para *N. fowleri* y se reporta también la presencia de metaloproteasas, lo cual resalta la necesidad de realizar más estudios para detectar la posible presencia de otro tipo de proteasas en estos aislamientos. En algunos casos, la expresión de este tipo de proteasas requiere de condiciones experimentales diferentes, como el uso previo de matrices que asemejen la naturaleza de la matriz extracelular “*in vivo*” y que estimulen a la ameba a su producción, especialmente de aquellas proteasas con actividad a pH 5 y que fueron observadas solamente en el aislamiento Li. Por lo tanto, se recomienda optimizar las condiciones experimentales tomando en cuenta lo anterior y evaluando un rango más amplio de valores de pH, ya que las proteasas son muy sensibles a cambios pequeños en esta propiedad y podría ser que algunas de estas proteínas no se estén detectando por evaluar su actividad solo en a tres valores de pH.

Se evidenció que los aislamientos de *N. fowleri* provocan un daño “*in vitro*” a monocapas de células Vero en un tiempo muy corto (5 horas), a diferencia de otras especies de amebas de vida libre como *Acanthamoeba* sp. o *Balamuthia mandrillaris*, en donde el daño a monocapas celulares ocurre en días. Lo anterior pone en evidencia el potencial patogénico de esta especie. Aunque el aislamiento Li mostró ser más agresivo al causar un desprendimiento celular más acelerado en un ensayo, experimentos previos de nuestro grupo de investigación indicaron un mayor daño celular por parte del aislamiento Gu, perceptible en la última hora de incubación. Muchos factores pueden afectar la capacidad de una cepa de este

microorganismo de causar daño, ya que su virulencia no es estable si no que varía dependiendo de condiciones como el tiempo de cultivo, la disponibilidad de nutrientes y el ambiente en que se encuentren, por lo que hacer comparaciones entre cepas es complicado y se necesitan de otras pruebas más sensibles, cuantitativas y menos susceptibles a las condiciones experimentales.

Con las pruebas cuantitativas de viabilidad celular, se demostró que los trofozoítos de *N. fowleri* inducen muerte celular mediante un proceso de lisis. Se sugiere que este fenómeno podría tener que ver con el proceso de trogocitosis en donde sus copas alimenticias toman fragmentos de las membranas celulares, ya que se vio un aumento significativo de la liberación de DHL en el tiempo por parte de las células Vero al ser incubadas con trofozoítos completos de ambos aislamientos. Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de DHL liberados sino hasta las 5 horas post incubación para el caso del aislamiento Gu.

Contrario a lo anterior, se comprobó que los medios condicionados de ambos aislamientos no causan lisis de las células (ya que los niveles de DHL se mantuvieron constantes durante la incubación con estos) pero sí ocasionan muerte celular por otros mecanismos que necesitan ser más estudiados, ya que no se observó actividad metabólica de las células Vero luego de 5 horas de incubación con los MC, evidenciado mediante el reactivo Presto Blue®, el cual no presentó un viraje de color.

En cuanto a las pruebas de susceptibilidad a fármacos comerciales, se evidenció la capacidad de la miltefosina para inhibir la viabilidad de ambos aislamientos de *N. fowleri*. Esto comprueba que, para estos aislamientos, el uso de este fármaco podría ser considerado en casos de MAP que se presenten en el país. A diferencia de lo anterior, en el caso de la anfotericina B, se demostró que ambos aislamientos presentan una concentración mínima inhibitoria del 50% mucho más alta que el promedio definido en estudios previos, poniendo en duda la utilidad de su uso en la clínica y presentando un escenario preocupante para el tratamiento de esta enfermedad, ya que la anfotericina B es el fármaco recomendado por la CDC para el tratamiento de la MAP. El voriconazol no fue eficaz contra ninguno de los aislamientos con las concentraciones ensayadas.

Con estos últimos resultados, se concluye que estos dos aislamientos de *N. fowleri* circulantes en Costa Rica, causantes de MAP, pueden ser tratadas bajo el mismo esquema terapéutico. Sin embargo, no se puede generalizar la susceptibilidad a los fármacos de otras cepas de *N. fowleri* que puedan estar circulando en el país y estos resultados se deben tomar solo como una base del posible panorama que enfrenta el país ante este problema de salud pública emergente.

