



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio de Microbiología Ambiental

Proyecto de Conservación y Mejoramiento Ambiental

**“PAPEL DE LA MOLÉCULA DE 37 kDa DE *Naegleria fowleri*
EN EL MODELO DE LA MENINGOENCEFALITIS
AMIBIANA PRIMARIA EN RATÓN”**



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
LAURA GABRIELA PÉREZ LOZANO

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. MARÍA MARICELA CARRASCO YÉPEZ



Tlalnepantla, Edo. de Méx. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Luis Ernesto Pérez Hernández

Mi compañero de viaje y aventuras,
con cariño, respeto y admiración.

Por permitirme amarte
y soñar a tu lado.

¡GRACIAS por TODO!

Gaby

Ganas fuerza, coraje y confianza
por cada experiencia en la que realmente te detienes a mirar el miedo en la cara.

Te puedes decir a ti mismo:

"He sobrevivido a este horror y podré enfrentarme a cualquier cosa que venga".

Debes hacer lo que te crees incapaz de hacer.

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Mi alma mater, que me permitió ser alumna de la mejor universidad del país.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Por ser mí segundo hogar y formarme correctamente en diferentes ámbitos.

A la UIICSE.

Por ser la unidad que me acogió, apoyó y respaldó durante mi proyecto.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental.

Por darme la oportunidad de pertenecer a un equipo de trabajo de investigación.

Al Instituto Politécnico Nacional.

Por ser la institución educativa que me abrió sus puertas para contribuir a la ciencia.

A la Escuela Superior de Medicina.

Por hacerme capaz de generar investigación y difundir ese conocimiento.

Al Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular.

Por colaborar y contribuir en equipo al desarrollo de este proyecto de investigación.

A mi Directora de Tesis.

Dra. María Maricela Carrasco Yépez

A mis Sinodales.

Dra. Patricia Bonilla Lemus

Dr. Saúl Rojas Hernández

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Dra. Leticia Moreno Fierros

Al financiamiento otorgado.

UNAM-DGAPA-PAPIIT IA 205015 e IN 219815

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelitos.

†Mary, †Gonzalo, †Pipis y †Ray, porque gracias a su ejemplo, comprensión y amor soy capaz de salir de cualquier situación que se presente por más difícil que esta sea. Su fuerza, guía, cuidados y consejos fueron cruciales para lograr “ser” lo que soy ahora ¡Los extraño demasiado! ☹ ¡Me hacen taaanta falta! Ojalá hubieran podido vivir este momento a mi lado... Solo quiero honrarlos y espero que estén orgullosos de mí, fueron las razones más poderosas para seguir adelante y levantarme cuando caía.

A mi amorcito.

Ness, por haber creído en mí cuando nadie más lo hizo, ni siquiera yo misma... Por enseñarme el valor de la perseverancia y a no darme por vencida tan fácilmente. Gracias por procurar que nunca me faltara nada y siempre tratar de darme lo mejor. Gracias por la paciencia, comprensión, preocupación y sacrificios ¡Sin tu apoyo esto no hubiera sido posible! Eres una de las personas más maravillosa que he conocido: amable, inteligente, noble, valiente, comprometido y atractivo ☺ ¡Te amo demasiado!

A mis padres.

Mamá Estela (Jovita), nada más ni nada menos que por darme la vida y mi ADN mitocondrial jeje. Por ser el pilar y la Reyna de la familia. Gracias por el cariño sincero e incondicional; por dar todo de ti, sin esperar nada a cambio. Gracias por enseñarnos el sentido de responsabilidad, compromiso, esfuerzo, constancia y perseverancia. Por todos los cuidados y la fuerza para seguir adelante a pesar del cansancio ¡Te amamos!

Papá Tacho, porque sin ti simplemente no existiría. Gracias por las cosas tan valiosas que me enseñaste como la constancia en el trabajo y valor del perdón. La manera en que me educaste fue la correcta... ¡Gracias a ti he llegado hasta donde estoy!

A mis hermanas.

Rosa (Isetwis) y Reyna (Güera) por permitirme ser su hedmanita mayor ☺ Aunque sea de edad porque de estatura ya me pasaron hace un buen... Sé que tal vez no he sido el mejor ejemplo para ustedes, pero me esfuerzo día con día para serlo. Estoy muy orgullosa de ustedes y saben que siempre podrán contar conmigo ¡Las adoro!

A mis familiares.

Tías, tíos, primas y primos: por su paciencia y comprensión cuando no podía asistir a las reuniones debido a motivos escolares; por su cariño e interés hacia mí.

A mi familia política.

Suegros: Gude y Luis, por la confianza que me tienen, por preocuparse siempre por mí y darme ánimos para seguir adelante ¡Los quiero mucho!

Cuñis: Fer y Jhoss, por todos los buenos momentos, las risas y las divertidas pláticas.

A mis amigos.

Hatziri, Monse y Karen: por acompañarme durante la última etapa de la carrera, por su confianza, las innumerables pláticas, las ricas comidas juntas, los aprendizajes y experiencias; por creer siempre en mí y darme ánimos. Somos fregonas amigas, nunca lo olviden ¡Gracias por formar parte de mi vida!

Ari, Sandra, Judith y Wendy: chicas del herbario, muchas gracias por las graciosas conversaciones en Whats, el apoyo y la buena vibra que siempre me han brindado.

Abril y Fer, por permanecer en mi vida desde la secu y demostrarme que si se quiere, todo es posible (las admiro mucho).

Dess y Rod: compadres, muchísimas gracias por confiar en nosotros; se volvieron muy especiales para mí junto con mis ahijados Regina y Rómulo.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental.

Dra. Mary muchísimas gracias por aceptarme como su primer tesista, es todo un honor. Por creer y confiar plenamente en mí; por la paciencia y dedicación que me tuvo. Por el apoyo material, económico y didáctico proporcionado para desarrollar este trabajo. Sobre todo muchas gracias por su valiosa e incomparable amistad, ¡la quiero mucho!

Dra. Paty por dirigirme y adentrarme a trabajar con *Naegleria fowleri*, por apreciar mis ganas y el entusiasmo de trabajar. Por ser tan amable, sencilla, atenta y dedicada.

Diego y Andrea, por contribuir de una manera muy especial a la realización de este proyecto, por formar a mi lado un gran equipo de trabajo, por las experiencias.

Q.F.B. Luis y a la Biól. Chío, por enseñarme el valor de la disciplina, constancia y perseverancia. Por sus enseñanzas tanto en lo académico como en lo personal.

JuanPi, Berna, Brambi, Uri y Dany: amiguitos muchas gracias por escucharme y apoyarme siempre; por propiciar ese ambiente tan ameno y divertido en el laboratorio.

Al Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular.

Dr. Saúl muchísimas gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por los consejos y el apoyo material brindado para la realización de este proyecto.

Arturito, Alfred, Omar, Conchita, Dianita e Itzel: por enseñarme a trabajar en equipo y contribuir a la finalización de este trabajo.

CONTENIDO GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS ESPECIALES	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE	VII
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
El sistema inmune de la mucosa.....	1
Vacunas mucosales.....	3
Tipos de vacunas de la mucosa.....	4
Adyuvantes de mucosas.....	7
Toxina del Cólera.....	10
Estructura y función de la CT.....	10
Mecanismo de acción de la CT.....	12
Amibas de vida libre.....	13
<i>N. fowleri</i> : taxonomía y clasificación.....	14
Ciclo de vida de <i>N. fowleri</i>	15
Trofozoito.....	15
Flagelado.....	16
Quiste.....	16
ANTECEDENTES	22
JUSTIFICACIÓN.....	28
OBJETIVOS.....	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
Cultivo de <i>N. fowleri</i>	31
Cosecha y realización del extracto total amibiano.....	31
Identificación y obtención de la banda correspondiente al peso molecular de 37 kDa de <i>N. fowleri</i>	32
Purificación de la molécula de 37 kDa de <i>N. fowleri</i> por electro-elución.....	33
Esquema de inmunización en conejo.....	33
Especificidad de la molécula de 37 kDa reconocida por los sueros de conejo y ratón anti- <i>N. fowleri</i> mediante un ensayo de inmunoblot.....	34
Reconocimiento específico del suero de conejo anti-molécula de 37 kDa contra todo el extracto de <i>N. fowleri</i> mediante un ensayo de inmunoblot.....	35

Esquema de inmunización en ratones.	35
Reto intranasal con trofozoitos vivos de <i>N. fowleri</i>	36
Obtención de muestras.	36
Determinación de anticuerpos IgG e IgA séricos y de lavados nasales anti-proteína de 37 kDa de <i>N. fowleri</i> por el método de ELISA.....	37
Análisis estadístico.....	37
RESULTADOS.....	39
Identificación de la banda correspondiente al peso molecular de la proteína de 37 kDa de <i>N. fowleri</i>	40
Purificación de la molécula de 37 kDa de <i>N. fowleri</i> por electro-elución.....	41
Especificidad de la molécula de 37 kDa reconocida por los sueros de ratón y conejo anti- <i>N. fowleri</i>	42
Reconocimiento específico del suero de conejo anti-molécula de 37 kDa contra todo el extracto de <i>N. fowleri</i>	44
La Inmunización de ratones con la molécula de 37 kDa de <i>N. fowleri</i> induce protección.	46
Respuesta de anticuerpos IgG e IgA séricos y de lavados nasales anti-proteína de 37 kDa de <i>N. fowleri</i>	48
DISCUSIÓN	51
ANEXO	60
BIBLIOGRAFIA	62

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Expresión de IgA en el sistema inmune de mucosas por diferentes rutas de vacunación.....	3
Figura 2. Mecanismo de acción de los adyuvantes e inicio de la respuesta TH por medio de tres señales.	8
Figura 3. Estructura cristalográfica de la Toxina del Cólera, subunidad A, subunidades B y la diferencia de posición de los residuos en CTB.....	11
Figura 4. Ciclo de vida de vida de <i>N. fowleri</i>	15
Figura 5. Vía de contagio de <i>N. fowleri</i>	17
Figura 6. Mapa que muestra la distribución de casos reportados para PAM.	19
Figura 7. Reconocimiento de anticuerpos específicos IgA e IgG contra proteínas de <i>N. fowleri</i> en muestras de suero y lavados nasales de ratones inmunizados y retados.	26
Figura 8. Gel producto de la electroforesis SDS-PAGE con una concentración de acrilamida al 12% teñido con azul brillante de Coomassie R-250.	40
Figura 9. Gel SDS-PAGE con una concentración de acrilamida al 16% teñido con azul brillante de Coomassie R-250.	41
Figura 10. Inmunoblot de la proteína electro-eluida a partir de geles con peso molecular de 37 kDa reconocida por los anticuerpos IgG de sueros de ratón y conejo anti- <i>N. fowleri</i>	43
Figura 11. Inmunoblot de la respuesta específica de anticuerpos IgG del suero de conejo anti-molécula de 37 kDa y el suero total anti- <i>N. fowleri</i> sobre el extracto total de la amiba.....	45
Figura 12. Porcentaje de sobrevivida de ratones inmunizados con la molécula de 37 kDa de <i>N. fowleri</i> y posteriormente retados con la dosis letal de trofozoitos vivos de la amiba.	47
Figura 13. Respuesta de IgG e IgA anti-37 kDa de <i>N. fowleri</i> en sueros de los diferentes grupos de ratones.	49
Figura 14. Respuesta de IgG e IgA anti-37 kDa de <i>N. fowleri</i> en lavados nasales de los diferentes grupos de ratones.....	50
Tabla 1. Vacunas contra infecciones de las mucosas.....	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>N. fowleri</i>	14
Tabla 3. Casos que sobrevivieron a la MEAP.	20
Tabla 4. Esquema de inmunización en conejo.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
ADP	Adenosín difosfato
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APCs	Células presentadoras de antígeno
AVL	Amibas de vida libre
BCG	Bacillus Calmette-Guerin (vacuna)
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CMI	Inmunidad mediada por células
CNS	Sistema nervioso central
CPE	Efecto citopático
CSF	Fluido cerebroespinal
CT	Toxina del cólera
DCs	Células dendríticas
DTH	Hipersensibilidad del tipo retardado
ELISA	Técnica de inmunoabsorbancia ligada a una enzima
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GM1	Gangliósido
i.n.	Intranasal

i.p.	Intraperitoneal
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Enterotoxina termolábil
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MEAP	Meningoencefalitis amibiana primaria
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MPM	Marcador de peso molecular
NALT	Tejido linfoide asociado a nariz
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
<i>p</i>HMB	<i>p</i> -hidroxi-mercúricobenzoico
PMN	Células polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RE	Retículo endoplásmico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SIgA	IgA de secreción
TCR	Receptor de linfocitos T
TLRs	Receptores tipo Toll
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Muchas de las enfermedades en el hombre comienzan en la superficie de las mucosas y son causadas por una amplia variedad de microorganismos patógenos como virus, bacterias, hongos y protozoarios. Estas infecciones representan un enorme desafío para el desarrollo de vacunas específicas que puedan inducir inmunidad protectora. Una de estas infecciones es la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) causada por *Naegleria fowleri*, la cual es mortal y afecta principalmente a niños y a adultos jóvenes en buen estado de salud. Estudios previos han mostrado que una atractiva estrategia de solución es la inmunización nasal; por ejemplo, basados en el modelo de protección de la MEAP en el cual inmunizan ratones por la ruta intranasal con extractos totales de *N. fowleri* coadministrados con la toxina del cólera (CT) y obtienen un 100% de protección después del reto con la dosis letal de trofozoitos vivos de la amiba, sin embargo, en otros trabajos se ha observado que inmunizar con una sola proteína es más seguro y tiene muchas más ventajas que trabajar con toda la gama de moléculas que componen al microorganismo. Identificar claramente los antígenos responsables de la respuesta protectora, contribuye al desarrollo de una vacuna nasal subunitaria contra la MEAP. Respecto a esto, se han identificado proteínas de *N. fowleri* inmunogénicas, inmunodominantes e inmunoprotectoras; una de estas es la molécula de 37 kDa, por lo que en este trabajo se analizó el papel que desempeña la glicoproteína purificada a partir de geles de poliacrilamida en ratones BALB/c inmunizados durante cuatro ocasiones; se determinó el porcentaje de sobrevivencia después del reto con trofozoitos vivos de la amiba y se encontró un 30% de sobrevivencia cuando se inmuniza con la proteína de 37 kDa sola, interesantemente, cuando la proteína es coadyuvada con la CT se encontró un 70% de protección. Por otro lado, también se analizó la producción de anticuerpos específicos anti 37 kDa, tanto en suero como en los lavados nasales y se observó que los niveles de anticuerpos de los isotipos IgA e IgG se incrementaron en los ratones inmunizados tanto con la proteína de 37 kDa sola como en los ratones que fueron inoculados con la proteína más la CT. Sin embargo, se determinó una mayor producción de anticuerpos séricos de ambos isotipos en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de la proteína de más la CT; en cuanto a las muestras de lavados nasales, hubo un incremento mayor con respecto a los controles en los anticuerpos de ambos isotipos en todos los grupos de ratones inmunizados. Con esto se demostró que existió una mayor producción de anticuerpos tanto de IgA como de IgG en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de la proteína purificada de 37 kDa más la CT con respecto al resto de los grupos. Estos datos sugieren que la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* participa en la inmunidad protectora mediada por anticuerpos IgA e IgG por lo que puede ser considerada como un candidato importante a vacuna subunitaria contra la MEAP en el modelo de ratón.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de la mucosa.

Las superficies de las mucosas son la principal ruta de infección de una gran variedad de patógenos, alérgenos y carcinógenos (Brandtzaeg, 2009). Las membranas mucosas que cubren el tracto digestivo y urogenital así como la conjuntiva del ojo, el oído interno, todos los conductos de las glándulas exocrinas y la cavidad respiratoria, están dotadas con un poderoso mecanismo de limpieza tanto mecánico como químico, que degradan y repelen la mayoría de agentes extraños. Además de la alta participación especializada de los componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa que protegen estas superficies de la mucosa y con ello también protegen el interior del cuerpo contra posibles daños del medio ambiente (Mestecky *et al.*, 2005). Por ejemplo, los antígenos que logran burlar los primeros mecanismos de defensa, son captados por las células epiteliales de absorción y células epiteliales especializadas (células “M”); directamente capturados por las células presentadoras de antígeno (APCs) como las células dendríticas (DCs), macrófagos e incluso linfocitos B para posteriormente ser presentados a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ ubicados en sitios inductivos de la mucosa (Holmgren & Czerkinsky, 2005). La respuesta inmune en tejidos de la mucosa se rige por la naturaleza del antígeno, el tipo de APCs implicado y del microambiente local (Iwasaki & Kelsall, 1999). Antígenos y adyuvantes, incluyendo la mayoría de los patógenos, son detectados como “señales de peligro” por las APCs de mucosas, receptores tipo Toll (TLRs) lo que favorece el desarrollo de

respuestas inmunes más fuertes y más amplias en donde participan tanto la inmunidad humoral y celular (Mowat, 2003; Billsborough & Viney, 2004).

El sistema inmune de mucosas tiene tres principales funciones: (i) proteger las membranas mucosas contra la colonización e invasión de microorganismos potencialmente peligrosos que se puedan encontrar, (ii) prevenir la captación de antígenos no degradables incluyendo proteínas extrañas derivadas de alimento ingerido, partículas transportadas en el aire y microorganismos comensales y (iii) prevenir el desarrollo de respuestas inmunes nocivas para estos antígenos (Holmgren & Czerkinsky, 2005). En un humano adulto y saludable, el sistema inmune de mucosas contribuye casi el 80% de todos los inmunocitos. Estas células se acumulan o están en tránsito entre diferentes tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT), que en conjunto forman el sistema de órganos linfoides más grande de los mamíferos (Mestecky *et al.*, 2005). El MALT selecciona eficazmente los mecanismos efectores apropiados y regula su intensidad para evitar daño tisular y agotamiento inmunológico (Holmgren & Czerkinsky, 2005).

