



MODELO TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS NfCPB y NfCPB-L de
Naegleria fowleri

LEIDY GABRIELA CASTILLO VEGA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C, 2019



MODELO TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS NfCPB y NfCPB-L de
Naegleria fowleri

MARTHA LUCIA POSADA BUITRAGO Ph.D

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Asesora Interna

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTÁ D.C, 2019

DEDICATORIA.

Este trabajo va dedicado a mis padres, ya que sin ellos este sueño no hubiese sido posible, han sido un faro de luz, de amor, de comprensión, y de apoyo incondicional; los amo muchísimo, no me alcanzaría la vida para repetirles y demostrarles todo el amor que les tengo. A ti papito, por aguantar mi genio y siempre estar dispuesto a escucharme, aun cuando de estas cosas no entiendas nada, porque nunca me dejaste caer aun cuando tuviste los motivos para hacerlo, y porque sin duda alguna eres el mejor padre del mundo y eres mi más grande amor, porque me diste las palabras precisas en el momento adecuado, admiro mucho tu forma de luchar contra todo para poder ayudarme con esta aventura.

A todos los dioses, por ser un apoyo espiritual en los momentos de tristeza, por darme fortaleza y tranquilidad en momentos de afán. Por ser fuentes de vida y por darme sabiduría para llevar a cabo esta tarea.

Al amor de mi vida, Nicolás Chavez, por ser hermano, primo, familia, mi bastón de apoyo y mi confidente, realmente hice algo muy bueno para merecer que me acompañes día a día, este es el primer logro de muchos juntos; te amo muchísimo.

A mi profe, Martha Posada... Profe, que honor haber podido trabajar con usted, todo esto es por y gracias a usted, por confiar en mí, por ser más que una asesora, una compañera, una guía, una consejera, eres una gran persona, el cariño que le tengo es gigante.

AGRADECIMIENTOS.

Le agradezco a todos y cada uno, que de cierta manera contribuyeron en este trabajo, a todos los que aportaron un granito de arena para mi aprendizaje.

A Tata, Lucesita, Ginn, y Laurita gracias mil por todos los momentos que pasamos juntas, de todas aprendí algo, compartir con ustedes esta experiencia y forjar una tan buena amistad me hace pensar que mi tiempo en la universidad, aunque lleno de baches, fue el mejor del mundo.

A Richie, gracias, por enseñarme el valor del tiempo y del compromiso, por escucharme, por acompañarme en momentos difíciles.

A los profes, William Méndez, Gladys Pinilla, Esperanza Vélez, y Vilma Gutiérrez, por haber estado conmigo y apoyarme en momentos en los que simplemente quería correr y dejar todo abandonado, por acompañarme en momentos en los que me sentía sola, ustedes hicieron que la parte más difícil de mi paso por la universidad fuese un poco más llevadera.

A Vane, Lu y James, son los mejores amigos que puedo tener en mi vida, gracias por cada risa, por cada lagrima que secaron, por cada derrota compartida y por cada aprendizaje ganado; mi vida no es lo mismo sin ustedes. Alberto, eres mi mejor amigo, amé cada momento compartido contigo, cada sueño, cada meta que nos propusimos se hizo realidad, siempre uno al lado del otro, **VIELEN DANK MEIN LIBER BRUDER! LIEBE GRÜßE**. A Mauricio, por todo lo compartido, por el apoyo incondicional, y por las alegrías de nuestros triunfos.

Y, por último, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por ser el transporte para alcanzar mis sueños.

TABLA DE CONTENIDOS

	PAG
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. General.....	15
2.2. Específicos.....	15
3. ANTECEDENTES.....	16
4. MARCO DE REFERENCIA.....	18
4.1. Origen.....	18
4.2. Etiología y Morfología.....	18
4.3. Taxonomía.....	19
4.4. Transmisión.....	20
4.5. Patogenia.....	21
4.5.1. Mecanismos dependientes de contacto.....	22
4.5.2. Mecanismos independientes de contacto.....	23
4.6. Inmunología.....	24
4.6.1. Evasión Inmune.....	24
4.6.2. Inmunización.....	25
4.7. Meningoencefalitis amebiana primaria (PAM).....	26
4.8. Epidemiología.....	27

4.9. Diagnóstico.....	28
4.10. Tratamiento.....	29
4.11. Proteínas NfCPB y NfCPB-L.....	29
4.12. Bioinformática.....	32
4.13. Predicción estructural de proteínas.....	33
4.13.1. Predicción de la estructura secundaria de proteínas.....	34
4.13.2. Predicción de la estructura terciaria de proteínas (I-TASSER)	34
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	36
5.1. Tipo de investigación.....	36
5.2. Hipótesis.....	36
6. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	37
6.1. Herramientas para la búsqueda de similitud y homología de secuencias.....	37
6.2. Herramientas para el análisis de estructura primaria.....	37
6.3. Herramientas para el análisis de estructura secundaria.....	37
6.4. Herramientas para el análisis de estructura terciaria.....	38
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Alineamiento de secuencias NfCPB y NfCPB-L de <i>Naegleria fowleri</i> con Clustal Omega.....	40
7.2. Análisis de la estructura primaria de NfCPB y NfCPB-L.....	41
7.3 Determinación de la estructura secundaria de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de <i>Naegleria fowleri</i>	48

7.4	Determinación de la estructura tridimensional de las proteínas	
	NfCPB y NfCPB-L de <i>Naegleria fowleri</i>	51
8.	DISCUSIÓN	64
9.	CONCLUSIONES.....	75
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	77

INDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i>	21
Figura 2. Secuencia de aminoácidos de las proteínas NfCPB y NfCPB-L.....	31
Figura 3. Clustal Omega entre las secuencias NfCPB y NfCPB-L.....	40
Figura 4. Índice de hidrofobicidad de las proteínas NfCPB y NfCPB-L.....	44
Figura 5. Consenso de los nueve programas usados para la identificación de hélices transmembranales en las proteínas NfCPB y NfCPB- de <i>Naegleria fowleri</i>	45
Figura 6. Análisis de las proteínas NfCPB y NfCPB-L.....	46
Figura 7. Patrones determinados por PROSITE para las proteínas NfCPB y NfCPB-L de <i>Naegleria fowleri</i>	47
Figura 8. Consenso de la estructura secundaria de la proteína NfCPB de <i>Naegleria fowleri</i>	49
Figura 9. Consenso de la estructura secundaria de la proteína NfCPB de <i>Naegleria fowleri</i>	50
Figura 10. Estructura secundaria de la proteína NfCPB de <i>Naegleria Fowleri</i> generada por PSSpred del servidor I-TASSER.....	52
Figura 11. Estructura secundaria de la proteína NfCPB-L de <i>Naegleria Fowleri</i> generada por PSSpred del servidor I-TASSER.....	52
Figura 12. Predicción del factor normalizado de las proteínas NfCPB y NfCPB-L.....	53
Figura 13. Listado de las diez mejores alineaciones realizadas por LOMETS Para las proteínas NfCPB y NfCPB-L.....	55
Figura 14. Predicción del modelo tridimensional de la proteína NfCPB de <i>Naegleria fowleri</i> generado por I-TASSER y visualizado por Swiss	