Además, ante el escenario anterior, se hace necesario estudiar nuevas opciones de tratamiento, combinaciones terapéuticas con otros medicamentos y/o otras tecnologías de entrega de fármacos “*in vivo*” para mejorar la supervivencia de los pacientes con MAP, además de investigar e implementar nuevas tecnologías diagnósticas que sean más rápidas y sensibles, y de visibilizar más la existencia de estas infecciones y capacitar a los profesionales de salud en su epidemiología y detección, ya que la supervivencia en casos de MAP depende principalmente de una sospecha clínica rápida y un diagnóstico temprano. Lo anterior constituye un reto sumamente importante en el estudio de *N. fowleri* debido a su alta tasa de mortalidad y a la poca eficacia que han presentado muchos fármacos de uso convencional hacia muchas cepas de este microorganismo.

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahams-Sandí, E., Retana-Moreira, L., Castro-Castillo, A., Reyes-Battle, M., & Lorenzo Morales, J. (2015). Fatal meningoencephalitis in child and isolation of *Naegleria fowleri* from hot springs in Costa Rica. *Emerging infectious diseases*, 21(2), 382.

Ah Young, A. (2015). *Structural and Biochemical Characterization of Eukaryotic Protein Complexes Involved in Interorganelle Tethering and Protein Quality Control* [Tesis doctoral, UCLA, Estados Unidos].

Alli, A., Ortiz, J. F., Cox, Á. M., Armas, M., & Orellana, V. A. (2021). Miltefosine: a miracle drug for meningoencephalitis caused by free-living amoebas. *Cureus*, 13(3).

Alsaadawi, M. A., Alkaabi, N., Alkhuzai, S., & Kilvington, S. (2019). Ex vivo Cytopathic Effect Study of Human *Acanthamoeba* keratitis and Use of *E. coli* in Parasitic Culture. *Executive editor*, 10 (3), 501.

Anwar, A., Mungroo, M. R., Khan, S., Fatima, I., Rafique, R., Kanwal., Khan, K. M., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2020). Novel azoles as antiparasitic remedies against brain-eating amoebae. *Antibiotics*, 9(4), 188.

Baig, A. M. (2016). Primary amoebic meningoencephalitis: neurochemotaxis and neurotropic preferences of *Naegleria fowleri*. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(8), 1026-1029.

Bartrand, T. A., Causey, J. J., & Clancy, J. L. (2014). *Naegleria fowleri*: An emerging drinking water pathogen. *Journal-American Water Works Association*, 106(10), E418-E432.

Bellini, N. K., Santos, T. M., da Silva, M. T. A., & Thiemann, O. H. (2018). The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. *Experimental parasitology*, 187, 1-11.

Benito, M., LaPlante, D., Fernández, M., Miguel, N., Lasheras, A., & Gómez, J. et al. (2018). Amebas de vida libre en aguas residuales y fangos: Su papel como reservorio natural de bacterias potencialmente patógenas. *Revista Salud Ambiental*, 18(1), 69-77.

Bogitsh, B. J., Carter, C. E., & Oeltmann, T. N. (2018). *Human parasitology*. Academic Press.

Booth, L. A., & Smith, T. K. (2020). Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: A review. *Molecular and biochemical parasitology*, 240, 111324.

Capewell, L. G., Harris, A. M., Yoder, J. S., Cope, J. R., Eddy, B. A., Roy, S. L., Visvesvara, G. S., Fox, L. M., & Beach, M. J. (2015). Diagnosis, clinical course, and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States, 1937–2013. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 4(4), e68-e75.

Cárdenas-Zúñiga, R., Silva-Olivares, A., Villalba-Magdaleno, J. D., Sánchez-Monroy, V., Serrano-Luna, J., & Shibayama, M. (2019). Amphotericin B induces apoptosis-like programmed cell death in *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi*. *Microbiology*, 165(5), 500-502.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2015). *Naegleria fowleri*. <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/es/faqs.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022). *Naegleria fowleri* — *Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM)* — *Amebic Encephalitis*. <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/index.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2023). *Sources of Infection & Risk Factors* — *Naegleria fowleri*. <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/infection-sources.html>.

Cervantes-Sandoval, I., Jesús Serrano-Luna, J., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2010). Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitology research*, 106(3), 695-701.

Chiboub, O., Sifaoui, I., Lorenzo-Morales, J., Abderrabba, M., Mejri, M., Fernández, J. J., ... & Díaz-Marrero, A. R. (2019). Spiralyde A, an antikinoplastid dolabellane from the brown alga *Dictyota spiralis*. *Marine drugs*, 17(3), 192.