Las diferentes regiones del MALT están funcionalmente conectadas y entrecruzadas, lo que permite que las células B y células T activadas por el antígeno, aparezcan como células efectoras en otros sitios mucosos distantes (Zhang *et al.*, 2013). De este modo, la inmunización del tejido linfoide asociado a nariz (NALT) estimula una respuesta inmune específica en el tracto respiratorio pero también puede dar lugar a una fuerte respuesta inmune mucosal genital-vaginal (Holmgren & Czerkinsky, 2005); mientras que la inmunización por el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) conduce predominantemente una respuesta protectora y efectiva solo en el tejido gastrointestinal (Hu *et al.*, 2009) (Figura 1).

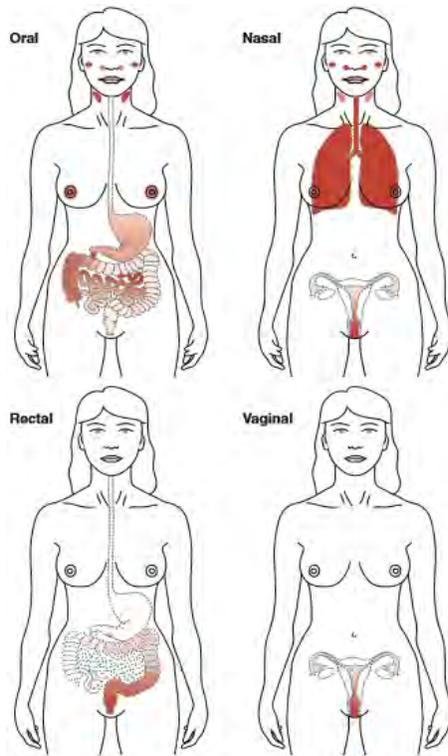


Figura 1. Expresión de IgA en el sistema inmune de mucosas por diferentes rutas de vacunación. El sombreado indica la fuerza de la respuesta (Holmgren & Czerkinsky, 2005).

Vacunas mucosales.

La inmunización nasal en humanos resulta en la secreción de anticuerpos tanto IgA como IgG en la mucosa de las vías respiratorias superiores y secreciones regionales (saliva, secreciones nasales) (Johansson *et al.*, 2001; 2004). También se ha demostrado en estudios con humanos y roedores, que la inmunización nasal produce mayor respuesta de anticuerpos a nivel sistémico a diferencia de otras rutas de inmunización por mucosas (Staats *et al.*, 1997; Kozlowski *et al.*, 2002). Una de las ventajas y quizá la más significativa de las vacunas en mucosas, es que puede lograr la inducción de ambos tipos de inmunidad: sistémica y local (McGhee *et al.*, 1999; Baldrige *et al.*, 2000). La ruta nasal es especialmente atractiva para la inmunización,

puesto que el epitelio nasal se caracteriza por presentar una alta permeabilidad, baja actividad enzimática y la presencia de un gran número de células inmunocompetentes (Holmgren & Czerkinsky, 2005). Otras ventajas de la inmunidad en las mucosas es la facilidad de aplicación y bajos costos de producción lo que facilitaría la posibilidad de administrar vacunas múltiples en caso de pandemias; por esta vía de administración también se disminuye el riesgo de efectos colaterales, al evitar que los antígenos tengan un ingreso directo a la circulación sistémica (Kalambaheti *et al.*, 1998; Holmgren *et al.*, 2005). Aunque la inmunización mucosal también presenta ciertas desventajas, las cuales se comentarán más adelante.

Tipos de vacunas de la mucosa.

A pesar de las atractivas ventajas de la vacunación de la mucosa, sólo seis de las doce vacunas que están actualmente aprobadas para uso humano, se administran por esta vía (Tabla 1).

Tabla 1. Vacunas contra infecciones de las mucosas.

Infección / Enfermedad	Microorganismo	Administración	Vacuna
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i> , serogrupos: O1 y O139	Oral	Inactivada de células enteras O1 con subunidad B.
Poliomelitis	Poliovirus 1, 2 y 3	Oral	Vivas atenuadas (OPV)
		Intramuscular / Subcutánea	Vivas inactivadas (IPV)
Rotavirus	Cepas de rotavirus	Oral	Monovalente Pentavalente
Fiebre Tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	Oral	Viva atenuada mutante (Ty21a)
		Intramuscular	Polisacárido capsular Vi (ViCPS)
Influenza	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	Nasal	Conjugada de polisacárido-proteína

Fuente: Vacunas y enfermedades prevenibles mediante vacunación (2016).

Sin embargo existen algunas desventajas de la vacunación de mucosas, como la dificultad en la práctica para estimular fuertemente la respuesta inmune de la IgA de secreción (SIgA) (Holmgren & Czerkinsky, 2005), los antígenos son generalmente menos inmunogénicos y son aptos para inducir tolerancia, donde el hospedero se esfuerza por mantener la homeostasis de la mucosa al responder al daño (Holmgren *et al.*, 2003). Por lo que para proporcionar una estimulación inmune efectiva tanto en términos de respuesta humoral como de respuesta mediada por células en vacunas administradas por vía nasal, es necesaria la coadministración de adyuvantes para mejorar la captación de antígenos (Cano *et al.*, 2000; FitzGerald & Mrsny, 2000; Matsuo *et al.*, 2000).

En general, las vacunas humanas se realizan utilizando diferentes procesos: pueden contener microorganismos vivos que han sido atenuados (debilitados o alterados de modo que no causa la enfermedad); organismos inactivados o muertos; toxinas inactivadas (toxinas bacterianas que no causan la enfermedad) o simplemente segmentos del patógeno (esto incluye vacunas de subunidades y vacunas conjugadas) (Historyofvaccines.org, 2016) para generar la inmunidad protectora. Sin embargo, debido a la naturaleza compleja de dichas vacunas pueden variar ampliamente en la calidad de lote a lote y además pueden inducir efectos adversos. Los recientes avances en genómica y proteómica proporcionan una amplia variedad de antígenos potenciales, incluyendo las proteínas recombinantes, péptidos sintéticos o ADN (De Gregorio & Rappuoli, 2014).

Las vacunas de subunidades pueden contener de 1 a 20 antígenos, pero solo se incluyen los que estimulan mejor al sistema inmunitario; en algunos casos, estas vacunas utilizan epítopes, es decir, las porciones determinantes del antígeno que los

anticuerpos o las células T reconocen y a las cuales se adhieren. Como las vacunas de subunidades contienen solo los antígenos esenciales y no toda la gama de moléculas que componen el microorganismo, las posibilidades de experimentar reacciones adversas a la vacuna son menores. Identificar estos antígenos es un proceso complicado y prolongado, sin embargo, una vez que los científicos lo hacen, se pueden crear vacunas de subunidades de dos maneras diferentes: a) pueden cultivar al microorganismo en el laboratorio y luego mediante proteólisis segmentan la proteína y reúnen los antígenos importantes o b) pueden fabricar las moléculas del antígeno a partir del microorganismo con tecnología de ADN recombinante. Las vacunas creadas de esta manera se denominan "vacunas de subunidades recombinantes" (Vaccines.gov, 2016).

Se ha determinado que inmunizar con una sola proteína del microorganismo tiene muchas más ventajas que trabajar con toda la gama de moléculas que lo componen, por ejemplo: i) se evita un efecto citotóxico en el paciente, ii) una vez que se han identificado los antígenos potenciales que estimulan mejor al sistema inmunitario, se pueden crear vacunas de subunidades, lo que hace más fácil poder obtener una sola proteína; iii) en algunos casos, estas vacunas utilizan epítopes, es decir, las porciones determinantes del antígeno que los anticuerpos o las células T reconocen y a las cuales se adhieren, por lo que la respuesta inmune del huésped es dirigida, debido a que responde a una sola subunidad antigénica que a toda la gama de epítopes que en general, presentan los microorganismos. Por lo que se podría afirmar que las vacunas subunitarias son seguras (Holmgren & Czerkinsky, 2005).

Aunque estos antígenos claramente definidos ofrecen ventajas importantes de seguridad, a menudo tienen una vida media corta *in vivo* y no siempre se presentan

de manera eficiente al sistema inmune cuando se administran solos, así que es necesaria la utilización adecuada de adyuvantes para la producción de anticuerpos (Trimaille & Verrier, 2015).

Adyuvantes de mucosas.

La palabra adyuvante proviene del Latín *adjuvare*, que significa para ayudar o mejorar. Los adyuvantes son compuestos que al ser coadministrados con el antígeno mejoran la respuesta inmune específica; actúan aumentando la respuesta inmune adaptativa y generan una memoria inmunológica efectiva (Vogel, 1998). El concepto surgió en la década de los 90's, a partir de observaciones en caballos que desarrollaron un absceso en el sitio de inoculación con toxina de la difteria, lo que generó una mayor respuesta de anticuerpos específicos. En 1936, Freund desarrolló una emulsión de agua y aceite mineral que contenía micobacterias muertas, creando así uno de los adyuvantes más potentes, conocido como adyuvante completo de Freund (FCA). A pesar de ser el adyuvante estándar, FCA provoca reacciones locales graves y es considerado demasiado tóxico para uso humano. La emulsión de aceite en agua sin micobacterias añadido es conocido como adyuvante incompleto de Freund (FIA) y, al ser menos tóxicos, se ha utilizado en formulaciones de vacunas humanas (Freund *et al.*, 1937; Stuart-Harris, 1969).

Los adyuvantes pueden ser usados para varios propósitos: i) para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos purificados o recombinantes, (ii) para reducir la cantidad de antígeno o el número de inmunizaciones necesarias para generar la

inmunidad protectora, (iii) para mejorar la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos y las personas inmunológicamente comprometidas o (iv) como sistemas de liberación de antígeno, para que optimicen su absorción por la mucosa (Marx, *et al.*, 1993; McElrath, 1995; Douce, *et al.*, 1995).

Un buen adyuvante debe cumplir con las siguientes propiedades: (i) no debe ser tóxico en el rango de la dosis para cumplir su efecto, (ii) debe estimular fuertemente la inmunidad celular y humoral, (iii) debe ofrecer una buena memoria inmunológica, (iv) no debe inducir reacciones de autoinmunidad e hipersensibilidad, v) no debe ser mutagénico, carcinógeno ni teratogénico y finalmente (vi) debe ser estable a la temperatura y pH para su almacenamiento (Marciani, 2003).

El mecanismo de acción de los adyuvantes es sobre las APCs (Figura 2), especialmente en las DCs, las cuales requieren de una cascada de señalización para inducir una respuesta inmune potente (Schijns, 2001).

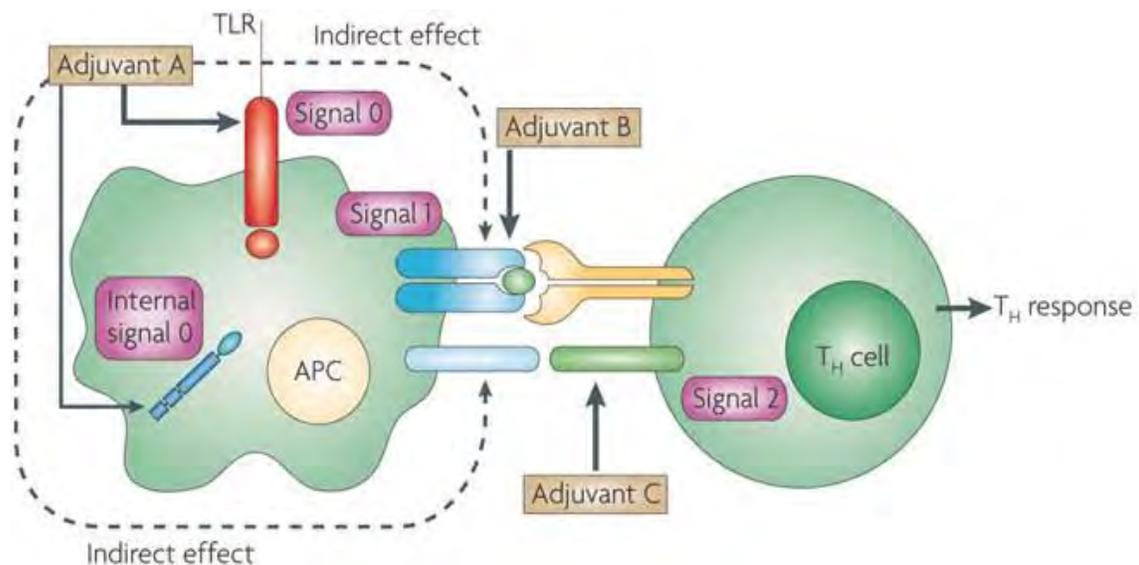


Figura 2. Mecanismo de acción de los adyuvantes e inicio de la respuesta TH por medio de tres señales. Señal 0: activación de las APCs mediante el reconocimiento del antígeno optimizado por los PRRs y PAMPs. Señal 1: favorecer la presentación del antígeno (péptido) por MHCII al TCR de los linfocitos T. Señal 2: incrementar la coestimulación a través de los receptores y sus ligandos en presencia de moléculas coestimuladoras y citocinas (Guy, 2007).

Las DCs se activan a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); los PRRs expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras y citocinas que migran a los nódulos linfoides regionales para promover la activación de las células T. Es así como los adyuvantes influyen en la migración, maduración, presentación y expresión de moléculas coestimuladoras de las DCs, lo que favorece la respuesta de las células T y B hacia el antígeno (Ilhuicatzí, 2015).

La inmunomodulación es la capacidad que tienen muchos adyuvantes para modificar y regular la expresión de ciertas citocinas. En general, un adyuvante inmunomodulador ejercerá su efecto cuando son presentados en un sitio y momento separado al inmunógeno. Dos importantes subconjuntos de células T CD4⁺: Th1 y Th2 han sido descritas para ratón (Mosmann & Moore, 1991) y el hombre (Romagnani, 1991).

La respuesta Th1 normalmente induce reacciones de anticuerpos fijadores de complemento y una fuerte hipersensibilidad del tipo retardado (DTH), esta respuesta está asociada con el IFN- γ , IL-2 e IL-12. La respuesta Th2 resulta en altos niveles de anticuerpos en circulación y secretores, frecuentemente IgE y las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 y posiblemente la IL-10. Las respuestas Th1 y Th2 son mutuamente inhibitorias (Mosmann & Moore, 1991). La selección apropiada de un adyuvante conduce a una mejor respuesta inmune, determina la secreción de anticuerpos de isotipo IgG, qué otras inmunoglobulinas se producirán y también cuántos linfocitos T CD4⁺ dirigidos son generados en la inmunidad mediada por células (CMI). Los adyuvantes de mucosas más prometedores se derivan de las toxinas bacterianas, ligandos de los TLRs, inmunoestimulantes sin TLRs y nuevas moléculas pequeñas (Chen *et al.*, 2010; Holmgren *et al.*, 2003).

Toxina del Cólera (CT).

Los productos bacterianos con mayor potencial para funcionar como adyuvantes de la mucosa y quizá los más utilizados experimentalmente en animales, son las enterotoxinas de ribosilación de ADP: la CT producida por varias cepas de *Vibrio cholerae* y la enterotoxina termolábil (LT) producida por algunas cepas de *Escherichia coli* (Clements *et al.*, 1988; Elson, 1989; Lycke *et al.*, 1992; Xu-Amano, *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1996). La LT y CT elevan el AMPc intracelular en varios tipos de células y su adyuvancia es al menos en parte, relacionadas con esa función (Freitag & Clements, 2005).

Estructura y función de la CT.

En 1969 Finkelstein & LoSpalluto purificaron la toxina y demostraron que es una proteína de 84 kDa. Más tarde se determinó que la CT se compone de dos tipos de subunidades: un oligómero de 56 kDa, compuesto de varias subunidades idénticas "ligeras" responsables de la unión al receptor y una subunidad "pesada" de 28 kDa tóxico-activa; estas subunidades fueron rebautizadas posteriormente como B (para la de unión) y A (para la parte activa). Simultáneamente, se identificó el principal receptor de membrana celular para la CT: un gangliósido específico GM1, glicoesfingolípido encontrado de forma ubicua en la superficie de células de mamífero; que fue posiblemente el primer receptor biológico químicamente definido en su totalidad (Holmgren *et al.*, 1973; Holmgren, 1981).

En el ensamblaje de la CT (Figura 3) la subunidad A tóxico-activa (CTA, Figura 3b) está incrustada en el homopentámero circular de la subunidad B (pentámero CTB, Figura 3c) responsable de la unión de la toxina a las células. La CTA de 28 kDa comprende 240 aminoácidos, y los monómeros de la subunidad B de 11.6 kDa cada uno, tienen 103 aminoácidos. A pesar de ser sintetizada como una única cadena polipeptídica, la CTA es modificada después de la traducción a través de la acción de una proteasa de *V. cholerae* que genera dos fragmentos: CTA1 y CTA2, sin embargo todavía permanecen unidos por un enlace disulfuro. La actividad tóxica de CTA (enzimática ADP-ribosilación) reside en CTA1, mientras que CTA2 sirve para insertar CTA en el pentámero CTB. El pentámero CTB se mantiene unido por aproximadamente 130 puentes de hidrógeno y 20 puentes de sal. Estos muchos enlaces polares junto con un apretado embalaje de las subunidades a través de interacciones hidrofóbicas podrían por sí solas explicar la estabilidad sobresaliente de la CTB pentamérica a las proteasas, componentes de la bilis y otros factores en el medio intestinal. Se ha sugerido que las interacciones pentámero-pentámero, posiblemente, puede agregar más a la estabilidad (Sánchez & Holmgren, 2011).

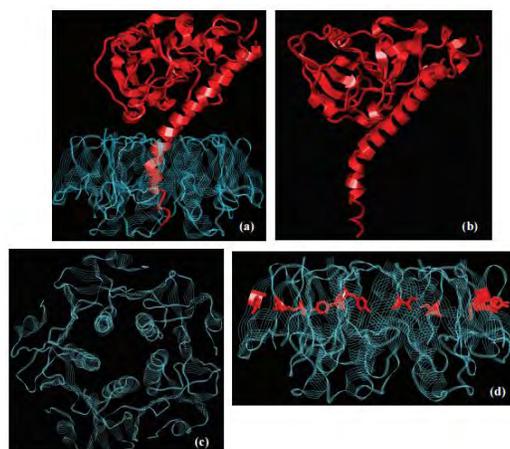


Figura 3. Estructura cristalográfica de la Toxina del Cólera (a), subunidad A (b), subunidades B (c) y en (d) la diferencia de posición de los residuos en CTB (Sánchez & Holmgren, 2011).