PDB.....	57
Figura 15. Predicción del modelo tridimensional de la proteína NfCPB-L de <i>Naegleria fowleri</i> generado por I-TASSER y visualizado por Swiss PDB.....	58
Figura 16. Modelo tridimensional del sitio de unión al ligando de la proteína NfCPB de <i>Naegleria fowleri</i> generado por I-TASSER.....	59
Figura 17. Modelo tridimensional del sitio de unión al ligando de la proteína NfCPB-L de <i>Naegleria fowleri</i> generado por I-TASSER.....	60
Figura 18. Conformación estereoquímica de los ángulos del modelo de la Proteína NfCPB de <i>Naegleria fowleri</i> según la gráfica de Ramachandran.....	62
Figura 19. Conformación estereoquímica de los ángulos del modelo de la Proteína NfCPB-L de <i>Naegleria fowleri</i> según la gráfica de Ramachandran.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas.....	41
Tabla 2. Composición porcentual de aminoácidos de la proteína NfCPB.....	42
Tabla 3. Composición porcentual de aminoácidos de la proteína NfCPB-L.....	43
Tabla 4. Patrones determinados por PROSITE para las proteínas NfCPB y NfCPB-L de <i>Nagleria fowleri</i>	48

RESUMEN

La meningoencefalitis amebiana primaria (PAM) es una enfermedad de amplia distribución a nivel mundial, con un porcentaje mayor de casos en climas tropicales. PAM es causada por una ameba de vida libre del género *Naegleria*, de la cual han descrito 47 especies¹, dos de estas especies son agentes causales de enfermedades en animales experimentales; mientras que solo una especie, *Naegleria fowleri*, es patógeno en los humanos. No existe un mecanismo de control para *Naegleria fowleri*, ya que se considera como una enfermedad poco frecuente.

El análisis de proteínas actualmente se ha convertido en un principio fundamental para el estudio de posibles blancos terapéuticos que permitan la realización de vacunas que tengan un amplio rango de inmunización, y el conocimiento de las funciones de las proteínas. En el caso de *Naegleria fowleri* se han identificado factores de patogenicidad como las proteínas Catepsina B (NfCPB) y Catepsina B-L (NfCPB-L), primordiales en actividades proteolíticas sobre las Inmunoglobulinas, fibronectina, hemoglobina y albúmina, reconocimiento y anclaje celular.¹³

El objetivo de esta investigación fue proponer mediante el análisis bioinformático la estructura tridimensional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* logrando así inferir las regiones funcionales asociadas importantes para su antigenicidad e inmunogenicidad. Para el análisis de la estructura primaria se determinaron las propiedades fisicoquímicas, el índice de hidrofobicidad y las regiones transmembranales. Para la estructura secundaria, se realizó un consenso

con seis algoritmos disponibles en el servidor NSP@. La aproximación de la estructura terciaria de la proteína se realizó por el programa I-TASSER y el modelamiento tridimensional se visualizó a través del servidor Swiss-Pdb Viewer 4.1.0, la validación del modelo se llevó a cabo por la gráfica de Ramachandran basándose en la distribución de ángulos de los aminoácidos que componen el modelo obtenido.

Como resultado final de la investigación se obtuvieron dos modelos 3D consistentes, y una aproximación a la función de las proteínas NfCPB y NfCPB-L.

Palabras clave: bioinformática, proteína NfCPB, proteína NfCPB-L, *Naegleria fowleri*, Catepsina

Estudiante: Gabriela Castillo Vega

Asesora: Martha Lucía Posada Buitrago Ph.D - Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Fecha: noviembre 2018

1. INTRODUCCIÓN

La Meningoencefalitis amebiana primaria (PAM) es una enfermedad de distribución cosmopolita causada por la ameba de vida libre *Naegleria fowleri*. A nivel mundial se han reportado más de 300 casos en países tales como Estados Unidos, Pakistán, Australia, centro y sur América². Aunque PAM es una enfermedad rara, su curso usualmente es fatal. Según la organización mundial de la salud (WHO) al 2017, las meningitis agudas son un problema de salud pública a la cual se le atribuyen 241.000 muertes anuales a nivel mundial.

En Estados Unidos, de los 143 casos de PAM diagnosticados de 1968 a 2016, solo cuatro mostraron total mejoría, y en uno de los casos fatales el paciente fue diagnosticado con meningitis bacteriana; estas infecciones se dieron en estados del sur³. En Colombia se han reportado 5 casos de PAM, de los cuales todos fueron fatales; en dos de los casos, se inició tratamiento como si fuera una meningitis bacteriana, después de varios análisis se demostró la presencia de trofozoitos en LCR cambiando el tratamiento a anfotericina B.

Investigadores informan que el diagnóstico de meningitis amebiana pocas veces es acertado, ya que los trofozoitos son generalmente destruidos en el procedimiento de fijación para la tinción de Gram⁴, y el acceso a técnicas moleculares en toda Colombia es muy limitado; dejando así posibles casos de PAM sub-diagnosticados.

Las proteínas de membrana de *N.fowleri* son los factores de patogenicidad más importantes en el momento de la invasión e infección^{4,5}, estudios han sugerido que las proteínas Catepsina B y Catepsina B-L(NfCPB y NfCPB-L) tienen un papel primordial en actividades proteolíticas sobre las Inmunoglobulinas, fibronectina, hemoglobina y albúmina¹³.

El análisis bioinformático de proteínas se ha convertido en una herramienta muy útil ya que los métodos convencionales de aislamiento y purificación tienen un alto costo y en muchos casos son de alta complejidad; sin contar que no todos los microorganismos son de fácil cultivo, *Naegleria fowleri* es una ameba exigente, requiere de condiciones estrictas para un aislamiento exitoso sin contaminación.

En la actualidad no hay descripciones en cuanto al modelo tridimensional de las proteínas de membrana de *N.fowleri*, ya que se considera como un parásito poco frecuente. Esta investigación permitió realizar los modelos tridimensionales de las proteínas NfCPB y NfCPB-L, con el fin de analizar sus características funcionales y estructurales, y a largo plazo pretende ser un apoyo para estudios de tales proteínas con el fin de realizar un fármaco que permita la resolución total de PAM.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Proponer un diseño tridimensional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L presentes en la membrana de *Naegleria fowleri*.

2.2. Específicos

1. Analizar las proteínas NfCPB y NfCPB-L codificada en el genoma de *Naegleria fowleri*, mediante herramientas tales como SAPS, ProtParam, ProtScale, TMPRED, PFAM.
2. Identificar los dominios funcionales presentes en la estructura de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*.
3. Predecir la estructura terciaria de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* por medio de las herramientas I-TASSER y Swiss-Pdb Viewer 4.1.0

3. ANTECEDENTES

Las proteínas de membrana juegan un papel fundamental en la patogénesis de *N.fowleri*; La adherencia a las células huésped juega un papel crucial en la invasión de este, determinando la efectividad de la infección.