Cope, J. R., Ratard, R. C., Hill, V. R., Sokol, T., Causey, J. J., Yoder, J. S., ... & Beach, M. J. (2015). The first association of a primary amebic meningoencephalitis death with culturable *Naegleria fowleri* in tap water from a US treated public drinking water system. *Clinical Infectious Diseases*, 60(8), e36-e42.

Coronado-Velázquez, D., Betanzos, A., Serrano-Luna, J., & Shibayama, M. (2018). An In Vitro Model of the Blood–Brain Barrier: *Naegleria fowleri* Affects the Tight Junction Proteins and Activates the Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(6), 804-819.

Daft, B. M., Visvesvara, G. S., Read, D. H., Kinde, H., Uzal, F. A., & Manzer, M. D. (2005). Seasonal meningoencephalitis in Holstein cattle caused by *Naegleria fowleri*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 605-609.

Debnath, A., Tunac, J. B., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Shibayama, M., & McKerrow, J. H. (2014). In vitro efficacy of corifungin against *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(3), 1523-1528.

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

De Jonckheere, J. F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental parasitology*, 145, S2-S9.

de Lacerda, A. G., & Lira, M. (2021). *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 41(1), 116-135.

Dos Santos, J. G. (1970). Fatal primary amebic meningoencephalitis: a retrospective study in Richmond, Virginia. *American Journal of Clinical Pathology*, 54(5), 737-742.

Fero, K. (2010). *Naegleria fowleri*. Stanford University. https://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2010/Katherine_Fero/FeroNaegleriafowleri.htm

Ferrante, A & Bates, E. J. (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity*, 56(12), 3320-3321.

Flores-Huerta, N., Sánchez-Monroy, V., Rodríguez, M. A., Serrano-Luna, J., & Shibayama, M. (2020). A comparative study of the membrane proteins from *Naegleria* species: A 23-kDa protein participates in the virulence of *Naegleria fowleri*. *European Journal of Protistology*, 72, 125640.

Gharpure, R., Bliton, J., Goodman, A., Ali, I. K. M., Yoder, J., & Cope, J. R. (2021). Epidemiology and clinical characteristics of primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: a global review. *Clinical Infectious Diseases*, 73(1), e19-e27.

González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Reyes-Batlle, M., Martín-Navarro, C. M., & Lorenzo-Morales, J. (2014). Morphological features and in vitro cytopathic effect of *Acanthamoeba griffini* trophozoites isolated from a clinical case. *Journal of parasitology research*.

Grace, E., Asbill, S., & Virga, K. (2015). *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 6677-6681.

Güémez, A., & García, E. (2021). Primary amoebic meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and treatments. *Biomolecules*, 11(9), 1320.

Gupta, C. M., Thiyagarajan, S., & Sahasrabuddhe, A. A. (2015). Unconventional actins and actin-binding proteins in human protozoan parasites. *International Journal for Parasitology*, 45(7), 435-447.

Gutiérrez-Sánchez, M., Carrasco-Yeppez, M. M., Herrera-Díaz, J., & Rojas-Hernández, S. (2020). Identification of differential protein recognition pattern between *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis*. *Parasite Immunology*, 42(6), e12715.

Guzmán-Téllez, P. G. (2020). *Caracterización del proteosoma 20S en amibas del género Naegleria* [Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, México].

Hadas, E., & Mazur, T. (1993). Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Tropical Medicine and Parasitology: Official Organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft Fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, 44(3), 197-200.

Herman, E. K., Greninger, A., van der Giezen, M., Ginger, M. L., Ramirez-Macias, I., Miller, H. C., ... & Dacks, J. B. (2021). Genomics and transcriptomics yields a system-level view of the biology of the pathogen *Naegleria fowleri*. *BMC biology*, 19(1), 1-18.

Herron, G. S., Werb, Z., Dwyer, K., & Banda, M. J. (1986). Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. I. Production of procollagenase and prostromelysin exceeds expression of proteolytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 261(6), 2810-2813.

Heukeshoven, J., & Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9(1), 28-32.

Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U. E. A., Tahir, I. M., Akram, M., Ali Shah, S. M., Zulfqar, A., & Zainab, R. (2020). *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(2), 199-212.

Jamerson, M. (2011). *A Comparative Study of a Pathogenic Versus a Nonpathogenic Naegleria Species*. [Tesis doctoral, Virginia Commonwealth University, Estados Unidos].