Mecanismo de acción de la CT.

Cuando la CT se encuentra con una célula de mamífero, primero se une a la superficie a través de la interacción de la subunidad B del pentámero. Un efecto principal de la interacción es la reticulación estable de GM1 en la superficie celular. El péptido A2 de la LT y CT facilita la asociación de A1 con la subunidad B del pentámero y puede ayudar al transporte retrógrado directo de estas moléculas a través del aparato de Golgi al Retículo Endoplásmico (RE) (Lencer *et al.*, 1995).

La CT induce a las células T CD4⁺ Th2 que secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que proporcionan señales de ayuda para la inducción de SIgA específica de antígeno, así como IgG1 sérica y respuestas de IgA e IgE en modelos de ratón. La CT también facilita la conmutación de células B de IgA y aumenta los efectos de la IL-4 e IL-5 en IgG e IgA en la síntesis en cultivos de células B esplénicas activadas con LPS.

Para que la inmunización intranasal evoque en una respuesta inmune específica, es necesaria una correcta entrega de antígenos y un adyuvante efectivo que pueda ayudar a presentar los antígenos de la vacuna o de la inmunoterapia al sistema inmune de la mucosa (Holmgren *et al.*, 2003). Sin embargo, hay infecciones que todavía representan un enorme desafío para el desarrollo de vacunas específicas que puedan inducir inmunidad protectora previniendo la enfermedad al evitar que el agente infeccioso se adhiera y colonice el epitelio de la mucosa, que penetre y se replique en la mucosa (virus y bacterias invasoras) o bloqueando la unión y la acción de toxinas microbianas (Holmgren & Czerkinsky, 2005).

La mayoría de las infecciones inician en la superficie de la mucosa como es el caso de las infecciones en el tracto gastrointestinal causadas por *Helicobacter pylori*, *Vibrio*

cholerae, *Escherichia coli* enterotoxigenica (ETEC), *Shigella spp.*, *Clostridium difficile*; en el tracto urogenital infecciones asociadas con las enfermedades de transmisión sexual como las causados principalmente por el VIH, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoeae* y el virus del herpes; infecciones de las vías urinarias causadas por cepas de *Escherichia coli* y por supuesto infecciones en el tracto respiratorio causadas por virus (influenza A (H1N1), rinovirus, coronavirus, adenovirus); bacterias (*Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* y cepas del género *Brucella*); hongos (*Histoplasma capsulatum*) y algunos protozoarios (Ogra *et al.*, 1999) como *Naegleria fowleri*, la cual se encuentra dentro del grupo de las amibas de vida libre.

Amibas de vida libre (AVL).

Las AVL son protozoos cosmopolitas y ubicuos en la naturaleza. Causan infecciones que comprometen ojos, pulmones, piel y cerebro; además, se ha demostrado que algunas pueden actuar como vectores y reservorios de virus, hongos y bacterias: microorganismos que sobreviven e incluso pueden multiplicarse dentro de estas amibas, ya que les proporcionan un mecanismo de protección idóneo. También sirven como un medio de transporte para estos microorganismos que desean evadir ambientes hostiles, causar infecciones y colonizar nuevos hábitats; aprovechando los mecanismos de dispersión de estas amibas (Bonilla & Ramírez, 2014).

Las AVL son organismos aeróbicos que pueden completar su ciclo de vida en el medio ambiente, sin un hospedero, pero ocasionalmente infectan a humanos y a otros animales; por esta dualidad son también conocidas como amibas anfizoicas (Visvesvara, 2013). Dentro de las más de 100 especies de AVL se encuentra el género *Naegleria*, el cual, de acuerdo con De Jonckheere en 2011, contiene 47 especies y *Naegleria fowleri* es la única especie patógena en humanos. *N. fowleri* es una amiba termofílica (Martínez & Visvesvara, 1997) la cual provoca una infección aguda y fulminante en el sistema nervioso central (CNS) llamada meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP).

***N. fowleri*: taxonomía y clasificación.**

Recientemente, la Sociedad Internacional de Protistólogos replanteó una nueva clasificación para Eucariontes, basada en los enfoques morfológicos modernos: rutas bioquímicas y filogenia molecular. *N. fowleri* se incluye bajo la siguiente:

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *N. fowleri*.

Super Grupo:	Excavata (Cavalier-Smith, 2002)
Clase:	Discoba (Hampl <i>et al.</i> , 2009)
Orden:	Discicristata (Cavalier-Smith, 1998)
Familia:	Vahlkampfiidae (Jollos, 1917)
Género:	<i>Naegleria</i> (Alexeieff, 1912)

Fuente: The revised classification of eukaryotes (Adl *et al.*, 2012).

Ciclo de vida de *N. fowleri*.

Tiene tres estadios en su ciclo de vida: trofozoito, quiste y flagelado; por lo que también se denomina ameboflagelado (Figura 4).

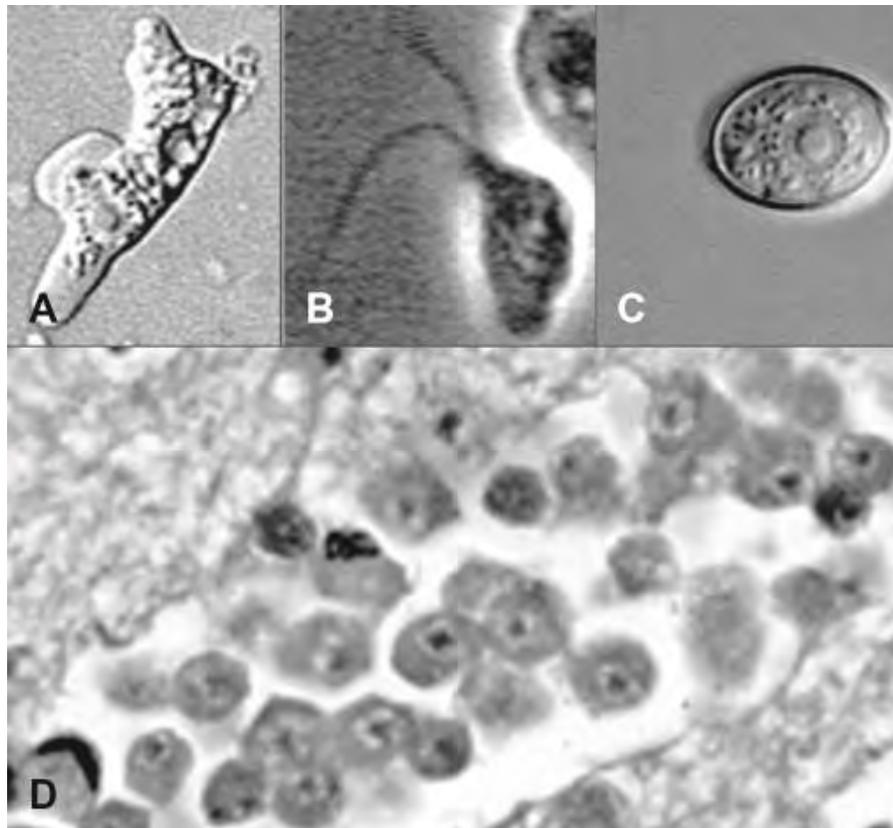


Figura 4. Ciclo de vida de *N. fowleri*. Trofozoito (A), flagelado (B) y quiste (C). (D) Trofozoitos de la ameba en una sección del cerebro, teñidos con H&E (Visvesvara, 2013).

Trofozoito.

Su forma es ameboide, se alimenta de bacterias gram-negativas y se reproduce por fisión binaria. Exhibe un movimiento rápido sinusoide mediante la producción de protuberancias semiesféricas conocidas como lobópodos. El trofozoito mide de 10-25

μm y tiene un solo núcleo que contiene un gran nucléolo, denso y en posición central. El citoplasma contiene numerosas mitocondrias, ribosomas, vacuolas alimenticias y vacuolas contráctiles (Marciano-Cabral, 1988; Page, 1988).

Flagelado.

El trofozoito se transforma en una etapa de flagelado cuando la concentración iónica del medio ambiente y sus alrededores cambia, pero se revierte a su estado trófico durante las condiciones favorables. El flagelado tiene un solo núcleo con un gran nucléolo y usualmente posee dos flagelos pero tres o cuatro flagelos también pueden verse de vez en cuando. El flagelado no tiene citostoma y por lo tanto no puede alimentarse. Varía en longitud desde 10 a 16 μm (Marciano-Cabral, 1988; Page, 1988).

Quiste.

El trofozoito se transforma en un quiste resistente durante condiciones adversas cuando el suministro de alimentos se vuelve escaso o el nicho ambiental se seca. El quiste es usualmente esférico, mide de 7 a 10 μm . Su pared tiene poros y es doble: con un endoquiste grueso y un ectoquiste más delgado. El quiste también tiene un solo núcleo con un prominente nucléolo (Marciano-Cabral, 1988; Page, 1988).

Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP).

MEAP ocurre en niños sanos, activos y en adultos jóvenes sin inmunodeficiencia quienes tuvieron antecedentes recientes de contacto con agua por participar en la natación, buceo u otras actividades acuáticas (Schuster & Visvesvara, 2004) en cuerpos de agua dulce como lagos, ríos, aguas termales, piscinas no cloradas; aunque también se ha aislado al microorganismo en áreas de descarga de aguas procedentes de instalaciones industriales como centrales eléctricas y también se ha encontrado en pozos geotérmicos (Kim *et al.*, 2009).

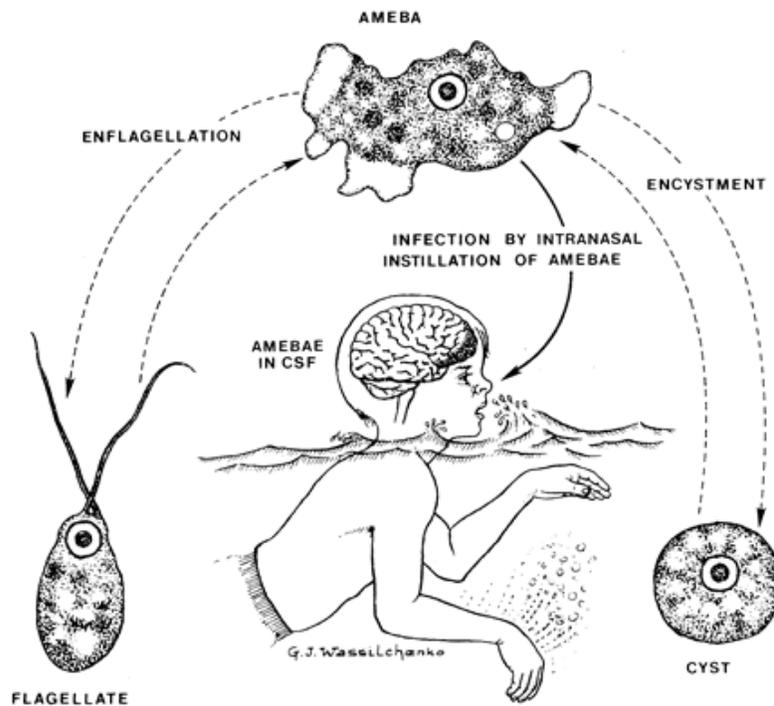


Figura 5. Vía de contagio de *N. fowleri* (Cdc.gov, 2016).

La infección ocurre cuando los trofozoitos entran por las fosas nasales (Figura 5) e invaden la mucosa nasal; proceso que se caracteriza por una extensa secreción de moco que atrapa algunos trofozoitos, seguido de un infiltrado inflamatorio en donde

algunos trofozoitos son capaces de adherirse y penetrar el epitelio, la mucosa nasofaríngea y migrar por el nervio olfatorio hasta atravesar la placa cribiforme. Luego los trofozoitos se difunden en los lóbulos olfatorio y frontal en donde comienzan a producir efectos citopáticos sobre los tejidos (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005); debido a su proximidad del punto de entrada de las amibas con el CNS, estos lóbulos del cerebro son blancos principales de la destrucción amibiana (Martínez, 1985).

Cuando la amiba invade el cerebro, comienza a proliferar y llega a superar las defensas del hospedero (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005); también puede invadir otros tejidos como el tallo cerebral y el cerebelo, produciendo daños irreversibles e inflama meninges (Martínez, 1985).

El periodo de incubación de MEAP varía de 2 a 15 días. Los síntomas incluyen: dolor de cabeza intenso, náusea, vómito, fiebre, rigidez en el cuello y anomalías en el comportamiento. Otros síntomas incluyen alteraciones en el gusto o en el olfato, ataxia cerebral, fotofobia, un incremento en la presión intracraneal, letargo, confusión, convulsiones generalizadas y coma. La muerte usualmente ocurre dentro de una semana a 10 días (Carter, 1972; Martínez, 1985; Marciano-Cabral, 1988; Martínez & Visvesvara, 1997; Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara & Maguire, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007), esto depende principalmente del tamaño del inóculo, de la inmunocompetencia del hospedero y de la virulencia del microorganismo.

Epidemiología.

Fue hasta finales de los 60's que se descubrió que esta amiba podía provocar una terrible enfermedad (Culbertson *et al.*, 1968). *N. fowleri* fue descrita por Carter (1970)

y nombrada así en honor a Malcom Fowler, quien reportó el primer caso de MEAP en humanos en Adelaide, Australia (Martínez, 2001).

Se ha reportado que *N. fowleri* está presente en todos los continentes, excepto en la Antártica (Figura 6) y existen alrededor de 250 casos reportados de MEAP en el mundo; así que la enfermedad es rara, pero cada año se descubren más casos (De Jonckheere, 2014).

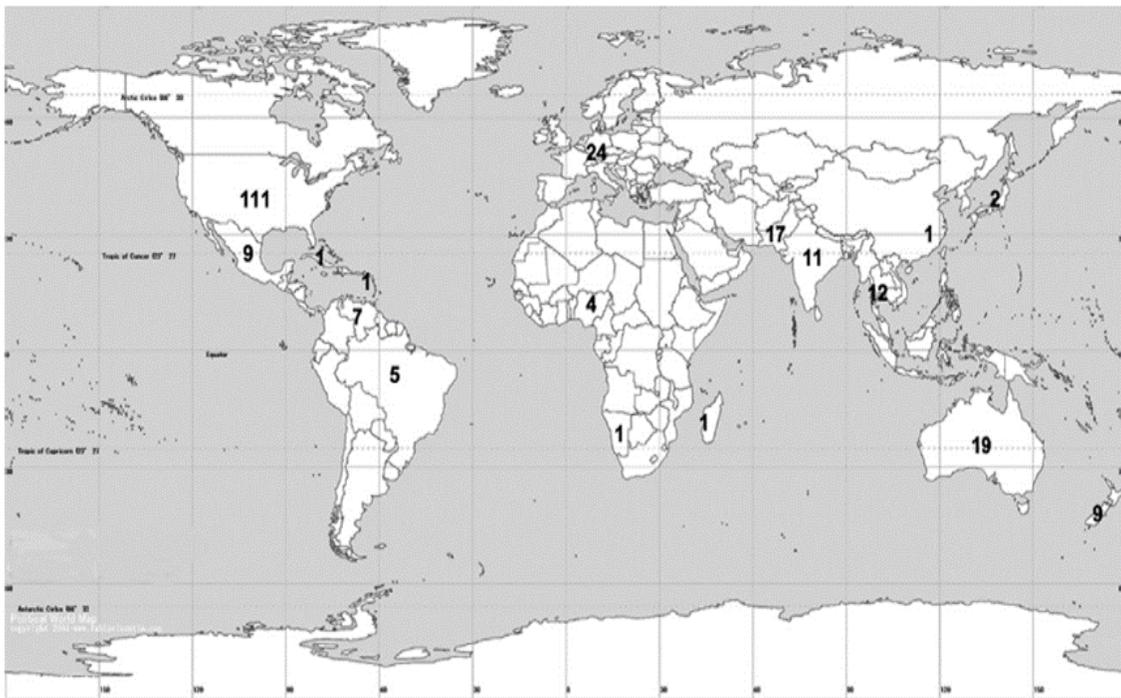


Figura 6. Mapa que muestra la distribución de casos reportados para MEAP (De Jonckheere, 2011).

La mayoría de los casos de MEAP han sido reportados en Estados Unidos, lo que nos podría señalar que en países de primer mundo las técnicas de identificación y diagnóstico para *N. fowleri* están más avanzadas y son más efectivas en comparación con los países de tercer mundo, que no cuentan con las herramientas necesarias para la detección oportuna. Por lo que se cree que existen muchos más casos de la enfermedad que simplemente no han sido reportados, es decir, que las cifras han sido

subestimadas. En Europa se han reportado 24 casos, en Australia 19, 17 en Pakistán, 12 en Tailandia y 11 en la India (De Jonckheere, 2011).

Pocos casos se han reportado en África y América del Sur y existen millones de personas que mueren por otras infecciones en estos continentes pero aunque MEAP es una enfermedad rara, sigue siendo un grave problema para la salud pública ya que casi siempre es mortal con sólo el 5% de los pacientes que sobreviven (Tabla 3) y que afecta principalmente a los niños en buen estado de salud (De Jonckheere, 2014).

Tabla 3. Casos que sobrevivieron a la MEAP.

Age (years)	Sex	Place
6	F	UK
4	F	UK
14	M	Australia
9	F	California (USA)
?	M	Pennsylvania (USA)
18	F	Thailand
61	M	Thailand
30	M	Italy
38	M	Hong Kong
26	F	India
10	M	Mexico
0.8	M	India
0.5	M	Iran
73	M	India
0.1	M	India

Fuente: What do we know by now about the genus *Naegleria*? (De Jonckheere, 2014).