Estudios han demostrado que las proteínas de la familia de las cisteinproteasas, NfCPB y NfCPB de 38.42 KDa y 34 KDa respectivamente son fundamentales en la patogenia de *N.fowleri*⁶. NfCPB y NfCPB-L juegan un papel primordial en la evasión inmunológica y la supervivencia intracelular, así como en el reconocimiento e invasión celular.¹⁴

En 1986 se empieza a describir la acción “hemoglobinasas” de una proteína de aproximadamente 32KDa por medio de la regurgitación directa del intestino de *Schistosoma mansoni*, dicha investigación demostró que la actividad de la hemoglobinasas era proporcional a la cantidad de proteínas consumidas por el parásito³⁶. El mismo año, Keene y colaboradores³² purificaron dos proteínas de origen catepsina en *Entamoeba histolytica*, logrando identificar tres acciones primordiales de las catepsina B y catepsina B-Like, la primera fue la capacidad de degradar péptidos, la segunda fue la habilidad de evadir la acción de los inhibidores de proteinasas, y la tercera fue el descubrimiento del efecto citopático de las catepsinas sobre las células usadas en el cultivo de *E.histolytica*.

Se reportó en el 2015³³ la presencia de una proteína en *Angiostrongylus cantonensis* capaz de degradar las proteínas del complejo de membrana del retículo endoplasmático (ECM), también se demostró su capacidad de daño y afectación en la integridad de las células epiteliales intestinales del huésped.

En 2014, Lee J y colaboradores¹⁴ obtuvieron la secuencia completa de las cisteinproteasas Catepsina B y Catepsina B-Like, junto a sus propiedades bioquímicas; por medio de RT-PCR se obtuvo la secuencia de cDNA de los genes cisteinproteasas *nfCPB* y *nfCPB-L*, demostrando que el ORF consistía de secuencias de 1.038 y 939 pb respectivamente. A su vez, por medio de una RT-PCR semicuantitativa se demostró que estas proteínas se expresan únicamente en los trofozoitos de *Naegleria fowleri*. Para confirmar la actividad proteolítica, se usó un ensayo enzimático convencional, usando sustratos fluorogénicos de péptidos; dando en todos los ensayos positivos en rangos de pH de 4.5 a 6.5.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1. Origen

La meningoencefalitis amebiana primaria (PAM) es una enfermedad aguda causada por la ameba de vida libre *Naegleria fowleri*. El primer caso de PAM se dio en Australia y fue descrito por Fowler y Carter en 1965¹⁰; un año después, en Estados Unidos se presentaron tres casos fatales de PAM, los cuales fueron descritos por Butt¹¹, mostrando una gran similitud de los síntomas presentados por los pacientes de Estados Unidos y Australia analizando así la importancia clínica de la enfermedad y sus características sintomáticas.

4.2 Etiología y Morfología

Naegleria es un género de amebas de vida libre de distribución cosmopolita; se han descrito más de 47 especies, pero solo una es patógena para los humanos, *Naegleria fowleri*.¹

Naegleria fowleri es una ameba flagelada, presente en aguas de piscinas, estanques, aguas de riego, lagunas, termales y lagos¹², esta ameba de vida libre mide entre 10 a 20 μm en fase de trofozoíto, y entre 15 a 35 μm en fase quística. Crece en óptimas condiciones a temperaturas entre 20°C y 37°C y se enquista a temperaturas entre 5 a 10°C¹⁷; crece bien en medios enriquecidos con suero bovino, y se han usado los medios PYNFH (*Peptone Yeast Folic Acid Haemin*), Nelson y PYG (*Peptone Yeast Glucose*) para su cultivo invitro.¹³

Al ser *N. fowleri* una ameba de vida libre, se ha demostrado que esta cambia su fenotipo dependiendo de las condiciones en las que se encuentre¹⁵, mostrando así tres estadios; si está en un ambiente donde los nutrientes no escasean, *Naegleria* entra en un estado de trofozoítos con una alta reproducción por fisión binaria, los trofozoítos son su estadio infectante; si *Naegleria* no tiene nutrientes, pero si está en agua, entra en una forma de ameba flagelada permitiendo la movilidad para la búsqueda de condiciones óptimas para volver al estado de trofozoíto, no hay reproducción y tampoco enquistamiento; si *Naegleria* se ve privada de nutrientes y de agua, se enquista. Se sabe que el único estadio que se reproduce, adquiere nutrientes y se enquista es el trofozoíto.

Su gran variedad de proteínas de membrana le confiere a *N. fowleri* una gran variedad antigénica, así como factores de virulencia, tráfico vesicular, e interacciones con las células que van a infectar; entre las proteínas de membrana podemos encontrar: Fosfolipasa A, neuraminidasa, elastasa, NfCPB y NfCPB-L.¹⁶

4.3 Taxonomía

Las amebas de vida libre son ampliamente reconocidas por ser entidades termofílica propias de aguas templadas y ambientes hipersalinos (Page 1967, 1988; Park et al. 2009, 2012; Park 2016, 2017; Rogerson and Patterson 2000), dentro del amplio grupo de amebas de vida libre, podemos encontrar al grupo Heterolobosea y dentro de este, la especie más reconocida es *Naegleria*; se ha reportado que tiene 47 subespecies, pero que solo 3 de estas son patógenas¹, *Naegleria fowleri* en

humanos como agente causal de PAM, mientras que *N.australiensis* y *N.italicus* son patógenos de animales.

La gran mayoría de especies aisladas de *Naegleria* se han encontrado a temperaturas tropicales entre los 25 y los 35°C, pero estudios recientes han demostrado que hay presencia de *Naegleria* en el ártico y en el sub-Antártico encontrando especies como *N.arctica*, *N.neochilensis*, *N.neoantarctica*, *N.neopolaris*, y *N.polaris*¹⁸, la interacción y preferencia con los climas fríos y su supervivencia en estos no ha sido estudiada.

4.4 Transmisión

La vía de transmisión de *Naegleria fowleri* es a través del agua (**figura1**), se contrae por el contacto con el agua contaminada; *Naegleria* entra a través de la lágrima cribosa y la mucosa nasal.