Jamerson, M., da Rocha-Azevedo, B., Cabral, G. A., & Marciano-Cabral, F. (2012). Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins. *Microbiology*, 158(3), 791-803.

John, D. T., & John, R. A. (1989). Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mammalian cell cultures. *Parasitology research*, 76(1), 20-25.

Joseph, S. J., Park, S., Kelley, A., Roy, S., Cope, J. R., & Ali, I. K. M. (2021). Comparative genomic and transcriptomic analysis of *Naegleria fowleri* clinical and environmental isolates. *MSphere*, *6*(4), e00637-21.

Kim, J. H., Jung, S. Y., Lee, Y. J., Song, K. J., Kwon, D., Kim, K., Park, S., Im, K.I., & Shin, H. J. (2008). Effect of therapeutic chemical agents in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*(11), 4010-4016.

Kim, J. H., Kim, D. S., & Shin, H. J. (2008). Contact-independent cell death of human microglial cells due to pathogenic *Naegleria fowleri* trophozoites. *The Korean journal of parasitology*, *46*(4), 217-221.

Kim, J. H., Yang, A. H., Sohn, H. J., Kim, D., Song, K. J., & Shin, H. J. (2009). Immunodominant antigens in *Naegleria fowleri*. Excretory–secretory proteins were potential pathogenic factors. *Parasitology research*, *105*, 1675-1681.

Kress, W., Maglica, Ž., & Weber-Ban, E. (2009). Clp chaperone–proteases: structure and function. *Research in microbiology*, *160*(9), 618-628.

Lam, C., Jamerson, M., Cabral, G., Carlesso, A. M., & Marciano-Cabral, F. (2017). Expression of matrix metalloproteinases in *Naegleria fowleri* and their role in invasion of the central nervous system. *Microbiology*, *163*(10), 1436-1444.

Lee, J., Kim, J. H., Sohn, H. J., Yang, H. J., Na, B. K., Chwae, Y. J., Park, S., Kim, K., & Shin, H. J. (2014). Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory–secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitology research*, *113*(8), 2765-2776.

Lee, Y. A., Kim, K. A., & Shin, M. H. (2021). *Naegleria fowleri* Induces Jurkat T Cell Death via O-deGlcNAcylation. *The Korean Journal of Parasitology*, *59*(5), 501.

Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Piñero, J. E., & Valladares, B. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in parasitology*, *29*(4), 181-187.

Lorenzo-Morales, J., Díaz-Marrero, A. R., Cen-Pacheco, F., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Souto, M. L., Hernández-Daranas, A., Piñero, J. E., & Fernández, J. J. (2019). Evaluation of oxasqualenoids from the red alga *Laurencia viridis* against *Acanthamoeba*. *Marine drugs*, *17*(7), 420.

Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., & Walochnik, J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, *22*.

Lozano-Alarcon, F., Bradley, G. A., Houser, B. S., & Visvesvara, G. S. (1997). Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in a South American tapir. *Veterinary Pathology*, *34*(3), 239-243.

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

Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, *16*(2), 273-307.

Martín-Escolano, R., Yiangou, L., Kazana, E., Robinson, G. K., Michaelis, M., & Tsaousis, A. D. (2021). Repurposing in vitro approaches for screening anti-parasitic drugs against the brain-eating amoeba *Naegleria fowleri*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *17*, 204-212.

Martinez, A. J., Visvesvara, G. S., & Shah, R. (2017). Brain infections due to free-living amoebae. *Handbook of clinical neurology*, *146*, 125-142.

Martínez, D. Y., Bravo-Cossio, F., Valdivia-Tapia, M. D. C., Carreazo, N. Y., & Cabello-Vilchez, A. M. (2022). Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis using a novel therapeutic regimen including Miltefosine and Voriconazole. *Acta Parasitologica*, *67*(3), 1421-1424.

Martínez-Castillo, M., Cárdenas-Zúñiga, R., Coronado-Velázquez, D., Debnath, A., Serrano-Luna, J., & Shibayama, M. (2016). *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *Journal of medical microbiology*, *65*(9), 885.

Ministerio de Salud Costa Rica. (14 de febrero de 2020). *Exigen rotulación de advertencia, altura máxima y prohibición de toboganes que desboquen en aguas termales*. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa/42-noticias-2020/389-exigen-rotulacion-de-advertencia-altura-maxima-y-prohibicion-de-toboganes-que-desboquen-en-aguas-termales>.