El primer caso de MEAP en México fue detectado en 1978 en un joven de 16 años con antecedentes de natación en los canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California y el registro se publicó hasta 1984; desde entonces y hasta el 2001, 29 casos han sido diagnosticados y confirmados al observar la tinción de trofozoitos en muestras de CSF en México, incluyendo a un sobreviviente tratado con anfotericina B, cloranfenicol y sulfadiazina. 26 de estos casos reportados han ocurrido en el noroeste de México, específicamente en el Valle de Mexicali, el cual posee un ambiente desértico con

agricultura y un sistema de irrigación intensiva que consiste en una red de canales y reservorios cuyo volumen varía con el ciclo de irrigación (Lares-Villa, 2001). En 2002 se notificaron seis casos, en el 2003 tres casos y en 2004 dos, aumentando a seis casos en el 2005, también se han ampliado los reportes de casos en nuestro país: Huetamo, Michoacán y en Monterrey, N. L (Dirección General de Epidemiología, 2012).

Es imperativo responder a la necesidad de mejores informaciones epidemiológicas y programas de educación sobre los aspectos clínicos y patológicos de la MEAP para las autoridades de salud que se involucran en la detección oportuna de la enfermedad y atender el problema de salud pública con un tratamiento efectivo y preventivo (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2007).

ANTECEDENTES

En trabajos anteriores (Rojas-Hernández *et al.*, 2004a) se ha reportado la inmunidad protectora en la infección causada por *N. fowleri* bajo un esquema de inmunización en ratones BALB/c por la vía i.n. con extractos totales de la amiba coadministrados con la CT en el que lograron obtener un 100 de protección, una vez que los ratones fueron retados con la dosis letal de trofozoitos vivos de 5×10^4 . Encontraron un aumento en la respuesta de anticuerpos IgG e IgA inducidos tanto en las muestras de suero como de la mucosa de los ratones. Sugirieron que la inmunización con lisados de la amiba ya sea solos o coadministrados con alguno de los dos adyuvantes se perfiló principalmente a una respuesta tipo Th2, ya que se suscitó una mayor respuesta de IgG1 que de IgG2a por todos los tratamientos que emplearon tanto en muestras de suero como de lavados nasales y por ambas vías ya que también emplearon la intraperitoneal (i.p.). Sin embargo, atribuyen los niveles de protección que obtuvieron a la alta respuesta de anticuerpos IgA en las muestras de lavados nasales de los tratamientos en ratones inmunizados por la vía i.n. con extractos totales de la amiba más Cry1Ac o CT.

De acuerdo con el reporte anterior del efecto protector contra la infección causada por *N. fowleri* atribuida a la obtención de respuesta de IgA en la mucosa nasal, (Jarillo-Luna *et al.*, 2008) describieron las modificaciones morfológicas que ocurren en el epitelio nasal y los cambios en la distribución de IgA conferidos por la inmunización i.n. de ratones BALB/c con lisados amibianos más Cry1Ac. Reportaron cambios celulares caracterizados por metaplasia, es decir, cambio del epitelio olfatorio a epitelio

respiratorio y determinaron que esto podía establecer las condiciones necesarias para una mayor secreción local de IgA en la mucosa nasal así como la movilidad de este anticuerpo a través del epitelio por medio del mecanismo de transitosis o el transporte intercelular entre dichas células. Concluyeron que era posible que la IgA contribuya a la protección contra la infección causada por *N. fowleri* inhibiendo su adherencia al epitelio y su posterior invasión.

Ante esto, Rojas-Hernández *et al.* (2004b) sugirieron que la unión de los trofozoitos a mucinas podía facilitar la adhesión e invasión del parásito. Describieron la secuencia de eventos histopatológicos posteriores a la infección causada por *N. fowleri* durante la penetración inicial de la amiba en la mucosa nasal a las primeras 8, 24, 30 y 96 horas y así determinaron su inmunolocalización después de la inoculación i.n. Observaron que después de 24 hrs. los trofozoitos de la amiba invadían el epitelio olfatorio, se situaban en la lámina propia y en el lumen de la cavidad nasal. Después de 30 hrs. los trofozoitos migraron a través de la lámina cribosa pero fue hasta las 96 hrs. que encontraron una reacción inflamatoria severa en el bulbo olfatorio, gran daño en el tejido y sugirieron que el parásito se había multiplicado *in situ* debido a la abundancia de trofozoitos detectada. Concluyeron que este daño tan severo podía ser provocado tanto por *N. fowleri* como por los neutrófilos, ya que la destrucción de neutrófilos puede contribuir al daño del tejido en el hospedero a través de la liberación de gránulos citotóxicos.

Retomando la idea de que la inmunización i.n. con la protoxina Cry1Ac sola o administrada en combinación con extracto total amibiano se perfiló principalmente a una respuesta tipo Th2, en un trabajo posterior (Carrasco-Yépez *et al.*, 2010)

investigaron la inmunidad protectora inducida por la respuesta inmune humoral Th2 dependiente de la proteína STAT6, esencial para la resistencia contra la infección provocada por *N. fowleri*. En donde encontraron en ratones knock-out y wild-type, bajo el mismo esquema de inmunización que emplearon los antecedentes anteriores, que la mortalidad de los ratones STAT6^{-/-} fue de 100% y los niveles de IL-12, IFN- γ e IgG2a fueron mayores que en los ratones STAT6^{+/+} mostrando un perfil Th1. Mientras que en los ratones STAT6^{+/+} obtuvieron un 100% de sobrevivencia y altos niveles de IL-4 e IgG1 perfilándose una respuesta de tipo Th2. Ambos trabajos sugieren que la respuesta inmune humoral es crucial para inducir protección en una vacuna candidata para la protección contra la infección causada por *N. fowleri*, por lo que un aspecto importante de otro trabajo (Carrasco-Yépez *et al.*, 2014) fue evaluar el patrón de expresión génica de algunas citocinas probablemente implicadas en la secreción de anticuerpos IgA e IgG, la regulación de pIgR, así como la interacción de ambos isotipos de anticuerpos y las células polimorfonucleares (PMN) con los trofozoitos de *N. fowleri* en el lumen de la cavidad nasal de ratones previamente inmunización con la CT sola o coadministrada con extractos totales amibianos. Encontraron una correlación entre los altos niveles de expresión de pIgR con la producción de IgA en la cavidad nasal mientras que en la localización inmunohistoquímica encontraron que el anticuerpo IgG era abundante tanto en la lámina propia como en el lumen de la cavidad nasal del ratón. Sugirieron que la IL-1b puede ser un importante factor implicado en la sobrerregulación de pIgR y que el cambio de epitelio olfatorio a uno con características como epitelio respiratorio (metaplasia) puede establecer las condiciones necesarias para una mayor secreción y movilidad tanto de IgA como de IgG. Que la SIgA puede prevenir la adhesión inicial de los trofozoitos a la cavidad nasal de los ratones

inmunizados y que el plasma anti-IgG de *N. fowleri* sirve de protección a manera de respaldo durante la fuga del anticuerpo hacia el lumen de la cavidad nasal de los ratones. Finalmente concluyeron que es posible que los anticuerpos de isotipo IgA e IgG, contribuyen a la protección contra *N. fowleri* pero que específicamente uno de los dos podría desempeñar un papel importante en la inducción de la respuesta inmune en el modelo de infección empleado, ya que podría involucrar a otros agregados linfoides como la linfa cervical y/o las glándulas submandibulares y el NALT.

De acuerdo al antecedente anterior, lo más probable es que la IgA e IgG pertenecen a anticuerpos polireactivos naturales dirigidos contra algunos antígenos en específico de *N. fowleri*, ante esto, Contis en 2011 identificó estos antígenos reconocidos por los anticuerpos tanto sistémicos como de mucosas y relacionó el incremento tanto de IgA como de IgG con el porcentaje de protección obtenido en los ratones inmunizados y determinó que a partir de la tercera inmunización con extracto total de la amiba coadministrado con la CT como adyuvante se logra obtener un 100% de sobrevivencia a la infección, con la presencia e intensidad de las bandas correspondientes con el peso molecular de 37, 55, 70, 108 y 200 kDa para las cuales ambos anticuerpos son específicos contra *N. fowleri* tanto en las muestras de suero como para lavados nasales y general la protección del ratón. Estas proteínas de membrana altamente inmunogénicas e inmunodominantes en la amiba juegan un papel importante en las etapas iniciales de la infección ya que pueden ser las responsables de su adherencia e ingreso de la amiba al epitelio olfatorio.

Concluyendo que la respuesta inmune innata en conjunto con los anticuerpos IgG e IgA específicos en suero y lavados nasales son los principales protectores en el ratón contra la infección de *N. fowleri*.

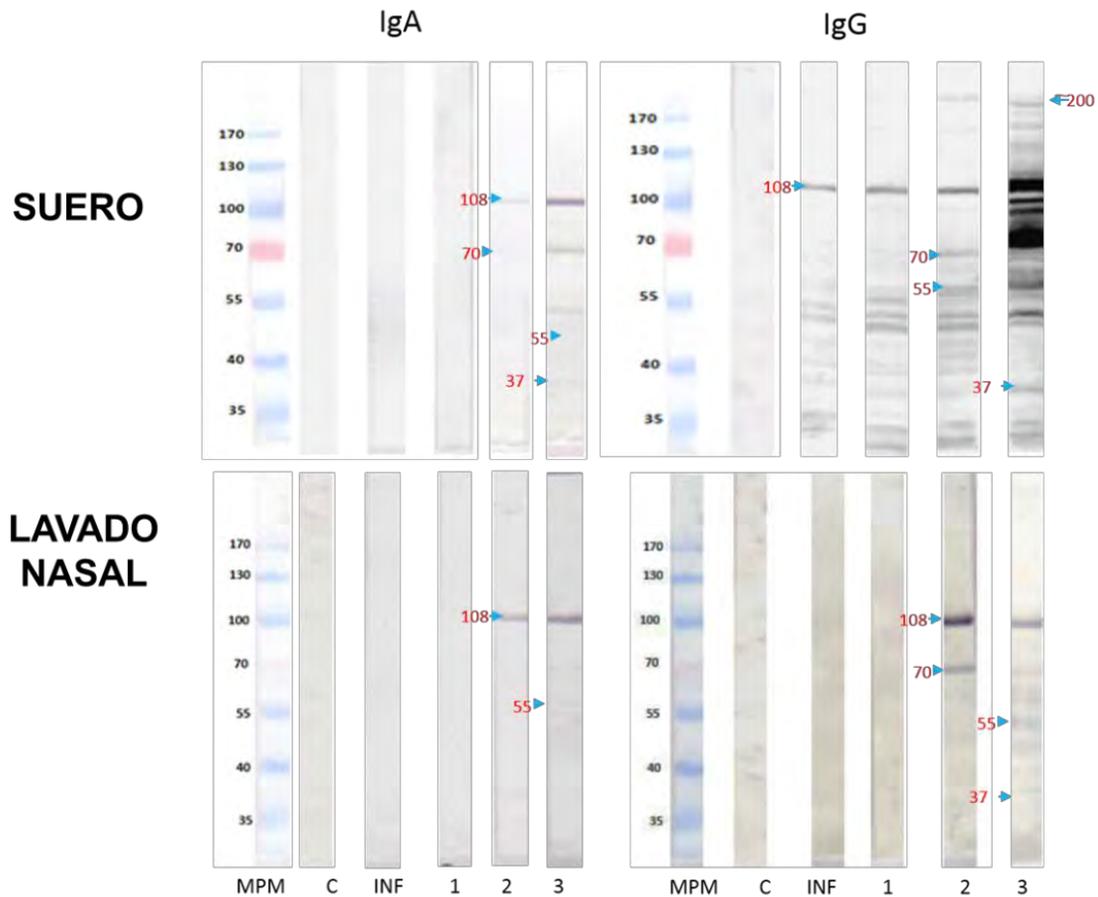


Figura 7. Reconocimiento de anticuerpos específicos IgA e IgG contra proteínas de *N. fowleri* en muestras de suero y lavados nasales de ratones inmunizados y retados (Contis, 2011). C=control, INF=infectado, 1=1ra. inmunización, 2=2da. Inmunización y 3=3ra. inmunización.

En un informe posterior (Carrasco-Yépez *et al.*, 2013) identificaron también algunos de estos antígenos proteicos presentes en *N. fowleri* que posiblemente representan un factor de virulencia y determinaron que estas glicoproteínas con residuos de α -D-manosa y α -D-glucosa podrían desempeñar un papel muy importante en la adhesión

de los trofozoitos de la amiba al epitelio nasal lo que conduce a la infección. Interesantemente, la proteína de 37 kDa presentó residuos de estos carbohidratos, por lo que al tratarse de una glicoproteína estos carbohidratos pueden contribuir a su inmunogenicidad.

JUSTIFICACIÓN

Diferentes tipos de infecciones inician en la cavidad nasal son causadas por una amplia gama de patógenos entre virus, bacterias, hongos y protozoarios; los cuales comienzan a colonizar el epitelio de la mucosa para posteriormente poder establecer la infección. Estas infecciones afectan a millones de personas causando muertes con estadísticas alarmantes (producen más de 13 millones de defunciones al año, OMS 2011), por lo tanto, representan un enorme desafío para el desarrollo de vacunas específicas que puedan inducir inmunidad protectora. Basados en el modelo de protección contra la MEAP en ratón causada por *N. fowleri*, en el cual inmunizando por ruta intranasal con extractos totales de *N. fowleri* coadministrados con la CT, se logra inducir un 100% de protección. Sin embargo la identificación de los antígenos responsables del desencadenamiento de la respuesta protectora constituye el elemento de mayor importancia para el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad. Si bien en el caso de *N. fowleri*, ya se conocen y han descrito algunos antígenos; aquellos involucrados en la protección del modelo propuesto por Rojas-Hernández *et al.*, 2004a no han sido identificados. Hasta el momento no existen vacunas contra la MEAP. Contis en 2011 detectó que hay proteínas de *N. fowleri* inmunogénicas e inmunodominantes, una de éstas es la molécula de 37 kDa, que además es una glicoproteína cuyo peso molecular coincide con la de otros microorganismos a la cual se le ha atribuido propiedades inmunogénicas e inmunoprotectoras a dicha proteína (Tallima *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2004). Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se purificó y se determinó el papel de la molécula

de 37 kDa de *Naegleria fowleri* con el fin de determinar su importancia como candidato a vacuna contra la infección aguda causada por *N. fowleri*.

Los resultados de este trabajo contribuirán en el desarrollo de estrategias de vacunación intranasal con subunidades antigénicas bien definidas, no solo de *N. fowleri*, sino también de otros microorganismos con relevancia médica y así lograr inducir protección a nivel de la mucosa nasal.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar el papel de la molécula de 37 kDa de *Naegleria fowleri* en el modelo de la meningoencefalitis amibiana primaria en ratón.

Objetivos particulares.

1. Identificar, obtener y purificar la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* a partir de geles de poliacrilamida sometidos al proceso de electro-elución.
2. Determinar la pureza de la molécula purificada de 37 kDa de *Naegleria fowleri* utilizando sueros policlonales de conejo y ratón mediante un ensayo de inmunoblot.
3. Determinar el reconocimiento específico del suero de conejo (IgG policlonal) anti-molécula de 37 kDa de *Naegleria fowleri* por medio de un ensayo de inmunoblot.
4. Establecer si la molécula de 37 kDa de *Naegleria fowleri* coadyuvada con Toxina del Cólera induce protección en ratones retados con la dosis letal de trofozoitos vivos de la amiba.
5. Analizar la producción de anticuerpos IgG e IgA séricos y de la mucosa nasal por medio de la técnica de ELISA.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa de *N. fowleri* con la que se trabajó fue ATCC-30808.

Cultivo de *N. fowleri*.

Las amibas se cultivaron axénicamente a 37°C durante intervalos de cuatro días en medio Bactocasitona (Difco, Le Pont de Claix, France) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO, Grand Island, NY) en frascos para cultivo celular (Cellgro Corning). Al suero, dos veces descomplementado, se le añadió antibiótico (Antibac, Penicilina-Estreptomicina) en una proporción de 1 µL por cada mL de suero.

Cosecha y obtención del extracto total amibiano.

Las cajas de cultivo que contenían los trofozoitos de *N. fowleri* se colocaron en el congelador durante 15 min para poder despegar la monocapa celular. El producto obtenido después de agitar cuidadosamente las cajas de cultivo, se vació en un tubo cónico tipo Falcón de 50 mL; se realizaron dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, ANEXO) centrifugando (Hettich Universal 32R) a 2500 rpm durante 10 min y se obtuvo la pastilla celular, a la cual se le adicionó 1 mL de ácido p-hidroximercuricobenzoico al 10 mM (pHMB, ANEXO) como inhibidor de proteasas. El resultado de la resuspensión se almacenó en el congelador a -20°C para su posterior utilización.

Para romper las células y obtener el extracto, se descongeló el producto de por lo menos cinco cosechas obtenidas durante la fase logarítmica de crecimiento de las amibas. Se tomaron 10 µL de la mezcla y se colocaron en un portaobjetos con

cubreobjetos para observarla en un microscopio óptico (PLA2010/034) a 10X y 40X para determinar el tiempo de sonicación de acuerdo a su visualización conforme la forma observada de los trofozoitos. Las amibas se lisaron con un ciclo continuo de sonicación de 4 seg a 100 W de amplitud (BRANSON Digital Sonifier, Model S-150D). Después de la sonicación se tomaron 10 μ L del extracto total amibiano y se observó bajo el microscopio óptico para corroborar el rompimiento celular, mientras que la concentración de proteínas se determinó por la técnica de cuantificación de Bradford (reactivo en el ANEXO) con ayuda de un lector de microplacas (Benchmark, Bio-Rad) a 595 nm, la integridad y el patrón de las proteínas se examinó mediante electroforesis SDS-PAGE con un gel estándar a una concentración de acrilamida del 10%.

Identificación y obtención de la banda correspondiente al peso molecular de 37 kDa de *N. fowleri*.

