

# ***Naegleria fowleri* induce la expresión de MUC5AC en células epiteliales humanas NCI-H292**

**Isaac Cervantes-Sandoval<sup>1</sup>, Juana Narváez-Morales<sup>2</sup>, José de Jesús Serrano-Luna<sup>3</sup>, Víctor Tsutsumi<sup>1</sup>, Mineko Shibayama<sup>1</sup>**

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular<sup>1</sup>, Departamento de Biomedicina Molecular<sup>2</sup>, y Departamento de Biología Celular<sup>3</sup>, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

Introducción. *Naegleria fowleri* es un ameboflagelado de vida libre capaz de producir una infección al sistema nervioso central conocida como meningoencefalitis amibiana primaria (MAP). Esta enfermedad se caracteriza por ser una meningoencefalitis aguda y fulminante. Mediante el uso de modelos animales, se ha determinado que el parásito invade al huésped penetrando la mucosa olfatoria, migrando por los nervios olfatorios a través de la placa cribosa hasta alojarse en los bulbos olfatorios [1]. Una vez en el parénquima cerebral, la amiba prolifera importantemente e induce una fuerte reacción inflamatoria, cuya lisis juega un papel importante en la destrucción del tejido [2]. Por otro lado en los primeros tiempos de interacción, las amibas se localizan en la luz de la cavidad nasal embebidas en el moco y cercana a las zonas del neuroepitelio olfatorio. La producción de moco, es la primera respuesta del huésped ante la presencia del patógeno y representa un componente de defensa de las respuestas innatas. Su principal componente son las mucinas y la principal función es generar una barrera entre el medio externo y el epitelio. El gen *muc5ac* es el principal responsable de la secreción de mucinas en la mucosa respiratoria de humanos y ratones. En el presente trabajo se determinó, utilizando microscopía confocal, y ensayos de expresión de RNA mensajero, la capacidad de *N. fowleri* para inducir la expresión de MUC5AC en células humanas productoras de moco (NCI-H292). Así mismo, se determinó la presencia de mucinas amibianas como posible mecanismo de evasión a esta respuesta.

Material y métodos. Células NCI-H292, utilizadas ampliamente como un modelo en la producción de MUC5AC [3], fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con SFB al 10%. Al alcanzar la confluencia, las células fueron interaccionadas con trofozoítos de *N. fowleri* en una proporción 1:1 durante diferentes periodos de tiempo. Un grupo de células fueron procesadas para extracción de RNA total y se realizó RT-PCR para evaluar los niveles de expresión del gen *muc5ac*; el gen constitutivo *gapdh* fue utilizado como control interno. Otro grupo de células fueron fijadas después de la interacción y se realizó una inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo específico para MUC5AC y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. En todos los ensayos se utilizó LPS (1mg/mL) como control positivo de expresión de mucinas. Finalmente se determinó la presencia de actividad mucinolítica en extractos totales de *N. fowleri* por medio de electroforesis en geles de acrilamida copolimerizados con 0.1% de mucina como sustrato.

Los resultados mostraron que trofozoítos de *N. fowleri* son capaces de inducir la diferenciación y expresión de la mucina MUC5AC a partir de 1 h de interacción, comparado con el control. Esta expresión se ve ligeramente aumentada hasta las seis horas (Figura 1). El nivel máximo de expresión observada es comparable con la que se obtiene utilizando LPS el cual se sabe induce una fuerte expresión de esta mucina (Figura 1). Por otro lado, se

determinó la presencia de actividad mucinolítica en trofozoítos vivos y extractos crudos de *N. fowleri* utilizando mucina submaxilar bovina y mucina estomacal porcina (Figura 2). Finalmente se identificó una proteína de 37 kDa con actividad mucinolítica y que es inhibida con p-HMB, un inhibidor específico de cisteín proteasas (Figura 3). En conclusión, en el presente trabajo se demostró que los trofozoítos de *N. fowleri* son capaces de inducir la expresión del gen y la proteína de MUC5AC que es una molécula que participa en la inmunidad innata. Por otro lado, los trofozoítos cuentan con mecanismos proteolíticos, específicamente cisteín proteasas, que le permiten degradar las mucinas abatiendo sus propiedades protectoras y de esta manera evadir las barreras innatas e invadir el epitelio de la mucosa olfatoria.

#### Bibliografía

- [1] Jarolim K. L., et al. Journal of Parasitology, 86(2000)50-55.
- [2] Cervantes-Sandoval I, et al. Parasitology International, 57(2008) 307-313.
- [3] Shao M. X. G., et al. PNAS, 100(2003)11618-11623