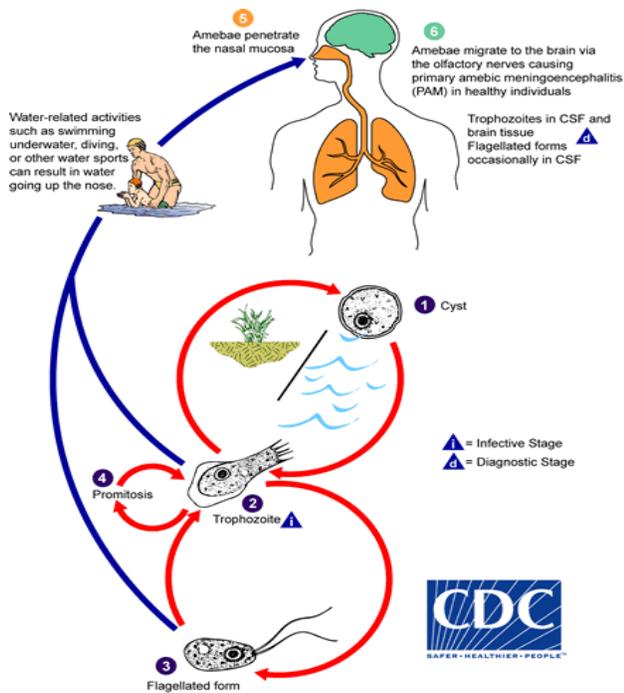


Figura 1: Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*. Tomado de: Center of disease control and prevention (CDC) [Internet]. U.A : Department of Health & Human Services; [Última actualización Noviembre de 2017; citado el 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/pathogen.html>

Como no es un parásito oportunista, *N. fowleri* tiene la capacidad de infectar niños, adolescentes, adultos y ancianos sin la necesidad que tenga una enfermedad de base; *N. fowleri* se ha descrito en pacientes que estaban practicando algún tipo de deporte acuático.³⁶

4.5 Patogénesis

Después de la entrada de los trofozoitos por la mucosa nasal, *N. fowleri* empieza su colonización, y se abre paso hasta el cerebro a través del plexo del nervio olfativo llegando al bulbo olfativo del cerebro aproximadamente 24 horas después de la infección. A las 96 horas se empieza a mostrar la respuesta inflamatoria y las

primeras señales de daño celular y de tejidos, siendo los neutrófilos y los macrófagos los responsables de esta.³²

Naegleria fowleri al igual que muchas amebas de vida libre, han demostrado ser capaces de lograr la desmielinización de las neuronas, degeneración de los procesos de la glía y la inhibición de la acción inmunológica. Se han descrito dos vías de patogenicidad en *N. fowleri*, dependiente y no dependiente de contacto.

4.5.1 Mecanismos dependientes de contacto

La adhesión al epitelio nasal es la parte fundamental para una infección efectiva y colonización de *Naegleria*. La habilidad que tenga *N. fowleri* en la invasión del nervio nasal, la motilidad y la quimiotaxis son factores fundamentales en el desarrollo de la enfermedad.¹⁹

El gen *nfa1* codifica una proteína del mismo nombre, expresada únicamente en los pseudópodos del trofozoíto; se ha demostrado que la proteína Nfa1 está involucrada en la inhibición de la primera barrera inmunológica, permitiendo así el libre ingreso al nervio olfatorio²⁰. Nfa1 tiene una de las tareas más importantes en cuanto a la patogenicidad de *N.fowleri* ya que tiene un papel primordial en la actividad fagocítica, la endocitosis y destrucción de las células nerviosas a través de un mecanismo dependiente al contacto¹³².

La adhesión está mediada por adhesinas que se expresan en la membrana; se han descrito dos integrinas ubicadas en la parte de adhesión junto a las adhesinas que tienen su respectiva anti-integrina para la modulación de la acción de la misma.

N. fowleri posee un fibronectina de unión la cual se ha descrito en actividades de mediación de la citotoxicidad de las células huésped, también se ha descrito las quinasas C que inhiben la unión de las células citotóxicas al trofozoíto, en este proceso hay una inducción a la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando así daño celular y epitelial.

Estudios sugieren que la proteína Mp2CL5 tiene un papel primordial en el reconocimiento y anclaje celular^{4, 5}; no se ha determinado aún cuál es su mecanismo de acción.

4.5.2 Mecanismos independientes de contacto

La proteína N-PFP de 66KDa formadora de poros citolíticos se encuentra unida a la membrana de *N. fowleri* (Young and Lowrey, 1989), y es descrita como la encargada de despolarizar el potencial de membrana, afectando así la integridad de la membrana²¹. Los naegleriapores A y B son polipéptidos encargados de evadir las células NK y células T por medio de citólisis. Estos polipéptidos se han descrito también en amebas como *Entamoeba histolytica*²².

En los pacientes con PAM se ha observado una gran desmielinización en la materia blanca, producto de las fofolipasas A, A₂ y C. Es ampliamente reconocido que *N. fowleri* se encarga del daño de las membranas citoplasmáticas ricas en lípidos y la desmielinización del tejido nervioso, en este proceso actúan las esfingomielinasas, neuroaminidasas y lipofosfolipasas.

Un grupo de cisteinproteasas del tipo catepsina (NfCPB y NfCPB-L) está implicado en la degradación total de las Inmunoglobulinas IgA, IgM, e IgG; con la IgA e IgM, NfCPB impide la opsonización, evadiendo la primera barrera inmunológica; y al actuar sobre la IgG impide la liberación de productos de lisis celular de células como Neutrófilos, Monocitos, Eosinófilos y NK. NfCPB y NfCPB-L también están implicados en la degradación de la fibronectina, hemoglobina, colágeno y albúmina.

4.6 Inmunología

En las etapas iniciales de la infección, el huésped produce mucosa y atrapa el trofozoíto; al hacer un mínimo reconocimiento de *N. fowleri*, se empieza a activar la respuesta inmune innata, permitiendo la liberación de mucinas (MUC5AC) e interleucinas pro-inflamatorias (IL-8 y IL-1 β) en las vías respiratorias por medio de la producción de ROS. Aunque MUC5AC inhibe la adhesión de *N. fowleri* a las células, una gran parte de trofozoítos logra su cometido, consiguiendo que haya una inflamación en el epitelio. Al pasar los días, la inflamación es cada vez mayor, con un aumento total de la respuesta neutrófila; se necesita más de un neutrófilo para poder causar daños en la membrana de *N. fowleri*, y el mecanismo de lisis es mediado por el TFN- α ²³.

La activación de Macrófagos produce la liberación de ácido nítrico en un mecanismo citolítico dependiente de argininas y también la intervención de factores no oxidativos tales como la IL-1 y el TNF- α ²⁴.

4.6.1. Evasión inmune

La primera línea de defensa es la mucosa nasal, *N. fowleri* evade el moco usando proteínas mucinolíticas que degradan a MUC5AC. Se ha demostrado que *N. fowleri* deteriora la respuesta blastogénica de la línea linfocítica, deprimiendo la acción de los mitógenos en los linfocitos T y B; sugiriendo que ese es el mecanismo de supresión de la respuesta inmune celular.²⁵

Otro mecanismo importante es la evasión total de la lisis celular mediada por el complemento. Se ha demostrado que, al momento de evasión al complemento, *N. fowleri* forma una especie de burbujas en la membrana, haciendo de estas un mecanismo regulador de complemento que elimina por completo el complejo de ataque de membrana C5b-C9²⁶. La proteína CD59-L funciona como protección de *N.fowleri* contra citotoxinas o moléculas formadoras de poros, es decir, CD59-L cumpliría con la función de proteger a la ameba contra complejos líticos del complemento (C5b, C6, C7, C9) o toxinas bacterianas.¹³³

Naegleria fowleri tiene la capacidad de internalizar los anticuerpos unidos a su membrana, logrando así la total evasión de la opsonización de los anticuerpos sIgA.