Se realizó el corrimiento electroforético SDS-PAGE de por lo menos 16 geles con una concentración de acrilamida al 12% en una cámara vertical (Mini-PROTEAN, Bio-Rad) con una fuente de poder para la técnica (PowerPac, Bio-Rad) bajo un voltaje constante de 120 V durante 130 min. Se utilizaron peines de 10 pozos para vidrios de 0.75 mm, en el primer pozo se colocaron 5 μ L del marcador de peso molecular (MPM) (Kaleidoscope, Bio-Rad) mientras que en los otros nueve pozos se colocó el extracto proteico total de *N. fowleri* (20 μ g/ μ L en cada pozo) bajo condiciones reductoras (Amortiguador de muestra 2X, ANEXO) y desnaturalizantes.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se colocaron en solución fijadora durante un periodo de 24 hr y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie durante 24 hr. Fueron desteñidos cuidadosamente con solución desteñidora (solucion en el ANEXO)

hasta obtener el color deseado y lograr determinar la posición exacta de la banda correspondiente al peso molecular de la proteína de interés para luego poder cortar estas secciones de los geles.

Purificación de la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* por electro-elución.

Los trozos de gel obtenidos previamente fueron sometidos al proceso de electro-elución en el que se empleó un equipo Electro-Eluter (Modelo 422, Bio-Rad) con una fuente de poder para la técnica (PowerPac, Bio-Rad) bajo una corriente constante de 60 mA durante 240 min. La molécula se logró retener en las tapas de membrana previamente remojadas en buffer de elución (ANEXO) a 60°C durante 1 hr para que la membrana pudiera expandirse.

Después de la elución, la proteína contenida en el líquido por encima de la tapa de membrana, fue pipeteada y se colocó en un tubo cónico tipo Falcón de 15 mL obteniendo un volumen aproximado de 4.5 mL y se le añadió 600 µL de *p*HMB como inhibidor de proteasas. Posteriormente la muestra se sometió a diálisis de equilibrio para remover el SDS en un multodializador (Spectra/Por EZ1) durante toda la noche en solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, ANEXO); la proteína se concentró en un dispositivo de filtro para volúmenes de muestra arriba de 15 mL dentro de un tubo para centrifuga de 50 mL (Amicon Ultra-15) centrifugando (PrO-Research) a 4000 rpm durante 30 min y la concentración de proteínas se determinó por la técnica de cuantificación de Bradford.

Esquema de inmunización en conejo.

Para la obtención de suero de conejo (IgG policlonal) anti-proteína de 37 kDa y contra *N. fowleri* total, se inmunizaron dos conejos Harlan con una concentración de 100 µg

de proteína purificada y 100 µg del extracto total amibiano cada vez durante tres ocasiones en intervalos de 7 días como se muestra a continuación:

Tabla 4. Esquema de inmunización en conejo.

INMUNIZACIÓN	DÍAS	ADYUVANTE	VIA	SITIO
1°	0	ACF 3 mL	Subcutánea	Dorso
2°	7	AIF 3 mL	Subcutánea	Dorso
3°	14	S/A	Intramuscular	Muslo

Fuente: Elaboración propia del autor de acuerdo a la metodología empleada.

Siete días después de la última dosis de antígeno, se realizó el sacrificio por punción intracardiaca, la sangre se recolectó en tubos cónicos tipo Falcón de 50 mL y se dejó reposar para coagular durante 2 hr a TA, posteriormente el hemolizado formado se rompió con ayuda de un aplicador; la muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 20 min para poder recuperar el suero.

Especificidad de la molécula de 37 kDa reconocida por los sueros de conejo y ratón anti-*N. fowleri* mediante un ensayo de inmunoblot.

La proteína purificada, dializada y concentrada (5 µg) de *N. fowleri* bajo condiciones reductoras (Amortiguador de muestra 2X, ANEXO) y desnaturalizantes se sometió a un corrimiento electroforético SDS-PAGE a una concentración de acrilamida al 10% en una cámara vertical (Mini-PROTEAN, Bio-Rad) con una fuente de poder para la técnica (PowerPac, Bio-Rad) bajo un voltaje constante de 120 V durante 130 min. Posteriormente las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa aplicando un amperaje de 400 mA durante 1 hr, se cortaron en tiras con un ancho de aproximadamente 4 mm y se bloquearon con leche descremada al 10% toda la noche a 4°C. Al día siguiente las tiras se lavaron con PBS-T en 3 ocasiones durante 5 min cada lavado con PBS-T y después se les agregó suero de conejo y ratón anti-*N. fowleri*

total en una dilución 1:100 en PBS-T incubándose toda la noche a 4°C. Después se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron con anticuerpos peroxidados de cabra anti-IgG de conejo y ratón en dilución 1:1000. Finalmente se le agregó la solución reveladora (ANEXO) para evidenciar la reacción.

Reconocimiento específico del suero de conejo anti-molécula de 37 kDa contra todo el extracto de *N. fowleri* mediante un ensayo de inmunoblot.

Extractos totales (20 µg) de *N. fowleri* bajo condiciones reductoras (Amortiguador de muestra 2X, ANEXO) y desnaturalizantes se sometieron a un corrimiento electroforético SDS-PAGE a una concentración de acrilamida al 10% en una cámara vertical (Mini-PROTEAN, Bio-Rad) con una fuente de poder para la técnica (PowerPac, Bio-Rad) bajo un voltaje constante de 120 V durante 130 min. Posteriormente las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa aplicando un amperaje de 400 mA durante 1 hr, se cortaron en tiras con un ancho de aproximadamente 4 mm y se bloquearon con leche descremada al 10% toda la noche a 4°C. Al día siguiente las tiras se lavaron en 3 ocasiones durante 5 min cada lavado con PBS-T y después se les añadió como suero primario el suero de conejo anti-37 kDa en una dilución 1:100 en PBS-T incubándose toda la noche a 4°C. Después se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron con anticuerpos peroxidados de cabra anti-IgG de conejo en dilución 1:1000. Finalmente se le agregó la solución reveladora (ANEXO) para evidenciar la reacción.

Esquema de inmunización en ratones.

Ratones BALB/c se inmunizaron en 4 ocasiones durante un mes (intervalos de siete días) por la vía intranasal (i.n.). Tres grupos con diez ratones cada uno se inmunizaron como se menciona a continuación: el primer grupo con 10 µg de proteína de 37 kDa

más 1 µg de CT, el segundo grupo con la proteína de 37 kDa sola (10 µg) y finalmente el tercer grupo con la CT (1 µg); para la administración que tenía dos componentes, se realizó una mezcla.

Siete días después de la última inmunización con el antígeno, se procedió al reto; el grupo control no fue inmunizado con ningún antígeno, sin embargo si fue retado.

Reto intranasal con trofozoitos vivos de *N. fowleri*.

Partiendo de una concentración proteína purificada de 37 kDa de *N. fowleri* de 2.5 µg/µL se procedió al reto de los grupos de ratones previamente inmunizados, con la dosis letal de trofozoitos vivos de la amiba (5×10^4). Los ratones de los grupos previamente inmunizados con los antígenos, fueron ligeramente anestesiados y cada uno se retó por la ruta i.n. con aproximadamente 30 µL resultado del conteo de amibas y el aseguramiento de la dosis letal. Los ratones fueron monitoreados diariamente durante 30 días posteriores al desafío para determinar la sobrevivencia.

Obtención de muestras.

Se obtuvieron las muestras de suero y lavados nasales de ratones inmunizados y retados que lograron sobrevivir al reto con la dosis letal de trofozoitos vivos de la amiba.

i) Suero: La sangre de los ratones se obtuvo por punción cardiaca y se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 min a 4°C para obtener el suero; el cual se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

ii) Lavados nasales: Las muestras nasales se obtuvieron cortando la cabeza del ratón y pasando 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, ANEXO) en dos ocasiones a través de la tráquea hacia la cavidad nasal con la ayuda de una cánula,

el medio se colecta a partir de las narinas del ratón en una caja de Petri pequeña y se le adiciona 100 μ L de *pHMB* como inhibidor de proteasas. La muestra obtenida se almacenó en el congelador a -20°C para su posterior utilización.

Determinación de anticuerpos IgG e IgA séricos y de lavados nasales anti-proteína de 37 kDa de *N. fowleri* por el método de ELISA.

Placas de 96 pozos se recubrieron con 100 μ L de extracto total de *N. fowleri* (10 μ g proteína/mL) en regulador de carbonatos (0.1 M Na_2CO_3 , pH 9.6) y se incubaron toda la noche a 4°C . Después se lavaron 3 veces con PBS-T y se bloquearon con 100 μ L de leche descremada al 6% en PBS-T, se incubaron durante 4 hr a temperatura ambiente; las placas se lavaron nuevamente en 3 ocasiones con PBS-T y se incubaron toda la noche a 4°C con las muestras (100 μ L): sueros en una dilución 1:1000 para todos los grupos y los lavados nasales sin diluir (100 μ L). Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y se agregaron (100 μ L) los anticuerpos peroxidados de cabra anti-IgG e IgA de ratón a una dilución 1:1000, los anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C . Después las placas se lavaron nuevamente 3 veces con PBS-T y se adicionó 100 μ L de la solución reveladora (o-fenilendiamina 0.4 mg/mL, H_2O_2 0.04% en buffer de fosfato-citrato 50 mM pH 5.2), después la reacción se detuvo a los 10 min con 25 μ L de ácido sulfúrico 2.5 M directo sobre los pozos. Por último, la absorbancia se midió a 492 nm en lector de microplacas (Benchmark, Bio-Rad).

Análisis estadístico.

En las gráficas las barras representan los valores de las medias \pm SD A_{492} para los niveles de anticuerpos de cada grupo experimental. Las diferencias significativas en

los niveles de anticuerpos entre los diferentes grupos fue determinada usando una prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Tukey.

RESULTADOS

Se obtuvo un 30% de sobrevivencia al inmunizar con la proteína de 37 kDa sola, interesantemente, cuando la proteína es coadyuvada con la CT se obtuvo un 70% de protección. Por otro lado se analizó la producción de anticuerpos específicos anti 37 kDa, tanto en suero como en los lavados nasales de los grupos de ratones inmunizados y retados. Se observó que los niveles de anticuerpos de los isotipos IgA e IgG se incrementaron en los ratones inmunizados tanto con la proteína de 37 kDa sola así como en los ratones que fueron inoculados con la proteína más la CT. Este hallazgo permite sugerir que la proteína de 37 kDa de *N. fowleri* está participando en la inmunidad protectora mediada por anticuerpos IgA e IgG, respuesta que es inducida cuando los ratones son inmunizados con ambos tratamientos.

Identificación de la banda correspondiente al peso molecular de la proteína de 37 kDa de *N. fowleri*.

Para determinar el lugar correspondiente a la molécula de 37 kDa de *N. fowleri*, se corrió el extracto total amibiano (lisado celular), partiendo de una concentración de proteínas inicial de 3.13 µg/µl. Este paso fue evaluado mediante una electroforesis SDS-PAGE con un gel de acrilamida al 12% que se reveló con una solución teñidora de azul de Coomassie para analizar la integridad de las proteínas. La molécula de nuestro interés fue seleccionada y empleada posteriormente (Figura 8).

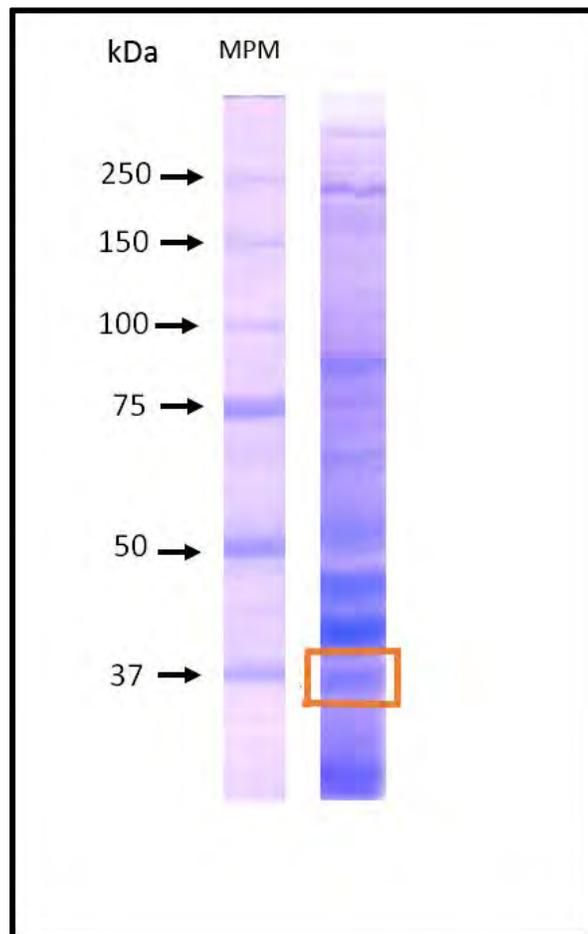


Figura 8. Gel producto de la electroforesis SDS-PAGE con una concentración de acrilamida al 12% teñido con azul brillante de Coomassie R-250. El extracto total amibiano de *N. fowleri* fue sometido a condiciones reductoras y desnaturalizantes. Se señala la banda correspondiente al peso molecular de 37 kDa. MPM: marcador de peso molecular (a la izquierda).

Purificación de la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* por electro-elución.

Debido a que la elución de proteínas a partir de geles de poliacrilamida es una técnica que se ha utilizado para una amplia variedad de propósitos (Seelert & Krause, 2008) en este trabajo se decidió utilizar la electro-elución como ensayo para la obtención de la molécula de interés. Para lo cual se obtuvieron las secciones correspondientes al peso molecular de interés de por lo menos de 16 geles.

Una vez llevada a cabo la purificación, se corrió un gel de electroforesis SDS-PAGE al 16% con el fin de corroborar tanto la pureza como el peso molecular de la proteína de interés (Figura 9).

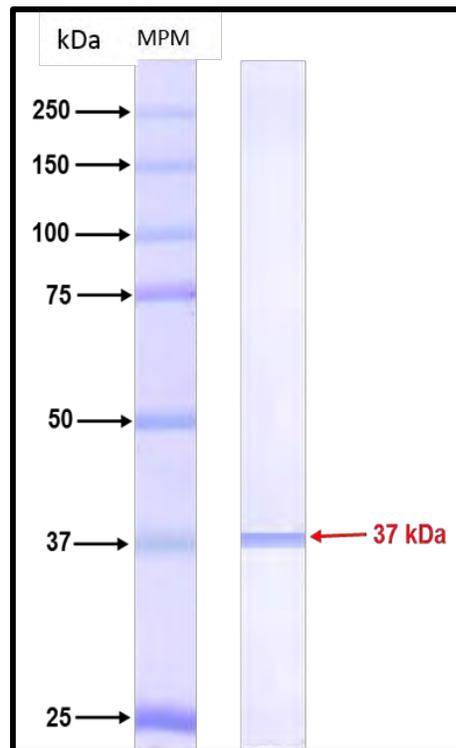


Figura 9. Gel SDS-PAGE con una concentración de acrilamida al 16% teñido con azul brillante de Coomassie R-250. La proteína de 37 kDa fue sometida a condiciones reductoras y desnaturalizantes. Se señala la única banda detectada y correspondiente. MPM: marcador de peso molecular (a la izquierda).

Especificidad de la molécula de 37 kDa reconocida por los sueros de ratón y conejo anti-*N. fowleri*.

Las muestras de suero de conejo y de ratones inmunizados (ver Material y métodos) fueron utilizadas en todos los ensayos inmunoenzimáticos.

Al analizar el ensayo de inmunoblot, se observó que la proteína de 37 kDa fue reconocida por anticuerpos IgG tanto de los conejos así como también de los ratones previamente inmunizados con extractos totales de *N. fowleri* (Figura 10). En la misma figura, se observa que la molécula de 37 kDa fue reconocida más intensamente cuando se empleó el suero de conejo anti-*N. fowleri* en comparación con el antisuero de ratón. Claramente se observa una mayor intensidad en la banda correspondiente a la proteína de interés cuando es incubada con los sueros de conejo. Por otro lado, también se aprecia una banda tenue por debajo de los 37 kDa, probablemente se deba a nuestra misma molécula, ya que al ser corrida en condiciones reductoras, puede sufrir algunos cambios en cuanto al tamaño y consecuentemente ser reconocida por los anticuerpos específicos. En este mismo ensayo se utilizó como control suero de conejo sano y ninguna banda fue reconocida. En general, este resultado corrobora que cuando la proteína es electro-eluida, no sufre cambios dramáticos en cuanto a su estructura conformacional, ya que se mantiene el reconocimiento por los anticuerpos IgG específicos para *N. fowleri*.