Morales, J. A., Chaves, A. J., Visvesvara, G. S., & Dubey, J. P. (2006). *Naegleria fowleri* associated encephalitis in a cow from Costa Rica. *Veterinary parasitology*, *139*(1-3), 221-223.

Mungroo, M. R., Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2019). *Naegleria fowleri*: diagnosis, treatment options and pathogenesis. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, *7*(2), 67-80.

Oddó, D. (2006). Infecciones por amebas de vida libre: comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Revista Chilena De Infectología*, *23* (3), 200-214.

Ong, T. Y. Y., Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2017). Brain-eating amoebae: predilection sites in the brain and disease outcome. *Journal of clinical microbiology*, *55*(7), 1989-1997.

O Santos, L., S Garcia-Gomes, A., Catanho, M., L Sodre, C., LS Santos, A., H Branquinha, M., & M d'Avila-Levy, C. (2013). Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. *Current medicinal chemistry*, *20*(25), 3116-3133.

Park, H. (2011). *Proteomic Analysis of Two Different States of Naegleria fowleri*. [Tesis de maestría, Virginia Commonwealth University, Estados Unidos].

Puzon, G. J., Miller, H. C., Malinowski, N., Walsh, T., & Morgan, M. J. (2020). *Naegleria fowleri* in drinking water distribution systems. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, *16*, 22-27.

Rawat, A., Roy, M., Jyoti, A., Kaushik, S., Verma, K., & Srivastava, V. K. (2021). Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. *Microbiological Research*, 249, 126784.

Retana Moreira, L., Vargas Ramírez, D., Linares, F., Prescilla Ledezma, A., Vaglio Garro, A., Osuna, A., Lorenzo Morales, J., & Abrahams Sandí, E. (2020). Isolation of *Acanthamoeba* T5 from water: characterization of its pathogenic potential, including the production of extracellular vesicles. *Pathogens*, 9(2), 144.

Retana, L., Zamora, L., Grijalba, M., Molina, S., & Abrahams, E. (2020). Primary Amebic Meningoencephalitis Related to Groundwater in Costa Rica: Diagnostic Confirmation of Three Cases and Environmental Investigation. *Pathogens*, 9(8), 629.

Retana Moreira, L., Steller Espinoza, M. F., Chacón Camacho, N., Cornet-Gomez, A., Sáenz-Arce, G., Osuna, A., Lomonte, B., & Abrahams Sandí, E. (2022). Characterization of Extracellular Vesicles Secreted by a Clinical Isolate of *Naegleria fowleri* and Identification of Immunogenic Components within Their Protein Cargo. *Biology*, 11(7), 983.

Rizo-Liendo, A., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Chiboub, O., Rodríguez-Expósito, R. L., Bethencourt-Estrella, C. J., San Nicolás-Hernández, D., Hendiger, E. B., López-Arencibia, A., Rocha-Cabrera, P., Piñero, J.E., & Lorenzo-Morales, J. (2019). In vitro activity of statins against *Naegleria fowleri*. *Pathogens*, 8(3), 122.

Rizo-Liendo, A., Sifaoui, I., Arberas-Jiménez, I., Reyes-Batlle, M., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2020). Fluvastatin and atorvastatin induce programmed cell death in the brain eating amoeba *Naegleria fowleri*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110583.

Rizo-Liendo, A., Arberas-Jiménez, I., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2021). The type 2 statins, cerivastatin, rosuvastatin and pitavastatin eliminate *Naegleria fowleri* at low concentrations and by induction of programmed cell death (PCD). *Bioorganic Chemistry*, 110, 104784.

Rodríguez-Anaya, L. Z., Félix-Sastré, Á. J., Lares-Villa, F., Lares-Jiménez, L. F., & Gonzalez-Galaviz, J. R. (2021). Application of the omics sciences to the study of

Naegleria fowleri, *Acanthamoeba* spp., and *Balamuthia mandrillaris*: current status and future projections. *Parasite*, 28.

Russell, A. C., & Kyle, D. E. (2022). Differential growth rates and in vitro drug susceptibility to currently used drugs for multiple isolates of *Naegleria fowleri*. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e01899-21.

Sanders, L. (2015). Body & brain: How brain-eating amoebas really kill: Infection with *Naegleria fowleri* triggers fatal immune response. *Science News*, 14.