4.6.2. Inmunización

Se ha realizado inmunización en ratones de forma intranasal, intravenosa, e intraperitoneal con *N.gruberi* fijada con formaldehído, ofreciendo así una protección al momento del contacto intranasal con *N. fowleri*; es importante destacar que la inoculación intravenosa fue la más efectiva.

La protoxina Cry1Ac, producida por *Bacillus thuringiensis* y la toxina del cólera se han usado como adyuvantes en la mucosa nasal; Por ejemplo, los lisados de *N. fowleri* co-administrados con Cry1Ac inducen protección contra la posterior exposición a *N. fowleri*. La protección se produce gracias al aumento de la metaplasia del epitelio olfativo, produciendo así un aumento significativo de IgA, así como el aumento de los linfocitos activados y el aumento de la respuesta inmune Th-1 y Th-2 en STAT6- forma dependiente (Carrasco-Yépez et al., 2010)²⁷.

Más recientemente, se ha probado rNfa1 como candidato potencial a la vacuna. Los ratones inmunizados intraperitonealmente o intranasalmente con la proteína rNfa1 lograron desarrollar anticuerpos IgG, IgA e IgE específicos. También se inducen niveles elevados de la citocina Th1, IF- γ , y la citocina reguladora, IL-10; haciendo de rNfa1 un blanco ideal para la producción de una vacuna.

4.7. Meningoencefalitis amebiana primaria (PAM)

La meningoencefalitis amebiana primaria (PAM) es una meningoencefalitis hemorrágica necrosante, los síntomas incluyen: dolor de cabeza, rigidez en el cuello, fiebre, la participación de los lóbulos olfativos puede ocasionar alteraciones en el sentido del olfato o el gusto, mientras que también pueden producirse las deficiencias visuales. El paciente puede experimentar confusiones, irritabilidad y puede comportarse irracionalmente antes de dejar de ingerir, verse comprometido su estado mental, convulsiones y coma resultando en la muerte en la mayoría de los casos.

Su periodo de incubación va de uno a dieciséis días dependiendo del estado inmune del huésped; Después de la infección, *N. fowleri* se infiltra en la lámina cribiforme y la mucosa nasal, pasa a lo largo de la ruta neuroepitelial-olfativa para ingresar al cerebro y producir PAM con edema cerebral rápido, lo que lleva a la herniación cerebelar y la muerte²; cortes histológicos de PAM evidencian una fuerte inflamación, a menudo formada por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos, con una gran presencia de trofozoítos en los espacios del cerebro medio, hipotálamo y cerebro.

El bulbo olfatorio del paciente exhibe exudados hemorrágicos e inflamatorios, y las leptomeninges se muestran congestionadas con una hiperemia difusa con infiltraciones.

4.8. Epidemiología

Aunque se ha reportado la presencia de *N. fowleri* en pacientes asintomáticos, se considera a PAM como una enfermedad poco frecuente; a nivel mundial se han confirmado 583 casos de PAM al 2017.

En Estados Unidos se han reportado 143 casos de PAM comprendidos desde 1962 hasta el 2008, la mayoría de pacientes se dieron en las regiones del sur con una predominancia en los estados de Texas y Florida, aunque también se han presentado en estados como Virginia, Kansas y Minnesota, demostrando así la facilidad de *Naegleria* para adaptarse a diferentes temperaturas, un promedio de 0 a 8 personas es infectado por *Naegleria fowleri* anualmente.²⁸

En el resto del mundo, se han reportado 440 casos de PAM, la mayoría de ellos ocurrieron en las épocas de verano en pacientes que nadaron en aguas templadas, piscinas y lagos. Se han reportado casos de PAM en República Checa, Australia, Colombia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Inglaterra e India.²⁹

Pakistán ha reportado del 2011 al 2015 25 casos de PAM, con prevalencia en las ciudades de Karachi y Sindh; de los cuales 13 de ellos no tuvieron historial de actividades acuáticas, lo cual sugiere que la infección fue por un baño con agua de grifo.³⁰

En Colombia se han reportado 5 casos de PAM, todos de ellos diagnosticados post-mortem.³³

4.9 Diagnóstico

En Colombia , el diagnóstico de PAM no es muy acertado, ya que en los pocos casos reportados se han tratado como meningitis bacteriana; sin embargo, el estudio de LCR en fresco permite ver los trofozoítos, es importante destacar que se necesita un buen entrenamiento microscópico, ya que estos parecen macrófagos o incluso pueden llegar a pasar por desapercibidos ; al momento de hacer una tinción es muy posible que haya destrucción de trofozoítos , ya que son lábiles a los ingredientes usados en la tinción Giemsa, Wright y Lugol; también es importante destacar que no se puede refrigerar ni congelar la muestra , ya que enquistas o destruye por completo los trofozoítos.³³

El análisis de LCR es muy parecido a una meningitis bacteriana, la única diferencia con esta es que los cultivos son negativos; se observan leucocitos a expensas de los neutrófilos, hay glucorraquia disminuida y proteinorraquia aumentada, con aspecto purulento. Para la tinción de LCR se sugiere utilizar la coloración tricrómica donde los trofozoitos se tiñen de verde, el citoplasma adopta un color purpura/morado y el cariosoma rojo.⁴

Como la mayoría de diagnósticos no se hacen pre-mortem, se realizan cortes histopatológicos para su diagnóstico, ya sea fijándolas con formaldehído, o haciendo tinciones como Hematoxilina-Eosina (HE), Platamethenamina de Gomori (GMS) y ácido peryódico de Schiff (PAS).