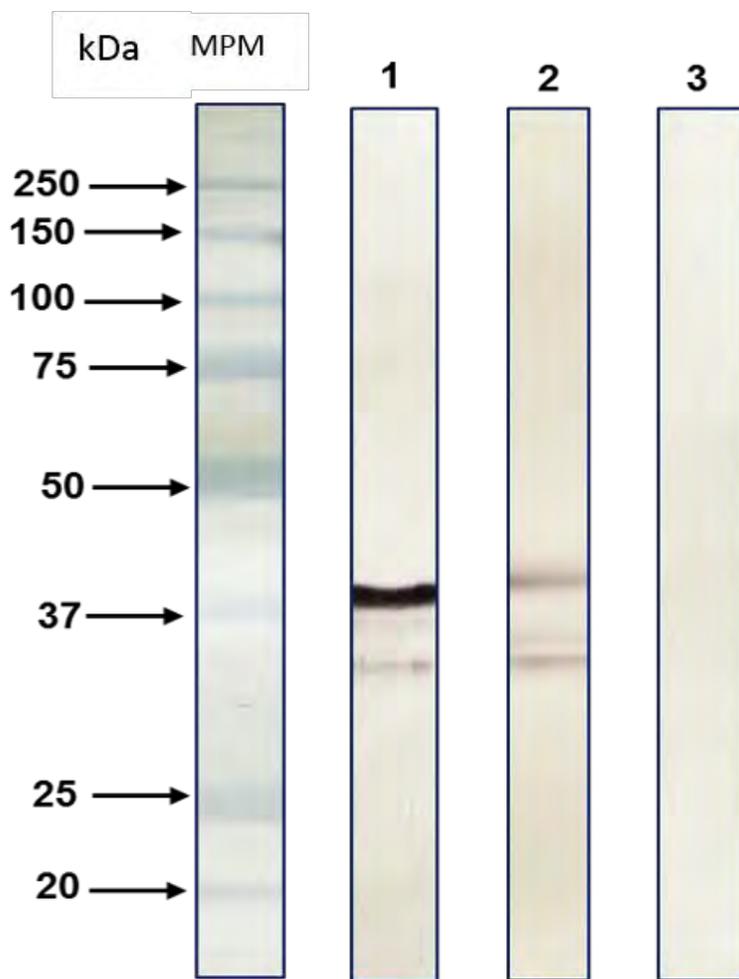


Figura 10. Inmunoblot de la proteína electro-eluida a partir de geles con peso molecular de 37 kDa reconocida por los anticuerpos IgG de sueros de ratón y conejo anti-*N. fowleri*. La molécula purificada, dializada y concentrada (5 μ g) se sometió a un corrimiento electroforético SDS-PAGE con una concentración de acrilamida al 10% cuyo gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. A las tiras de 4mm obtenidas, se le bloquearon los sitios inespecíficos en donde se pudiera pegar erróneamente el anticuerpo con caseína al 10%. A partir de este paso, todos los lavados se llevaron a cabo con PBS-T. Posteriormente, como suero primario (1:100) se les colocó suero de conejo anti-*N. fowleri* (1), suero de ratón anti-*N. fowleri* (2) y el suero de conejo sano como control (3). Se dejaron incubando toda la noche para después realizarles los lavados correspondientes. Como anticuerpo secundario (1:1000) se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo y ratón peroxidado. Este último fue incubado durante toda la noche. Finalmente se le agregó la solución reveladora para evidenciar la reacción. MPM: marcador de peso molecular (a la izquierda).

Reconocimiento específico del suero de conejo anti-molécula de 37 kDa contra todo el extracto de *N. fowleri*.

Una vez que se obtuvo el suero de conejo inmunizado con la proteína purificada de 37 kDa de *N. fowleri*, se corroboró la especificidad de los anticuerpos IgG.

El extracto total de *N. fowleri* fue separado por medio de electroforesis SDS-PAGE y el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. En el ensayo de inmunoblot (Figura 11) se aprecia que el antisuero contra la proteína de 37 kDa de *N. fowleri* producido en conejo, reconoce únicamente a la proteína de 37 kDa y no a otra molécula presente en la gama antigénica de *N. fowleri*. Claramente se observa que no hay reconocimiento de alguna otra proteína de la amiba (Figura 11 carril 1). Con este ensayo se confirma que el conejo fue inoculado únicamente con la molécula eluida, ya que los anticuerpos inducidos en el conejo resultaron ser altamente específicos para la proteína. Como control, de igual manera se corrió todo el extracto de la amiba, pero en esta ocasión se utilizó suero de conejo inmunizado con el extracto total de *N. fowleri*. Claramente se observa el patrón de reconocimiento de bandas que van desde proteínas de ~20 kDa hasta ~288 kDa, es decir, el conejo está montando una respuesta de anticuerpos hacia la mayoría de los antígenos presentes en *N. fowleri* cuando se inmunizan con el extracto total (Figura 11 carril 2).

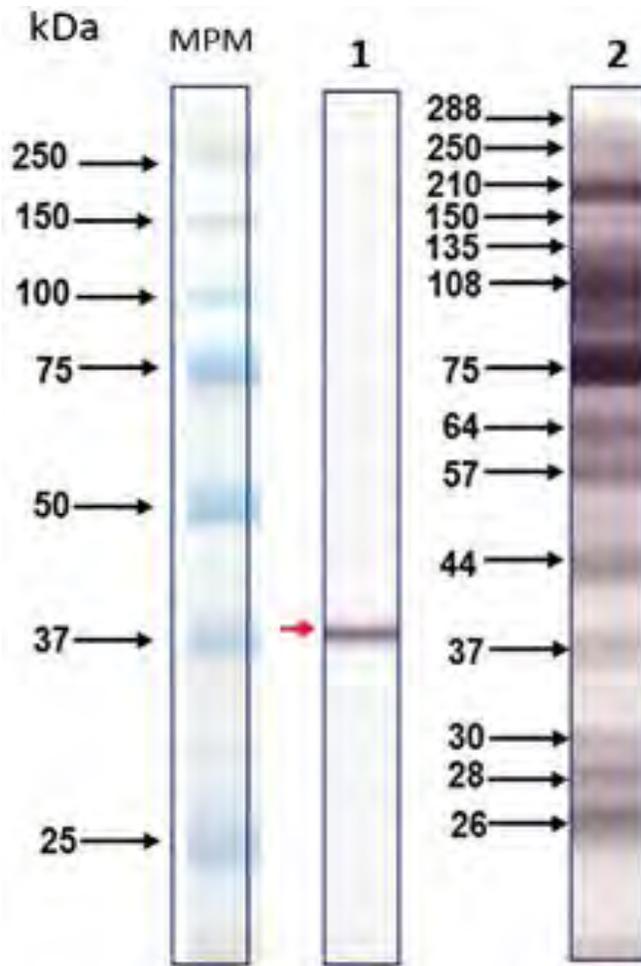


Figura 11. Inmunoblot de la respuesta específica de anticuerpos IgG del suero de conejo anti-molécula de 37 kDa y el suero total anti-*N. fowleri* sobre el extracto total de la ameba. El extracto total amibiano de *N. fowleri* (20 µg) se separó por medio de electroforesis SDS-PAGE con una concentración de acrilamida al 10%, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Las tiras de 4mm obtenidas, se bloquearon con leche descremada al 10% para evitar los sitios inespecíficos en donde se pudiera pegar erróneamente el anticuerpo; a partir de este paso todos los lavados se llevaron a cabo con PBS-T. Como suero primario (1:100) se colocó el suero de conejo anti-molécula de 37 kDa (1) y como suero control se colocó el antisuero de conejo contra lisados totales de *N. fowleri* (2). Ambos se dejaron incubar toda la noche para después realizar los lavados correspondientes. Como anticuerpo secundario (1:1000) se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo peroxidado. Este último fue incubado durante toda la noche. Finalmente se le agregó la solución reveladora para evidenciar la reacción. MPM: marcador de peso molecular (a la izquierda).

La Inmunización de ratones con la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* induce protección.

En esta parte del trabajo, se analizó si la inmunización con la molécula de 37 kDa era capaz de inducir protección en ratones retados con trofozoitos de *N. fowleri*. Se evaluó la sobrevivencia de los ratones inmunizados con la proteína de 37 kDa sola, la proteína coadministrada con la CT, CT sola y el grupo únicamente infectado con la dosis letal (5×10^4) de trofozoitos vivos de la ameba como control.

Los datos muestran grupos de diez ratones (Figura 12) que todos los animales del grupo control murieron alrededor del día nueve, mientras que el porcentaje de protección de los ratones inmunizados con la molécula de 37 kDa más CT fue mayor con un 70%, lo que fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a los resultados obtenidos en los ratones inmunizados con la proteína de 37 kDa sola, los cuales tuvieron un 30% de sobrevivencia, resultado que fue diferente significativamente ($p < 0.05$) con respecto al grupo control infectado no inmunizado. Como se ha demostrado en trabajos anteriores (Rojas-Hernández *et al.*, 2004a), la inmunización con CT sola, induce un 60% de protección cuando los ratones son retados con las amebas virulentas; lo que se corroboró con este estudio.

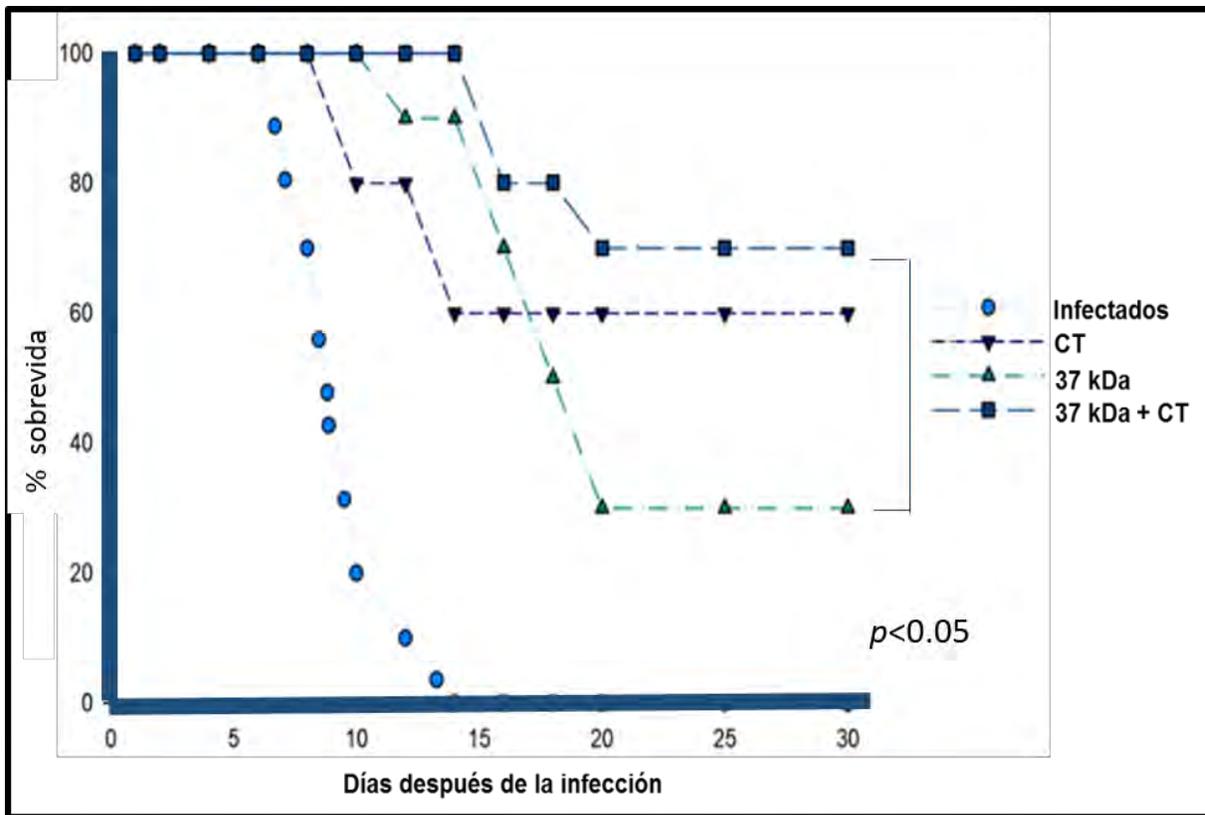


Figura 12. Porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* y posteriormente retados con la dosis letal de trofozoitos vivos de la ameba. Ratones BALB/c fueron inmunizados en 4 ocasiones durante un mes (1 vez por semana) por la ruta intranasal (i.n.) con 10 µg de la proteína purificada de *N. fowleri* más 1 µg de CT (■), con la molécula de 37 kDa (▲), con la CT (▼) y finalmente el grupo control de infectados (●), no inmunizados y retados. El reto se realizó siete días después de la última inmunización con la dosis letal 5×10^4 de trofozoitos vivos de la ameba. Se observó la supervivencia durante 30 días después del reto.

Respuesta de anticuerpos IgG e IgA séricos y de lavados nasales anti-proteína de 37 kDa de *N. fowleri*.

Para determinar la producción de anticuerpos IgG e IgA tanto en suero como en lavados nasales de los diferentes grupos de ratones, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos utilizando la técnica de ELISA.

En la Figura 13 se observa que hay un incremento significativo ($p < 0.05$) en la producción de los niveles de anticuerpos séricos de ambos isotipos (IgG e IgA) de los dos grupos de ratones inmunizados con respecto al grupo de ratones sanos e infectados. Cabe señalar que existe una mayor producción de anticuerpos tanto IgG como de IgA en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de la proteína purificada de 37 kDa más la CT, esto probablemente se deba al efecto de adyuvancia que está ejerciendo la CT sobre la molécula de 37 kDa. El grupo de los ratones que fue inmunizado únicamente con la proteína de 37 kDa, incrementó significativamente ($p < 0.05$) en la producción de IgG con respecto a la producida en el grupo control y en los ratones inmunizados con CT sola. En cuanto a la producción de IgA en este mismo grupo no se encontró un aumento significativo ($p > 0.05$) con respecto al grupo control y a los inmunizados con CT sola.

El grupo inmunizado con la CT sola no indujo producción de anticuerpos de ninguno de los dos isotipos ($p > 0.05$). Con este resultado se puede señalar que la proteína de 37 kDa tiene un efecto inmunogénico, ya que la respuesta de IgG sérica estimulada por este antígeno fue fuertemente inducida (Figura 13).

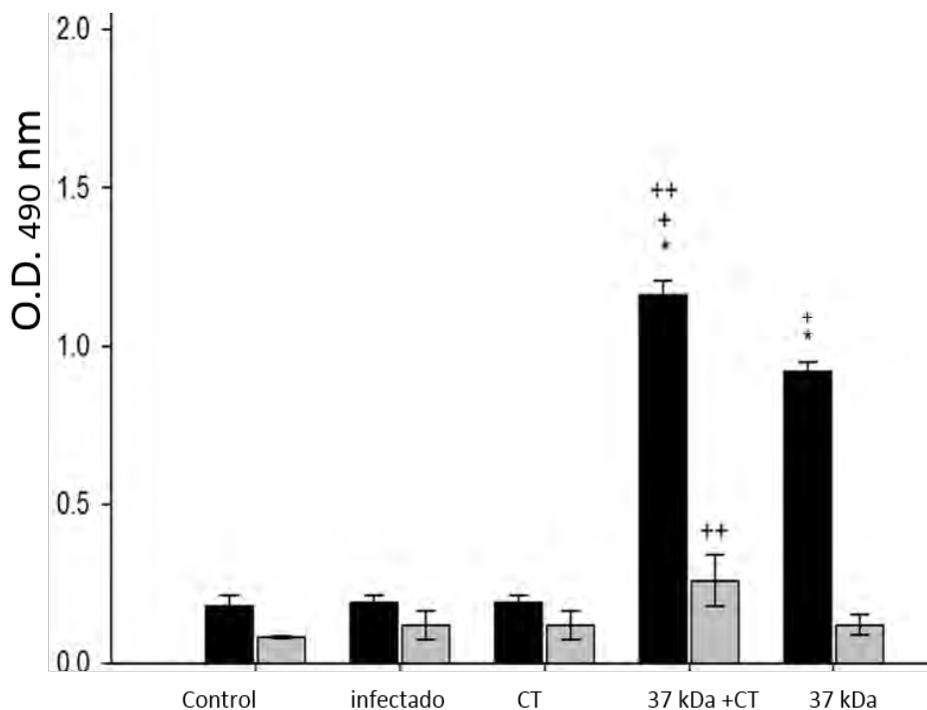


Figura 13. Respuesta de IgG e IgA anti-37 kDa de *N. fowleri* en sueros de los diferentes grupos de ratones. Cada grupo fue inmunizado i.n con CT sola, con proteína de 37 kDa más CT y con proteína de 37 kDa. Se comparan los valores de absorbancia entre cada grupo. Las muestras fueron colectadas a las 24 hrs después de la infección con 5×10^4 trofozoitos de *N. fowleri*. Los niveles de IgG (barras negras) e IgA (barras grises) fueron determinados por la técnica de ELISA. Los datos expresan los valores de absorbancia a 492 nm (A_{492}) de la media \pm SD de cada grupo experimental (N=5) Las muestras fueron analizadas por duplicado. Se muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (*), con respecto al grupo solamente infectado (+) y con respecto al grupo inmunizado con la proteína de 37 kDa (++).

Por último, en la Figura 14 podemos apreciar una respuesta significativa ($p < 0.05$) de anticuerpos de los isotipos IgG e IgA en las muestras (no diluidas) de lavados nasales de todos los grupos de ratones inmunizados con respecto al grupo control de ratones sanos. Cabe resaltar que existe una mayor producción de anticuerpos tanto de IgA como de IgG en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de la proteína purificada de 37 kDa más la CT con respecto al resto de los grupos ($p < 0.05$). Por otro lado, aunque los grupos infectados e inmunizados únicamente con la CT los niveles de anticuerpos estuvieron incrementados con respecto al grupo control ($p < 0.05$), entre

ellos no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) ya que se puede observar un comportamiento similar en cuanto a la producción de ambos anticuerpos (Figura 14).

En el grupo de ratones infectados se presentó una ligera respuesta de anticuerpos que incrementó ambos isotipos con respecto al control ($p<0.05$), esto probablemente se deba al estímulo producido por sí solo de la amiba. Sin embargo este aumento es significativamente menor ($p<0.05$) al producido por el grupo donde se inmunizó con ambos tratamientos.