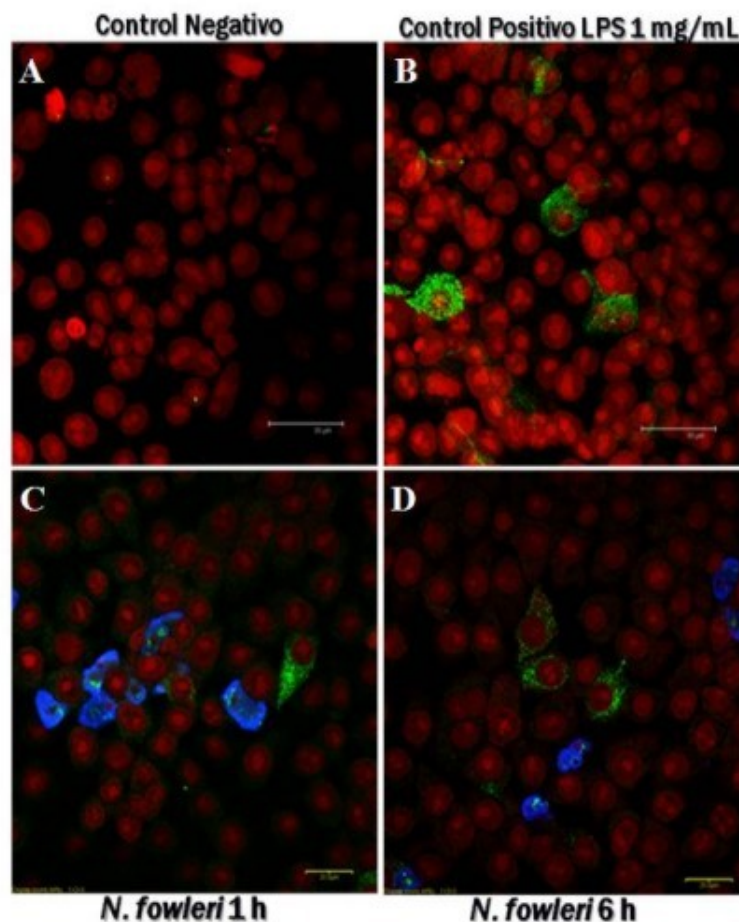


Figura 1. Microscopía confocal de células humanas productoras de MUC5AC (NCI-H292). Inmunocitoquímica para la detección de la proteína MUC5AC con FITC (Verde), trofozoítos de *N. fowleri* con Cy5 (Azul) y núcleos con yoduro de propidio (Rojo). A) Control negativo, células incubadas por 24 h en medio de cultivo sin suero. B) Control positivo, células estimuladas con LPS durante 24 h. C) Células incubadas con *N. fowleri* por 1 h. D) Células incubadas con *N. fowleri* durante 6 h.

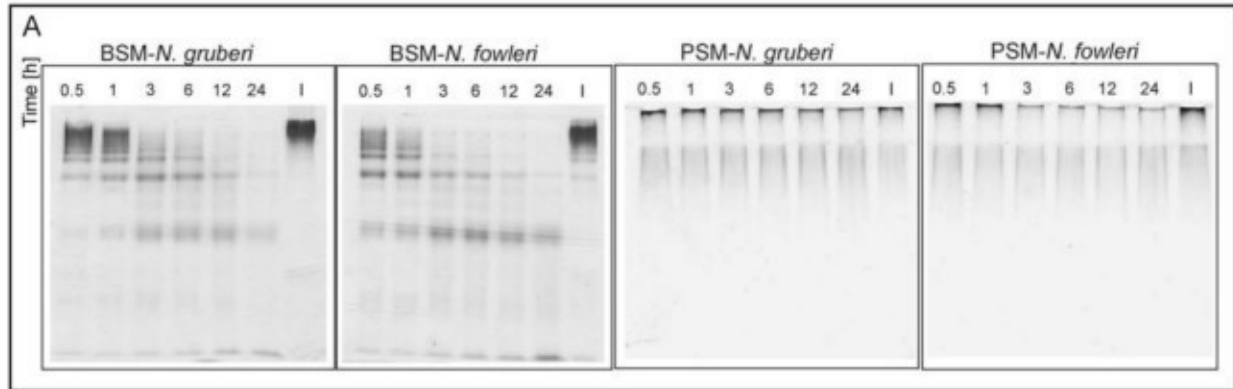


Figura 2. Determinación de actividad mucinolítica en trofozoitos de *N. fowleri* y *N. gruberi*. Extractos crudos de ambas cepas fueron incubados por diferentes periodos de tiempo con una solución de 2 mg/mL de mucina submaxilar bovina (BSM) o mucina estomacal porcina (PSM), posteriormente diferentes muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 7.5% y teñidas con reactivo de Schiff. Los últimos carriles de cada gel muestran la incubación de los extractos con la mucina por 24 h en la presencia de un inhibidor de cisteín proteasas (pHMB 10mM).

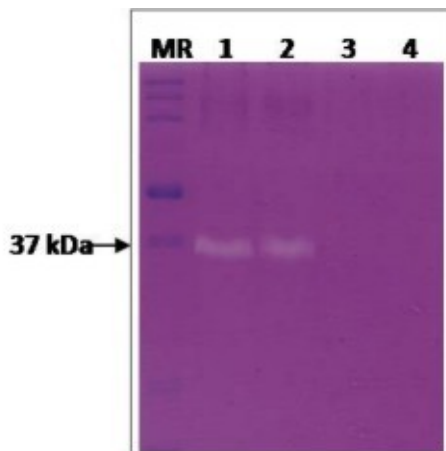


Figura 3. Determinación de proteasas con actividad mucinolítica en extractos de *N. fowleri* y *N. gruberi*. Extractos crudos de ambas cepas fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con BSM como sustrato. Posteriormente los geles fueron incubados toda la noche en un amortiguador de activación y finalmente teñidos con reactivo de Schiff. Carril 1, Extracto de *N. fowleri*. Carril 2, Extracto de *N. gruberi*. Carril 3, Extracto de *N. fowleri* preincubado con pHMB 10mM. Carril 4, Extracto de *N. gruberi* preincubado con pHMB 10mM.