A parte de la microscopía, los análisis por medio de inmunofluorescencia (IF), ELISA, citometría de flujo y PCR. En el CDC se usa la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de *Naegleria fowleri*.³⁴

4.10 Tratamiento

El diagnóstico y tratamiento en una etapa temprana de la enfermedad son esenciales para permitirle al paciente cualquier posibilidad de sobrevivir a PAM; los tratamientos actuales incluyen la administración de amebicidas que logren pasar la barrera hematoencefálica, los esteroides para controlar el edema cerebral y los medicamentos antiepilépticos, si es necesario, para controlar la actividad convulsiva.^{134,135}

Se han propuesto administrar medicamentos a través de la placa cribiforme que se encuentra en el techo de la cavidad nasal, todo esto con el fin de alcanzar y suministrar medicamentos en forma vaporizada al área del cerebro y la superficie del lóbulo frontal.¹³⁶

El tratamiento por elección para *Naegleria fowleri* es la combinación de anfotericina B con fluconazol IV, miconazol, azitromicina IV, rimfapicina IV, miltefosine o dexametasona IV.³⁵

Actualmente, se ha identificado que *N. fowleri* codifica el esteroide 14-desmetilasa (CYP51) que comparte una similitud de secuencia de 35% con algunas especies fúngicas. Esta similitud ha llevado a plantear la posibilidad de reutilizar medicamentos antimicóticos diferentes a la anfotericina B y la optimización de su uso para el tratamiento de la PAM.¹³⁷

4.11 Proteínas NfCPB y NfCPB-L

Las cisteinoproteasas han sido reconocidas como factores fundamentales en la invasión y supervivencia intracelular de una gran cantidad de parásitos patógenos para el ser humano; estas son indispensables en la invasión intracelular en especies como *Plasmodium falciparum*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania mexicana* y *Toxoplasma gondii* entre otros.

Entre estas, podemos encontrar las proteínas NfCPB y NfCPB-L, éstas son proteínas de 345 y 313 aminoácidos, y un peso molecular de 38.42 kDa y 34 kDa

respectivamente (**figura 2**). Se ha demostrado que NfCPB y NfCPB-L tienen una capacidad proteolítica que actúa principalmente en proteínas tales como Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), Proteínas estructurales (colágeno, fibronectina), y proteínas funcionales (hemoglobina y albúmina).

A.

10	20	30	40	50
MNSRLCLLSV	CFLLVAASS	LLHAKLLVQD	DDSSPALNLD	IIRHVRRKRT
60	70	80	90	100
TWEAGINKRF	VGKTIADVKK	LLGLKGLKPT	IRYSEDEMAL	VNQYYAAKQG
110	120	130	140	150
QPSALPDSFD	ARQQWPICIH	PIRNQQQCGS	CWAFSASEVL	SDRFCIATLN
160	170	180	190	200
QPKKVNVLVS	PQDLVSCNWY	NNGCDGGILW	LAWMYLEHTG	IVPDSCMPYV
210	220	230	240	250
SGNGVAPSCP	KYCNGTNIDI	NTQKYKAKTW	YEVGSIAGFF	IKEEKIMNEL
260	270	280	290	300
ITNGPVQTGF	SVYQDFMSYK	SGVYTHETGS	FLGGHAVKIV	GYGVENGVKY
310	320	330	340	
WLVANSWSAD	WGLDGYFKIK	RGVNECGIEG	DVYTGIPNTD	TIPNL

B

10	20	30	40	50
MRSLLFITLL	LAFVASALAF	DSDFLNEPVH	DRVLIDKINN	SPKVAWKATS
60	70	80	90	100
YSQFEKMTLG	EFRKRLGTVL	IQKGTADMLP	KKTIAPLVGA	PAAFDSRTKW
110	120	130	140	150
PNCVHPIRNQ	EQCGSCWAFS	ASEVLSDRFC	IASTGKDNV	LSPQYMVSCD
160	170	180	190	200
TSDYGCDGGY	LNNAWNFLAT	TGIPTDSCVP	YTSQNGDVAA	CPSTCQNGGS
210	220	230	240	250
IKLYRAKNPQ	QLNDIPSIMA	DMEANGPVQA	AFSVYRDFMS	YKSGVYHHVS
260	270	280	290	300
GSLLGGHAIK	IVGWGVDSVS	NKPYWIVANS	WGPSWGLNGF	FWILRGSDEC
310				
GIEDNVWGAG	VLL			

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de las proteínas **A.** NfCPB y **B.** NfCPB-L. Tomado de: UniProt [Internet]. Suiza: EMBL-EBI; 2002 [Última actualización 29 de octubre de 2017; citado el 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/X5D911> ; <http://www.uniprot.org/uniprot/X5D761> .

Estudios de análisis de las propiedades bioquímicas de las proteínas NfCPB y NfCPB-L han demostrado que el pH ideal de actividad proteolítica de estas está entre 4.0 y 6.5.

4.12 Bioinformática

La bioinformática en los últimos años ha sido una herramienta fundamental para la investigación⁷, ya que incluye una unión de campos de estudio interdisciplinarios tales como la química, informática, matemática, estadística y bioquímica para el análisis de datos, o simulaciones de sistemas o mecanismos de tipo biológico, enfocándose en el nivel molecular.⁸

Gracias a la bioinformática se han podido llevar a cabo tareas tales como la predicción de genes, alineamiento de secuencias, montajes de genomas, predicciones de expresión génica, e interacciones proteína-proteína.⁹

El análisis de la estructura de una proteína es uno de los pilares fundamentales en la bioinformática, por medio de la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) se puede predecir las estructuras secundarias y terciarias de una proteína.

El conocimiento de la estructura de la proteína es fundamental para entender el comportamiento de la misma; gracias a la conformación tridimensional de las

proteínas podemos saber cuál es su disposición espacial, permitiendo así la determinación de la interacción con los diferentes ligandos de las células a infectar. Podemos también concluir la naturaleza de las fuerzas que estabilizan la estructura de la proteína, determinando así el tipo de enlaces que pueden llegar a formar.

La determinación de la estructura tridimensional de una proteína nos permite analizar sus dominios, y estos a su vez pueden considerarse como la unidad más importante de la estructura de la proteína; a menudo, los dominios realizan tareas y llevan a cabo funciones específicas diferentes a la de la proteína, tales como atravesar la membrana plasmática en el caso de las proteínas transmembrana, proveer una superficie para el anclaje específico proteína-proteína.

4.13 Predicción estructural de proteínas

Uno de los grandes usos de la bioinformática consiste en hacer la determinación estructural de las proteínas; para esta tarea, se han dispuesto tres enfoques fundamentales para el modelado y la predicción de estructuras proteicas.⁷

La homología hace referencia a un cálculo estadístico de los residuos de una secuencia, haciendo una comparación con otras secuencias teniendo en cuenta los patrones conservados entre múltiples secuencias homólogas.

El plegado o treading, se basa en el previo conocimiento estructural de proteínas homologas disponibles en las bases de datos proteicas.⁸

Y finalmente, la predicción *Ab initio*, la cual no requiere de información adicional; este tipo de predicción solo necesita una base estadística calculada a partir de una sola secuencia.

4.13.1 Predicción de la estructura secundaria de proteínas

La predicción de la estructura secundaria de una proteína consiste en identificar la conformación de cada residuo de aminoácidos presentes en su secuencia. Esta conformación comprende patrones tales como Hélices α , hojas β y bucles.

El método de predicción GOR mide la tendencia relativa de cada aminoácido de pertenecer a un tipo de elemento de la estructura secundaria, este método tiene en cuenta las interacciones que tiene el aminoácido con los residuos vecinos.