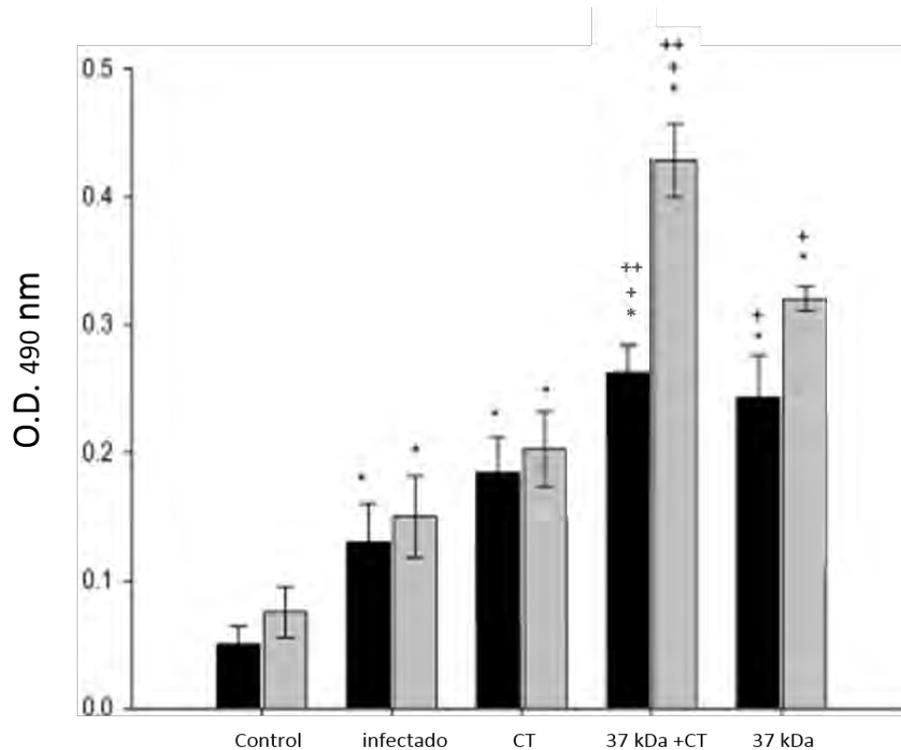


Figura 14. Respuesta de IgG e IgA anti-37 kDa de *N. fowleri* en lavados nasales de los diferentes grupos de ratones. Cada grupo fue inmunizado i.n. con CT sola, con proteína de 37 kDa más CT y con proteína de 37 kDa. Se comparan los valores de absorbancia entre cada grupo. Las muestras fueron colectadas a las 24 hrs. después de la infección con 5×10^4 trofozoitos de *N. fowleri*. Los niveles de IgG (barras negras) e IgA (barras grises) fueron determinados por la técnica de ELISA. Los datos expresan los valores de absorbancia a 492 nm (A_{492}) de la media \pm SD de cada grupo experimental (N=5). Las muestras fueron analizadas por duplicado. Se muestran las diferencias significativas ($p<0.05$) con respecto al grupo control (*), con respecto al grupo solamente infectado (+) y con respecto al grupo inmunizado con la proteína de 37 kDa (++)

DISCUSIÓN

En los resultados se observó (Figura 12) que la inmunización i.n. con la proteína purificada de 37 kDa coadministrada con CT, aumentó la sobrevivencia a un 70% después de que los ratones fueron retados con la dosis letal de trofozoitos vivos de la ameba. Cuando los ratones fueron inmunizados i.n. con la proteína de 37 kDa sola, se encontró una protección del 30%. La inmunización i.n. con CT sola también tuvo efectos protectores contra la infección causada por *N. fowleri* ya que confirió una sobrevivencia del 60%, esto coincide con los datos reportados por Rojas-Hernández *et al.* en el 2004, donde sugieren que este adyuvante puede estimular mecanismos de la inmunidad innata.

En el mismo trabajo de Rojas-Hernández *et al.* 2004a donde inmunizaron i.n. con extracto de *N. fowleri* más CT, se encontró un 100% de protección cuando los ratones fueron retados con las amebas vivas. Al analizar la respuesta de anticuerpos tanto séricos como mucosales, determinaron que la respuesta de IgG incrementada en suero no se correlacionó con los niveles de protección, en comparación con la respuesta de anticuerpos de la mucosa, los cuales podrían estar más directamente relacionados en la defensa del huésped contra la infección causada por *N. fowleri*.

Cabe señalar que en el presente trabajo se encontró que los ratones inmunizados por la ruta i.n. con la proteína purificada de 37 kDa de *N. fowleri* sola y también coadministrada con CT provocaron una respuesta de anticuerpos IgG e IgA significativa tanto en muestras de suero como de lavados nasales respectivamente (Figura 13 y 14). La inmunización i.n. con CT sola, únicamente incrementó los niveles

de IgG e IgA en lavados nasales y su efecto adyuvante sobre la producción de anticuerpos fue observado principalmente sobre la producción de IgG en suero y sobre la producción de IgA en lavados nasales. En conjunto, estos resultados demuestran por un lado, el papel inmunogénico de la proteína de 37 kDa y consecuentemente su papel protector; y por otro lado, se confirma la adyuvancia de la CT sobre subunidades antigénicas tal como la proteína de 37 kDa. Por tanto, los resultados de este trabajo coinciden con lo establecido por diversos autores (Cano *et al.*, 2000; FitzGerald & Mrsny 2000; Matsuo *et al.*, 2000) donde mencionan que las vacunas subunitarias administradas por vía nasal pueden proporcionar una estimulación inmune efectiva en términos de respuesta humoral, especialmente si el antígeno es coadministrado con algún adyuvante como la CT. Además, se ha demostrado que la inmunización nasal en estudios con humanos y roedores produce mayor respuesta de anticuerpos a nivel sistémico a diferencia de otras rutas de inmunización por mucosas (Staats *et al.*, 1997; Kozlowski *et al.*, 2002). Esto lo corroboramos con el incremento de la IgG en suero de nuestros grupos inmunizados.

En este trabajo se encontró el mayor aumento significativo en la producción de IgG e IgA, de suero y lavados nasales respectivamente en el grupo de ratones inmunizados con la proteína purificada de 37 kDa de *N. fowleri* más CT, en comparación con los otros grupos. Además de que fue el tratamiento que proporcionó el mayor nivel de protección. Previamente (Rojas-Hernández *et al.* 2004a) demostraron que, utilizando el mismo protocolo de inmunización, pero con extractos totales de la amiba, la IgA e IgG son inducidas y que aparentemente la IgA parece tener un papel más importante en la protección. Sin embargo, hay que tener en cuenta el papel protector del

anticuerpo IgG en las mucosas, contra los microorganismos que entran a través de éstas. De hecho, se ha observado que la inmunización i.n. con extractos de *N. fowleri* más CT ha resultado en la inducción de anticuerpos específicos IgG1 e IgG2a en lavados nasales (Carrasco-Yépez *et al.*, 2014). En el presente trabajo también se observó un claro incremento de la IgG en lavados nasales y suero de los ratones inmunizados y cuya protección se vio aumentada (Figura 12). Por ejemplo, Wagner *et al.*, 1987 demostró que la IgG fue la principal inmunoglobulina en la cavidad nasal de humanos que previamente habían sido vacunados contra el virus de la Influenza A. Ellos demostraron que estos anticuerpos no eran localmente producidos, sino eran derivados del plasma a través de un proceso llamado trasudación pasiva a lo largo de un gradiente de concentración. También sugirieron que la magnitud de este gradiente, podría tener implicaciones directas en la protección de las superficies mucosas dada por anticuerpos sistémicos.

Por lo tanto, en el presente trabajo, ambas clases de anticuerpos específicos para la proteína de 37 kDa (IgG e IgA) producidos en los ratones inmunizados, podrían estar desempeñando un papel importante en el control de la infección. Donde la IgA anti-37 kDa de *N. fowleri*, podría estar previniendo la adhesión inicial de la amiba al epitelio nasal mientras que la IgG anti-37 kDa está funcionando como un respaldo. De tal manera que ambos anticuerpos situados en el lumen, son capaces de inmovilizar a los trofozoitos, permitiendo que las células inflamatorias ejerzan su papel citotóxico sobre *N. fowleri*.

Cabe señalar que la vía de infección de este microorganismo es a través de la mucosa nasal, por lo que obtener una vacuna que confiera inmunidad protectora mediada por anticuerpos y por esta vía es de suma importancia.

Patógenos tales como bacterias, virus, hongos y protozoos generan moléculas que proporcionan una ventaja selectiva, a menudo a expensas del huésped. Estas moléculas, también conocidas como factores de virulencia, permiten a los patógenos colonizar al huésped a través de diferentes mecanismos (Seidler, 2012). Algunas de estas moléculas son proteínas que se exportan a la superficie de la célula o que el parásito secreta como moléculas inductoras en una respuesta biológica que se cree que participa en los eventos fisiopatológicos e inmunológicos durante la infección (Jong-Hyun *et al.*, 2009).

Algunos estudios de antigenicidad de *N. fowleri* utilizando técnicas de inmunoprecipitación y western blots (Visvesvara & Balamuth, 1975; Powell *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 2001) han demostrado que algunas proteínas parecen tener un papel importante tanto en la infección (adhesinas) y en la protección, sin embargo hasta la fecha, no se ha propuesto alguna de estas proteínas como candidato a vacuna. Existe un par de trabajos (Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013) que proponen una vacuna de DNA utilizando el gen Nfa1 de virulencia contra la enfermedad en ratón, sin embargo dicha vacuna pudiera presentar ciertas desventajas frente a las vacunas subunitarias, como es el riesgo potencial de producir trastornos inmunopatológicos lo cual pudiera desencadenarse por la persistencia de la expresión de antígenos después de la inmunización con la vacuna de DNA, además de que el DNA inoculado puede

integrarse en la célula del huésped y causar mutaciones por inserción de dichos plásmidos (Robertson & Griffiths, 1998).

En diversos trabajos, con diferentes microorganismos, se ha determinado que la GAPDH parece desempeñar un papel como proteína inmunogénica e inmunoprotectora (Tallima *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2004). También se le han atribuido otras propiedades independientemente a su actividad enzimática tal es el caso de adhesina para algunos microorganismos patógenos los cuales se unen a través de la GAPDH a fibronectina, lisozima y proteínas de citoesqueleto (Pancholi & Chhatwal, 2003).

Diversas investigaciones han determinado las propiedades antigénicas de la GAPDH con el propósito de generar vacunas subunitarias; por ejemplo, en helmintos han evaluado péptidos correspondientes a la GAPDH y sus determinantes antigénicos para ver si podrían ser utilizados en una vacuna subunitaria contra la infección causada por *Schistosoma mansoni* (Argiro *et al.*, 2000). Seis péptidos fueron seleccionados en base a la homología más baja con el humano para la GAPDH, los péptidos fueron derivados de la secuencia primaria de la proteína GAPDH de *Schistosoma mansoni* (SG3PDH) y determinaron que la naturaleza y el efecto de las respuestas inmunes varían para cada péptido (Tallima *et al.*, 2003). También han caracterizado la GAPDH y la han relacionado con la adhesión y la invasión de células del huésped: pasos esenciales implicados en la infección y la difusión de los agentes patógenos tales como el hongo *Paracoccidioides brasiliensis* el cual causa una micosis pulmonar que se puede difundir a varios órganos y tejidos dando lugar a una grave enfermedad (Santiago *et al.*, 2006), por otra parte demostraron que en el hongo entomopatógeno *Metarhizium*

anisopliae, la GAPDH se localizaba en la superficie celular y en los ensayos con alas de los insectos mostraron que esta proteína tiene una actividad similar en la adhesión (Broetto *et al.*, 2010). Otro estudio demostró que la GAPDH actúa como un factor de adherencia en *Penicillium marneffe* al mediar la adhesión de conidios al epitelio broncoalveolar durante la fase de establecimiento temprano de la infección (Lau *et al.*, 2013). Cabe mencionar que en bacterias también han sugerido a la proteína de membrana exterior con peso molecular de 37 kDa como una efectiva candidata a vacuna contra diferentes serotipos de *Edwardsiella tarda* (Kawai *et al.*, 2004). Por otra parte mostraron que la GAPDH se expresa en las células de superficie de *Lactobacillus plantarum*, la cual utiliza para adherirse y colonizar la mucosa intestinal humana utilizando la actividad de unión de la proteína (Kinoshita *et al.*, 2008) y también demostraron que una mutación de GAPDH afecta de manera significativa la capacidad de *Neisseria meningitidis* para adherirse a células epiteliales humanas y células endoteliales lo que sugiere un papel muy importante en la patogénesis de la infección meningocócica (Tunio *et al.*, 2010). En base a estos antecedentes, y a lo encontrado en este trabajo; se sugiere que la GAPDH con peso molecular de 37 kDa podría ser una proteína candidata efectiva a vacuna contra la meningoencefalitis amibiana primaria causada por *N. fowleri* y para otros patógenos que usen esta proteína como adhesina.

La GAPDH, enzima implicada en una de las actividades catalíticas más importante de la glucólisis (Sirover, 1999) ahora es considerada una proteína de superficie. En el presente trabajo se ha logrado purificar esta proteína por medio del proceso de electro-

elución (Figura 9) (Seelert & Krause, 2008), y esto es muy importante para futuros estudios de caracterización.

Hay varios aspectos de la proteína que tienen que ser aclarados, por ejemplo, la manera por la que la GAPDH es transportada a la superficie exterior, la manera en que se une a la membrana y el papel que desempeñan como proteína inmunogénica en los microorganismos patógenos (Seidler, 2012). Por tanto el tenerla en condiciones de pureza, permitirá poder llevar a cabo tales estudios en *N. fowleri*.

En este trabajo, podemos concluir que la proteína con peso de 37 kDa de *N. fowleri* (GAPDH) es un antígeno el cual es reconocido por anticuerpos específicos, los cuales son inducidos después de la inmunización tanto con la proteína sola o coadyuvada con CT; y que muy probablemente, epítopes de la proteína que no son compartidos por la GAPDH de humano, sean los responsables de la inmunidad protectora. De tal manera que en este trabajo se sugiere que la proteína de 37 kDa de *N. fowleri* debe ser considerada como un candidato a vacuna subunitaria en el modelo de la meningoencefalitis en ratón.

Estudios posteriores son necesarios en el diseño de algunos epítopes quiméricos de la enzima GAPDH de *N. fowleri* a través de predictores *in silico* para posteriormente evaluar sus propiedades inmunogénicas e inmunoprotectoras y de esta manera validarlos como candidatos a vacunas.

CONCLUSIONES

- Se logró obtener y purificar la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* a partir de geles de poliacrilamida sometidos al proceso de electro-elución.
- Se confirmó la pureza y especificidad de la proteína de 37 kDa de *N. fowleri* purificada por electro-elución.
- La Inmunización de ratones con la molécula de 37 kDa de *N. fowleri* coadministrada con la CT indujo un 70% de protección en los ratones infectados con trofozoitos, mientras que la inmunización con la proteína de 37 kDa sola indujo un 30 % de protección.
- Se encontró un incremento en la producción de los niveles de anticuerpos séricos de ambos isotipos (IgG e IgA) en los ratones inmunizados tanto con la proteína coadministrada con la CT como con la proteína sola.
- Hubo una mayor producción de anticuerpos séricos tanto IgG como de IgA en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de la proteína purificada de 37 kDa más la CT.
- El grupo inmunizado con la CT sola no indujo producción de anticuerpos séricos de ninguno de los dos isotipos.
- En cuanto a los anticuerpos de los isotipos IgG e IgA en las muestras de lavados nasales de todos los grupos de ratones inmunizados hubo un incremento con respecto a los controles.
- Existió una mayor producción de anticuerpos tanto de IgA como de IgG en el grupo de ratones inmunizados con la combinación de la proteína purificada de 37 kDa más la CT con respecto al resto de los grupos.

- La proteína de 37 kDa es inmunogénica, ya que la respuesta de anticuerpos tanto séricos como de los lavados nasales es fuertemente inducida después de la inmunización tanto con la proteína sola como coadyuvada con la CT.
- Epítopes de la proteína que no son compartidos por la proteína de 37 kDa (GAPDH de humano), muy probablemente sean los responsables de la inmunidad protectora.
- La proteína de 37 kDa de *N. fowleri* debe ser considerada como un candidato a vacuna subunitaria en el modelo de la meningoencefalitis amibiana primaria en ratón.

ANEXO

PBS 10X

REACTIVO	1 LITRO
NaCl (Cloruro de Sodio)	80 g
Na₂HPO₄ (Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro)	14.4 g
KCl (Cloruro de Potasio)	2 g
KH₂PO₄ (Fosfato de Potasio Monobásico)	2.4 g

1.- Se disuelven todos los reactivos en 800 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 7.4 usando HCl. Después se afora al volumen final y se esteriliza en autoclave.

PBS 1X

100 ml. de PBS 10X + 900 mL de agua destilada.

PBS Tween

100 mL de PBS 10X + 900 mL de agua destilada, agregar 500 µL de Tween 20.

pHMB “Inhibidor de proteasas”

REACTIVO	CANTIDAD
Trizma base 150 mMol	0.9 g
4-(Hydroxymercuri) benzoic acid sodium salt 10 mMol	0.18 g
Agua destilada	50 mL

Amortiguador de muestra 2X

REACTIVO	8 ml.
Agua destilada	800 µL
Triz pH 6.8 (0.5M)	2 mL
Glicerol	1.6 mL
SDS 10%	3.2 mL
Azul de Bromofenol (0.5%)	1.6 mL

Adicionar 400 µl de β-mercapto-etanol al 14.2M y hacer alícuotas para congelar.

Soluciones fijadora, teñidora y desteñidora

RACTIVO (1 LITRO)	FIJADORA	TEÑIDORA	DESTENIDORA
Metanol	500 ml.	500 mL	400 mL
Ácido Acético	100 ml.	100 mL	100 mL
Azul de Coomassie Brillante R-250		1 g	

Bradford

REACTIVO	100 ml.
Azul Brillante G-250	0.050 g
Etanol 95%	25 mL
H ₃ PO ₄	50 mL

Aforar al volumen final y filtrar.

Solución Reveladora

REACTIVO	20 ml.
4-Chloro-1-naphthol	0.01 g
Metanol	3.5 mL
PBS 1X	16.5 mL
H ₂ O ₂	10 µL

Buffer de Elución y Transferencia

RACTIVO (1 LITRO)	ELUCIÓN	TRANSFERENCIA
Tris base	3 g	3.3 g
Glicina	14.4 g	11.5 g
SDS	1 g	
Metanol		200 mL

BIBLIOGRAFIA

Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le, Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A. & Spiegel, F.W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 429-481.

Argiro, L.L., Kohlstädt, S.S., Henri, S.S., Dessein, H.H., Matabiau, V.V., Paris, P.P., Bourgois, A.A., Dessein, A.J. (2000). Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa *Schistosoma mansoni* GAPDH. *Vaccine*, 18(19): 2039-2048.

Baldrige, J.R., Yorgensen, Y., Ward, J.R. & Ulrich, J.T. (2000). Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine*, 18(22): 2416-2425.

Bilsborough, J. & Viney, J.L. (2004). Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology*, 127: 300-309.