Schuster, F. L., Guglielmo, B. J., & Visvesvara, G. S. (2006). In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amoebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(2), 121-126.

Seas, C., & Legua, P. (2022). Meningoencephalitis due to free-living amoebas in the tropics. *Current Tropical Medicine Reports*, 9(1), 8-14.

Serrano-Luna, Jesús., Cervantes-Sandoval, Isaac., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2007). A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(5), 411-417.

Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gomez, S., Navarro-García, F., Escobar-Herrera, J., Sabanero, M., Tsutsumi, V & Serrano-Luna, J. (2013). Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology*, 159(Pt_2), 392-401.

Shin, H. J. (2010). The nfa1 Gene Contributed on the Contact-dependent Pathogenic Mechanisms of *Naegleria fowleri*. *Hanyang Medical Reviews*, 30(3), 204-212.

Siqueira-Neto, J. L., Debnath, A., McCall, L. I., Bernatchez, J. A., Ndao, M., Reed, S. L., & Rosenthal, P. J. (2018). Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(8), e0006512.

Sohn, H. J., Kim, J. H., Shin, M. H., Song, K. J., & Shin, H. J. (2010). The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitology research*, *106*(4), 917-924.

Sohn, H. J., Song, K. J., Kang, H., Ham, A. J., Lee, J. H., Chwae, Y. J., Kim, K., Park, S., Kim, J.H., & Shin, H. J. (2019). Cellular characterization of actin gene concerned with contact-dependent mechanisms in *Naegleria fowleri*. *Parasite Immunology*, *41*(8), e12631.

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.

Takaoka-Sugihara, N., Yamagami, S., Yokoo, S., Matsubara, M., & Yagita, K. (2012). Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. *Molecular vision*, *18*, 2221.

Taravaud, A., Fechtali-Moute, Z., Loiseau, P. M., & Pomel, S. (2021). Drugs used for the treatment of cerebral and disseminated infections caused by free-living amoebae. *Clinical and Translational Science*, *14*(3), 791-805.

Thái, T. L., Kang, J. M., Lê, H. G., Lee, J., Yoo, W. G., Shin, H. J., Sohn, W.M., & Na, B. K. (2020). Fowlerstefin, a cysteine protease inhibitor of *Naegleria fowleri*, induces inflammatory responses in BV-2 microglial cells in vitro. *Parasites & vectors*, *13*(1), 1-15.

Tiewcharoen, S., Phurttikul, W., Rabablert, J., Auewarakul, P., Roytrakul, S., Chetanachan, P., Atitthep, T., & Junnu, V. (2014). Effect of synthetic antimicrobial peptides on *Naegleria fowleri* trophozoites. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *45*(3), 537.

Visvesvara, G. S., & Stehr-Green, J. K. (1990). Epidemiology of free-living amoeba infections. *Journal of Protozoology*, *37*(4), 25S-33S.

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *50*(1), 1-26.

Vyas, I. K., Jamerson, M., Cabral, G. A., & Marciano-Cabral, F. (2015). Identification of peptidases in highly pathogenic vs. weakly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *62*(1), 51-59.

Woodworth, T. W., Keefe, W. E., & Bradley, S. G. (1982). Characterization of the Proteins of *Naegleria fowleri*: Relationships between Subunit Size and Charge 1. *The Journal of Protozoology*, *29*(2), 246-251.

Yera, H., Dupouy-Camet, J., Jackson, J. W., Sriram, R., Sweat, S., Goldstein, J. M., & Visvesvara, G. S. (2015). In vitro growth, cytopathic effects and clearance of monolayers by clinical isolates of *Balamuthia mandrillaris* in human skin cell cultures. *Experimental parasitology*, *156*, 61-67.

Yoder, J. S., Eddy, B. A., Visvesvara, G. S., Capewell, L., & Beach, M. J. (2010). The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962–2008. *Epidemiology & Infection*, *138*(7), 968-975.

Yoder, J. S., Straif-Bourgeois, S., Roy, S. L., Moore, T. A., Visvesvara, G. S., Ratard, R. C., Hill, V. R., Wilson, J. D., Linscott, A. J., & Crager, R. (2012). Primary amoebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clinical Infectious Diseases*, *55*(9), e79-e85.

Zysset-Burri, D. C., Müller, N., Beuret, C., Heller, M., Schürch, N., Gottstein, B., & Wittwer, M. (2014). Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC genomics*, *15*(1), 1-15.