Recientemente, se han usado las redes neuronales para analizar patrones en el alineamiento de múltiples secuencias, logrando un 85% de precisión en la predicción.

4.13.2 Predicción de la estructura terciaria de proteínas (I-TASSER)

El método más usado para la predicción de la estructura tridimensional de una proteína es la homología; partiendo siempre desde la premisa de que si dos

proteínas tienen un alto porcentaje de similitud es bastante probable que sus estructuras tridimensionales sean similares.

I-TASSER es un programa que usa este tipo de modelamiento para hacer el modelamiento tridimensional de proteínas, y usa seis pasos primordiales para su determinación de modelos tridimensionales.⁹⁴

Se realiza primero una selección de plantilla, en donde se lleva a cabo una búsqueda de proteínas con un porcentaje de homología alto, esta búsqueda se lleva a cabo en el PDB (protein data base), mediante BLAST, Clustal omega o cualquier otro tipo de alineamiento.

Al tener las plantillas y la coincidencia en el alineamiento de secuencias, se procede a llevar a cabo la creación del esqueleto del modelo, esta creación se lleva a cabo haciendo una clasificación de residuos en tres tipos (similares, idénticos y diferentes).

Resaltando que en los alineamientos de secuencias puede haber Gaps que necesitan ser cerrados, se realiza un modelamiento de bucles partiendo de otras estructuras proteicas conocidas que se adapten a el Gap.

Después de hacer la construcción de la cadena principal, se procede a construir cadenas laterales mediante la búsqueda de ángulos de torsión, escogiendo así los ángulos que tengan una menor interacción de energía con ángulos vecinos. Para esta determinación de ángulos de torsión se tienen en cuenta los ángulos de torsión existentes en cadenas conocidas.

Una vez encontrados los ángulos de torsión se hace un refinamiento del modelo tridimensional reduciendo la energía del mismo al mínimo para evitar tensiones y colisiones entre las estructuras; se realiza entonces una validación del modelo tridimensional por medio de métodos tales como la gráfica de Ramachandran, que nos indica si el modelo realizado cumple con los parámetros físico-químicos de la proteína. Para esta validación también existen servidores tales como WHATIF y ANOLEA.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Tipo de investigación

Esta investigación pertenece al orden de: Descriptivo no experimental

5.2. Hipótesis

Es posible obtener el modelo tridimensional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* gracias al uso de herramientas bioinformáticas.

6. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

6.1. Herramientas para la búsqueda de similitud y homología de secuencias

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas NfCPB y NfCPB-L fueron obtenidas a través del Genbank del Centro Nacional de Información para la Biotecnología NCBI (GenBank: NfCPB: AHW50663; NfCPB-L: AHW50664) y UniProt (entrada: NfCPB: X5D761_NAEFO; NfCPB-L: X5D911_NAEFO)^{34,35}. Se llevó a cabo la comparación de secuencias con el programa *Clustal Omega* que se encuentra disponible en el EMBL (Laboratorio Europeo de Biología Molecular) ⁴¹.

6.2. Herramientas para el análisis de estructura primaria

Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* fueron analizadas con el programa PROTPARAM que se encuentra en el servidor de ExPASy Proteomic Tools.⁴². Este programa arroja, entre otros, datos como el peso molecular, el índice de estabilidad, el punto isoeléctrico, el tiempo de vida *in vitro*, el índice alifático y el promedio general de hidropatía.

La predicción de segmentos transmembranales se obtuvo a partir del consenso de 9 programas⁴³: DAS^{44,45}, SOSUI^{46,47} y TOPPRED2⁴⁸, los cuales se basan en escalas de hidrofobicidad; TMAP ^{49,50}, TMPRED^{43,51} y SPLIT4^{49,52,53}, los cuales se fundamentan en métodos estadísticos de predisposición estructural; y

PHDHTM^{49,54}, TMHMM2^{49,55} y HMMTOP2^{49,56}, los cuales usan redes neuronales para sus predicciones.

El análisis del índice hidrofóbico y las regiones hidrofílicas se llevó a cabo con el programa PROTSCALE⁵⁷ que usa los algoritmos de Kyte&Dolittle del servidor Expsy Proteomic Tools.

La determinación de regiones no organizadas y la predicción de dominios globulares se realizó mediante el GLOBPLOT, un servicio web que permite predecir dominios estructurales por medio de herramientas basadas en la escala de propensión de los aminoácidos⁵⁹.

El programa PROSITE⁵⁸ se usó para el análisis de motivos, el cual está disponible en el servidor de Expsy Proteomic Tools.

6.3. Herramientas para el análisis de estructura secundaria

Para la predicción de la estructura secundaria de las proteínas NfCPB y NfCPB-L se realizó un consenso de seis algoritmos a partir del servidor NSP@⁶⁰: Dos métodos fundamentados en el uso de parámetros de probabilidad determinados por las frecuencias relativas de las apariciones de cada aminoácido en cada tipo de estructura secundaria (SOPM y PREDATOR)^{62,63}, tres métodos basados en probabilidad de inferencia bayesiana como son GOR (GOR IV, DPM y DSC)⁶⁴ y el logaritmo PHD que utiliza sistemas de redes neuronales para la predicción de los enlaces de hidrógeno⁶¹

6.4. Herramientas para el análisis de estructura terciaria

Para el modelamiento de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* se usó el programa I-TASSER⁶⁷, el cual permite predecir el modelo de la estructura tridimensional y funcional de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos. I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) trabaja usando plantillas de estructuras del *Protein Data Bank* (PDB) mediante una técnica llamada *fold recognition*.⁶⁶

Para la visualización del modelo tridimensional obtenido mediante I-TASSER se utilizó el servidor Swiss-Pdb Viewer 4.1.0, el cual permite validar la proteína gracias a la gráfica de Ramachandran, usando la posición estérica de los aminoácidos.⁶⁷

7. RESULTADOS

7.1 Alineamiento de secuencias NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* con Clustal Omega

El alineamiento múltiple es una de las herramientas bioinformáticas más utilizadas, ya que gracias a ella podemos realizar diversos análisis, que van desde la filogenia hasta la búsqueda de motivos. Se sometieron las secuencias de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*, y se obtuvo el siguiente resultado (**Figura 3**):