Bonilla, L.P. & Ramírez, F.E. (2014). Amibas de vida libre patógenas y oportunistas. En Becerril, F.M.A. *Parasitología Médica* (pp. 37-50). México: McGRAW-HILL.

Bowman, C.C. & Clements, J.D. (2001). Differential Biological and Adjuvant Activities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Hybrids. *Infection and Immunity*, 69(3): 1528-1535.

Brandtzaeg, P. (2009). 'ABC' of mucosal immunology. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 64: 23-43.

Broetto, L., Beys Da Silva, W.O., Bailão, A.M., Soares, D.A.C., Vainstein, M.H. & Schrank, A. (2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesión. *FEMS Microbiology Letters*, 312(2): 101-109.

Cano, F., Plotnicky-Gilquin, H., Nguyen, T.N., Liljeqvist, S., Samuelson, P., Bonnefoy, J., Ståhl, S. & Robert, A. (2000). Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides. *Vaccine*, 18(24): 2743-2752.

Cano, F., Plotnicky-Gilquin, H., Nguyen, T.N., Liljeqvist, S., Samuelson, P., Bonnefoy, J., Ståhl, S. & Robert, A. (2000). Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides. *Vaccine*, 18(24): 2743-2752.

Carrasco-Yépez, M., Campos-Rodríguez, R., Godínez-Victoria, M., Rodríguez-Monroy, M.A., Jarillo-Luna, A., Bonilla-Lemus, P., De Oca, A.C. & Rojas-Hernández, S. (2013). *Naegleria fowleri* glycoconjugates with residues of α -D-mannose are involved in adherence of trophozoites to mouse nasal mucosa. *Parasitology Research*, 112(10): 3615-3625.

Carrasco-Yépez, M., Campos-Rodríguez, R., López-Reyes, I., Bonilla-Lemus, P., Rodríguez-Cortés, A.Y., Contis-Montes de Oca, A., Jarillo-Luna, A., Miliar-García, A. & Rojas-Hernández, S. (2014). Intranasal coadministration of Cholera toxin with amoeba lysates modulates the secretion of IgA and IgG antibodies, production of cytokines and expression of plgR in the nasal cavity of mice in the model of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Experimental Parasitology*, 145: 84-92.

Carrasco-Yépez, M., Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., Terrazas, L.I. & Moreno-Fierros, L. (2010). Protection against *Naegleria fowleri* infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response. *Parasite Immunology*, (9-10): 664-670.

Carter, R.F. (1972). Primary amoebic meningoencephalitis: An appraisal of present knowledge. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2): 193-208.

Cdc.gov. (2016). CDC - DPDx - Free Living Amebic Infections. [online] Available at: <http://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/> [Accessed 24 Mar. 2016].

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.J., Tapia-Malagón, J.L., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Tsutsumi, V. & Shibayama, M. (2007). Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico. *Revista de Investigación Clínica*, 59(5): 342-347.

Chen, W., Patel, G.B., Yan, H. & Zhang, J. (2010). Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 6(9). pii: 11561.

Clements, J.D., Hartzog, N.M. & Lyon, F.L. (1988). Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine*, 6(3): 269-277.

Contis, M. A. 2011. Correlación entre el número de inmunizaciones y la producción de anticuerpos con el porcentaje de protección en la meningitis producida por *Naegleria fowleri*. Tesis de Licenciatura (Ingeniero Bioquímico), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México. 40 p.

Culbertson, C.G., Ensminger, P.W. & Overton, W.M. (1968). Pathogenic *Naegleria* sp. Study of a Strain Isolated from Human Cerebrospinal Fluid. *The Journal of Protozoology*, 15: 353-363.

De Gregorio, E. & Rappuoli, R. (2014). From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 14(7): 505-514.

De Jonckheere, J.F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *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: 52-59.

Dirección General de Epidemiología. (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (Amibas de Vida Libre). *Secretaría de Salud* (49 pp). México: IEPSA.

Douce, G., Turcotte, C., Cropley, I., Roberts, M., Pizza, M., Domenghini, M., Rappuoli, R. & Dougan, G. (1995). Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5): 1644–1648.

Elson, C.O. (1989). Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 146: 29-33.

Elson, C.O. (1992). Cholera toxin as a mucosal adjuvant: effects of H-2 major histocompatibility complex and Igs genes. *Infection and Immunity*, 60(7): 2874-2879.

Finkelstein, R.A. & LoSpalluto, J.J. (1969). Pathogenesis of experimental cholera. Preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinoid. *The Journal of Experimental Medicine*, 130(1): 185-202.

FitzGerald, D. & Mersny, R.J. (2000). New Approaches to Antigen Delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 17(3): 165-248.

FitzGerald, D. & Mersny, R.J. (2000). New Approaches to Antigen Delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 17(3): 165-248.

Freund, J., Casals, J. & Hosmer, E.P. (1937). Sensitization and antibody formation after injection of *Tubercle bacilli* and paraffin oil. *Experimental Biology and Medicine*, 37(3): 509-513.

Freytag, L.C. & Clements, J.D. (2005). Mucosal adjuvants. *Vaccine* 23: 1804–1813.

Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7): 505-517.

Historyofvaccines.org, (2016). Different Types of Vaccines — History of Vaccines. [online] Available at: <http://www.historyofvaccines.org/content/articles/different-types-vaccines> [Accessed 2 Feb. 2016].

Holmgren, J. & Czerkinsky, C (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine Supplement*, 11(4): 45-53.

Holmgren, J. (1981). Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature*. 292 (5822): 413-417.

Holmgren, J., Adamsson, J., Anjuère, F., Clemens, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., Flach, C.F., George-Chandy, A., Harandi, A.M., Lebens, M., Lehner, T., Lindblad, M., Nygren, E., Raghavan, S., Sanchez, J., Stanford, M., Sun, J.B., Svennerholm, A.M. & Tengvall, S. (2005). Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunology Letters*, 97(2): 181-188.

- Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K. & Mharandi, A. (2003). Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*, 21(2): S89-S95.
- Holmgren, J., Lönnroth, I. & Svennerholm, L. (1973). Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipids. *Infection and Immunity*, 8(2): 208-214.
- Holmgren, J., Lycke, N. & Czerkinsky, C. (1993). Cholera toxin and cholera B subunit as oral—mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine*, 11(12): 1179-1184.
- Hu, S.P., Zhou, Y., Zhang, L., Zhu, X.D., Li, L., Luo, L.J., Liu, G.L. & Zhou, Q.M. (2009). Correlation and quantitative trait loci analyses of total chlorophyll content and photosynthetic rate of rice (*Oryza sativa*) under water stress and well-watered conditions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(9): 879-888.
- Ilhuicatzí, A.D. (2015). Identificación de receptores de la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en monocitos murinos. Tesis de Maestría (Ciencias Biológicas), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. 76 p.
- Iwasaki, A. & Kelsall, B.L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 190: 229-239.
- Jabbal-Gill, I., Fisher, A.N., Rappuoli, R., Davis, S.S. & Illum, L. (1998). Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine*, 16(20): 2039-2046.
- Jarillo-Luna, A., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., Rodríguez-Monroy, M.A., Lara-Padilla, E. & Rojas-Hernández S. (2008). Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunology*, 30(1): 31-88.
- Jeong, S.R., Kang, S.Y., Lee, S.C., Song, K.J., Im, K.I. & Shin, H.J. (2004). Decreasing effect of an anti-Nfa1 polyclonal antibody on the in vitro cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *The Korean Journal of Parasitology*, 42(1): 35-40.
- Johansson, E.L., Bergquist, C., Edebo, A., Johansson, C. & Svennerholm, A.M. (2004). Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. *Vaccine*, 22(8): 984-990.
- Johansson, E.L., Wassén, L., Holmgren, J., Jertborn, M. & Rudin, A. (2001). Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infection and Immunity*, 69(12): 7481-7486.
- Jong-Hyun, K., Ae-Hee, Y., Hae-Jin, S., Daesik, K., Kyoung-Ju, S. & Ho-Joon, S. (2009). Immunodominant antigens in *Naegleria fowleri* excretory–secretory proteins were potential pathogenic factors. *Parasitology Research*, 105: 1675-1681.

- Kalambaheti, T., Chaisri, U., Srimanote, P., Pongponratn, E. & Chaicumpa, W. (1998). Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. *Vaccine*, 16(2-3): 201-207.
- Kawai, K., Liu, Y., Ohnishi, K. & Oshima, S. (2004). A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine*, 22(25-26):3411-3418.
- Kim, J.H., Lee, S.H., Sohn, H.J., Lee, J., Chwae, Y.J., Park, S., Kim, K. & Shin, H.J. (2012). The immune response induced by DNA vaccine expressing nfa1 gene against *Naegleria fowleri*. *Parasitology Research*, 111(6): 2377-2384.
- Kim, J.H., Sohn, H.J., Lee, J., Yang, H.J., Chwae, Y.J., Kim, K., Park, S. & Shin, H.J. (2013). Vaccination with lentiviral vector expressing the nfa1 gene confers a protective immune response to mice infected with *Naegleria fowleri*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(7): 1055-1060.
- 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(6): 1675-1681.
- Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., Watanabe, M., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A. & Saito, T. (2008). Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6): 1667-1674.
- Kozlowski, P.A., Williams, S.B., Lynch, R.M., Flanigan, T.P., Patterson, R.R., Cu-Uvin, S. & Neutra, M.R. (2002). Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *The Journal of Immunology*, 169(1): 566-574.
- Lares-Villa, F. (2001). Free-living amoebae Infections in Mexico. En Billot-Bonef, S., Cabanes, P.A., Marciano-Cabral, F., Pernin, P. & Pringuez, E. (Eds.) *IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings* (pp. 13-18). Paris: John Libbey Eurotext.
- Lau, S.K., Tse, H., Chan, J.S., Zhou, A.C., Curreem, S.O., Lau, C.C., Yuen, K.Y. & Woo, P.C. (2013). Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffe* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for conidial attachment. *FEBS Journal*, 280(24): 6613-6626.
- Lencer, W.I., Constable, C., Moe, S., Jobling, M.G., Webb, H.M., Ruston, S., Madara, J.L., Hirst, T.R. & Holmes, R.K. (1995). Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *The Journal of Cell Biology*, 131(4): 951-962.
- Lycke, N., Tsuji, T. & Holmgren, J. (1992). The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *European Journal of Immunology*, 22(9): 2277-2281.

- Marciani, D.J. (2003). Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today*, 8(20): 934–943.
- Marciano-Cabral, F. (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Reviews*, 52(1): 114-133.
- Martínez, A.J. & Visvesvara, G.S. (1997). Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology*, 7: 583-598.
- Martínez, A.J. (1985). *Free-living amoebas; natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease*. Boca Ratón, FL: Ccr Press, 156 pp.
- Martínez, J.A. (2001). Free-living amebas and the immune deficient host. En Billot-Bonef, S., Cabanes, P.A., Marciano-Cabral, F., Pernin, P. & Pringuez, E. (Eds.) *IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings* (pp. 1-12). Paris: John Libbey Eurotext.
- Marx, P.A., Compans, R.W., Gettie, A., Staas, J.K., Gilley, R.M., Mulligan, M.J., Yamshchikov, G.V., Chen, D. & Eldridge, J.H. (1993). Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science*, 260(5112): 1323-1327.
- Matsuo, K., Yoshikawa, T., Asanuma, H., Iwasaki, T., Hagiwara, Y., Chen, Z., Kadowaki, S.E., Tsujimoto, H., Kurata, T. & Tamura, S.I. (2000). Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine*, 18(24): 2713-2722.
- Matsuo, K., Yoshikawa, T., Asanuma, H., Iwasaki, T., Hagiwara, Y., Chen, Z., Kadowaki, S.E., Tsujimoto, H., Kurata, T. & Tamura, S.I. (2000). Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine*, 18(24): 2713-2722.
- McElrath, M.J. (1995). Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Seminars in Cancer Biology*, 6(6): 375–385.
- McGhee, J.R., Kiyono, H., Kubota, M., Kawabata, S., Miller, C.J., Lehner, T., Imaoka, K. & Fujihashi, K. (1999). Mucosal Th1- versus Th2-type responses for antibody- or cell-mediated immunity to simian immunodeficiency virus in rhesus macaques. *The Journal of Infectious Diseases*, 179 (Suppl 3): S480-S484.
- Mestecky, J, Lamm, M.E., McGhee, J.R., Bienenstock, J., Mayer, L. & Strober, W. (2005). *Mucosal Immunology*. Elsevier.
- Mosmann, T.R. & Moore, K.W. (1991). The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunology Today*, 12(3): A49-A53.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3: 331-341.
- Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J. & McGhee, J.R. (1999). *Mucosal immunology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press.
- Page, F.C. (1988). A new key to freshwater and soil gymnamoebae. *Culture Collection of Algae and Protozoa*. Cumbria.

- Pancholi, V. & Chhatwal, G.S. (2003). Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(6): 391-401.
- Powell, E.L., Newsome, A.L., Allen, S.D. & Knudson, G.B. (1994). Identification of antigens of pathogenic free-living amoebae by protein immunoblotting with rabbit immune and human sera. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(5): 493-499.
- Robertson, J. & Griffiths, E. (1998). WHO guidelines for assuring the quality of DNA vaccines. *Biologicals*, 26(3): 205-212.
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., López-Revilla, R, Reséndiz-Albor, A.A. & Moreno-Fierros, L. (2004a). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infection and Immunity*, 72(8): 4368-4375.
- Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L. & Campos-Rodríguez, R. (2004b). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitology Research*, 94(1): 31-36.
- Romagnani, S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunology Today*, 12(8): 256-257.
- Sánchez, J. & Holmgren, J. (2011). Cholera toxin – A foe & a friend. *Indian Journal of Medical Research*, 133: 153-163.
- Santiago, B.M., Nair, B.S., Ferrari, A.P., De Faria, P.F., Sueli, S.M., Dos Santos, F.F.L., Mendes-Giannini, S.M.J. & De Almeida, S.C.M. (2006). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. *Infection and Immunity*, 74(1): 382-389.
- Schijns, V.E. (2001). Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Critical Reviews in Immunology*, 21(1-3): 75-85.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9): 1001–1027.
- Seelert, H. & Krause, F. (2008). Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 29(12): 2617-2636.
- Seidler, N.W. (2012). GAPDH, as a Virulence Factor. En Seidler, N.W. *GAPDH: Biological Properties and Diversity*. (pp. 149-178). London: Springer.
- Shibayama, M., Serrano-Luna, J.de J., Rojas-Hernández, S., Campos-Rodríguez, R. & Tsutsumi, V. (2003). Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(3): 164-170.

- Shin, H.J., Cho, M.S., Jung, S.U., Kim, H.I., Park, S., Kim, H.J. & Im, K.I. (2001). Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(6): 713-717.
- Sirover, M.A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1432(2): 159-184.
- Staats, H.F., Montgomery, S.P. & Palker, T.J. (1997). Intranasal immunization is superior to vaginal, gastric, or rectal immunization for the induction of systemic and mucosal anti-HIV antibody responses. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13(11): 945-952.
- Staats, H.F., Montgomery, S.P. & Palker, T.J. (1997). Intranasal immunization is superior to vaginal, gastric, or rectal immunization for the induction of systemic and mucosal anti-HIV antibody responses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 13(11): 945-952.
- Stuart-Harris, C.H. (1969). Adjuvant influenza vaccines. *Bulletin of the World Health Organization*, 41(3): 617-621.
- Tallima, H., Montash, M., Veprek, P., Velek, J., Jezek, J. & El Ridi, R. (2003). Differences in immunogenicity and vaccine potential of peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Vaccine*, 21(23): 3290-3300.
- Trimaille, T. & Verrier, B. (2015). Micelle-Based Adjuvants for Subunit Vaccine Delivery. *Vaccines*, 3(4): 803–813.
- Tunio, S.A., Oldfield, N.J., Ala'Aldeen, D.A., Wooldridge, K.G. & Turner, D.P. (2010). The role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GapA-1) in *Neisseria meningitidis* adherence to human cells. *BMC Microbiology*, 10: 280.
- Vaccines.gov, (2016). Types of Vaccines | Vaccines.gov. [online] Available at: http://www.vaccines.gov/more_info/types/ [Accessed 2 Feb. 2016].
- Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A.V., Vásquez-Morales, J.A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J.F., Lares-Villa, F. (2005). Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Archives of Medical Research*, 36(1): 83-86.
- Visvesvara, G.S. & Balamuth, W. (1975). Comparative Studies on Related Free-Living and Pathogenic Amebae With Special Reference to *Acanthamoeba*. *The Journal of Protozoology*, 22(2): 245–256.
- Visvesvara, G.S. & Maguire, J.H. (2006). Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. En Guerrant, R.L., Walker, D.H. & Weller, P.F. (Eds.) *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice* (pp. 1114–1125). Philadelphia: Elsevier.
- Visvesvara, G.S. (2013). Infections with free-living amebae. En García, H.H., Tanowitz, H.B. & Del Brutto, O.H. (Eds.) *Neuroparasitology and Tropical Neurology* (pp. 153-168). Elsevier.

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

Vogel, F.R. (1998). Adjuvants in Perspective. En Brown, F. & Haaheim, L.R. (Eds). *Modulation of the Immune Response to Vaccine Antigens*. Dev. Biol. Stand, Vol. 92. (pp. 241–248). Basel: Karger.

Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S. & McGhee, J.R. (1993). Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(4):1309-1320.

Yamamoto, M., Vancott, J.L., Okahashi, N., Marinaro, M., Kiyono, H., Fujihashi, K., Jackson, R.J., Chatfield, S.N., Bluethmann, H. & McGhee, J.R. (1996). The role of Th1 and Th2 cells for mucosal IgA responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 778: 64-71.

Zhang, Q.B., Sun, H.C., Zhang, K.Z., Jia, Q.A., BU, Y., Wang, M., Chai, Z.T., Zhang, Q.B., Wang, W.Q., Kong, L.Q., Zhu, X.D., Lu, L., Wu, W.Z., Wang, L. & Tang, Z.Y. (2013). Suppression of natural killer cells by sorafenib contributes to prometastatic effects in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 8(2): 1-11 e55945.