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

tr|X5D761|X5D761_NAEFO      MNSRLCLLSVCFLLVAASSLLHAKLLVQDDSSPALNLDII-RHVRKRTTWEAGINKR      59
tr|X5D911|X5D911_NAEFO    MRSLL---FITLLAFVASALAFDSDFL----NEPVHDRVLDKINNSPKVAVKATSYSQ    53
      *.* *      : :* ..**:* . . : :      ..* . : :* : . : : :* * : :
tr|X5D761|X5D761_NAEFO      FVGKTIADVKKLLGLKGLKPTIRYSEDEMALVNQYYAAKQGQPSALPDSFDARQQWPICI    119
tr|X5D911|X5D911_NAEFO    FEKMTLGEFRKRLGTVLIQKG---TADM-LP----KKTIAPLVGAPAAFD SRTKWPNCV    104
      *  * : : : : * **  : :      : * *      . . . * : * * : * * :
tr|X5D761|X5D761_NAEFO      HPIRNQQQCGSCWAFSASEVLSDRFCIATLNQPKKVMWVLSQDLVSCNWNNGCDGGIL    179
tr|X5D911|X5D911_NAEFO    HPIRNQEQCGSCWAFSASEVLSDRFCIASTG---KDNVVLSPQYMMVSCDTSYGCDDGYL    161
      *****:*****:*****: . * ***** :** : : ***** *
tr|X5D761|X5D761_NAEFO      WLAWMYLEHTGIVPDSMPYVSGNGVAPSCPKYCNGTNIIDINTQKYKAKTWYEVGSIAGF    239
tr|X5D911|X5D911_NAEFO    MNAWNLFLATTGIPDSCVPYTSQNGDVAACPSTCQNGGSI---KLYRAKNPQQ-----    211
      ** :* ** ** :**:* * . :** . : . : : * : * . :
tr|X5D761|X5D761_NAEFO      FIKEEKIMNELITNGPVQTFGSVYQDFMSYKSGVYTHETGSFLGGHAVKIVGVGVEN--G    297
tr|X5D911|X5D911_NAEFO    LNDIPSIMADMEANGPVQAAFVYRDFMSYKSGVYHHVSGSLLGGHAIKIVGWGVDSVSN    271
      : . .* : : :*****:*****:***** * ;**:*****:*****:*. .
tr|X5D761|X5D761_NAEFO      VKYMLVANSWSADWGLDGYFKIKRGVNECGIEGDVYTGIPNTDTIPNL      345
tr|X5D911|X5D911_NAEFO    KPYWIVANSWGPSWGLNGFFWILRGSDECGIEDNVWAGAVLL-----      313
      **:*****. .***:* * ** :*****:*. :

```

Figura 3: Alineamiento mediante Clustal Omega entre las secuencias de las proteínas NfCPB (**tr|X5D761|X5D761_NAEFO**) y NfCPB-L (**tr|X5D911|X5D911_NAEFO**). La última línea de alineamiento representa el “Clustal Consensus”, en la cual se pueden apreciar 4 caracteres; El **asterisco (*)** hace referencia a que en dicha posición los residuos son 100% idénticos. Los **dos puntos (:)** indican posiciones en las cuales se ha realizado sustituciones conservativas. El **punto (.)** indica regiones que se sustituyeron, pero son menos conservativas. El **guion (-)** representa las regiones que no fueron alineadas.

7.2 Análisis de la estructura primaria de NfCPB y NfCPB-L

La determinación de las propiedades fisicoquímicas es fundamental, ya que estas les dan a las proteínas características especiales que son esenciales para la determinación de las estructuras primarias y terciarias. El programa PROTPARAM permite hacer una determinación de los parámetros anteriormente mencionados; los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

NfCPB		NfCPB-L	
Características	Resultados	Características	Resultados
Número de aminoácidos	345	Número de aminoácidos	313
Fórmula	C ₁₇₂₆ H ₂₆₅₉ N ₄₅₇ O ₄₉₆ S ₁₈	Fórmula	C ₁₅₂₈ H ₂₃₄₁ N ₄₀₆ O ₄₅₁ S ₁₇
Peso Molecular	38404,94	Peso Molecular	34154,82
Punto Isoelectrico	7.66	Punto Isoelectrico	7.73
Número de Átomos	5361	Número de Átomos	4738
Vida Media	30 Horas en reticulocitos de mamífero(in vitro) >20 horas en levaduras (in vivo) >10 en <i>E.coli</i> (in vivo)	Vida Media	30 Horas en reticulocitos de mamífero(in vitro) >20 horas en levaduras (in vivo) >10 en <i>E.coli</i> (in vivo)
Indice de Inestabilidad	34,84	Indice de Inestabilidad	32,2
Indice Alifático	81,96	Indice Alifático	74,29
Promedio de Hidropatía	-0,261	Promedio de Hidropatía	-0,189

Tabla 1. Propiedades físico químicas de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*

En cuanto a los porcentajes de aminoácidos presentes en cada proteína, se dio la siguiente conformación:

La proteína NfCPB está conformada por 345 aminoácidos; los que se presentaron en mayor porcentaje fueron Glicina con un 9.20%, seguido Leucina y Valina ambos con un porcentaje de 7.30%, y Serina con un porcentaje de 7.00%. Los aminoácidos con menor porcentaje fueron Histidina 1.80% y metionina 1.50%. **Tabla 2.**

NfCPB		
AMINOÁCIDO	CANTIDAD	PORCENTAJE
Gly	30	9,20%
Leu	24	7,30%
Val	24	7,30%
Ser	23	7,00%
Ile	22	6,70%
Lys	22	6,70%
Asn	20	6,10%
Ala	19	5,80%
Asp	18	5,50%
Thr	16	4,90%
Tyr	16	4,90%
Pro	15	4,60%
Gln	14	4,30%
Glu	13	4,00%
Arg	10	3,10%
Cys	10	3,10%
Phe	10	3,10%
Trp	10	3,10%
His	6	1,80%
Met	5	1,50%

Tabla 2. Composición porcentual de aminoácidos de la proteína NfCPB, análisis realizado con ProtParam.

La proteína NfCPB-L tiene una constitución de aminoácidos similar a la proteína NfCPB; La serina es el aminoácido que tiene el mayor porcentaje 9.50%, seguido de la glicina la cual está en un porcentaje igual que la proteína NfCPB (9.20%), la

alanina y la valina siguen con un 7.50%, y los aminoácidos con menor porcentaje, fueron la Metionina 2.00% y la histidina 1.70%. **Tabla 3.**

NfCPB-L		
AMINOÁCIDO	CANTIDAD	PORCENTAJE
Ser	28	9,50%
Gly	27	9,20%
Ala	22	7,50%
Val	22	7,50%
Asp	19	6,50%
Leu	19	6,50%
Asn	18	6,10%
Pro	16	5,40%
Ile	15	5,10%
Lys	15	5,10%
Thr	13	4,40%
Phe	12	4,10%
Cys	10	3,40%
Gln	10	3,40%
Trp	10	3,40%
Tyr	10	3,40%
Arg	9	3,10%
Glu	8	2,70%
Met	6	2,00%
His	5	1,70%

Tabla 3. Composición porcentual de aminoácidos de la proteína NfCPB-L

Para obtener un resultado en PROTSCALE el tamaño de la ventana usada tuvo un valor de 7, lo cual fue apropiado para encontrar las regiones hidrofílicas expuestas en la superficie y su potencial antigénico. El análisis hidrofóbico de ProtScale (**Figura 4**) reveló que NfCPB y NfCPB-L son altamente hidrofílicas.

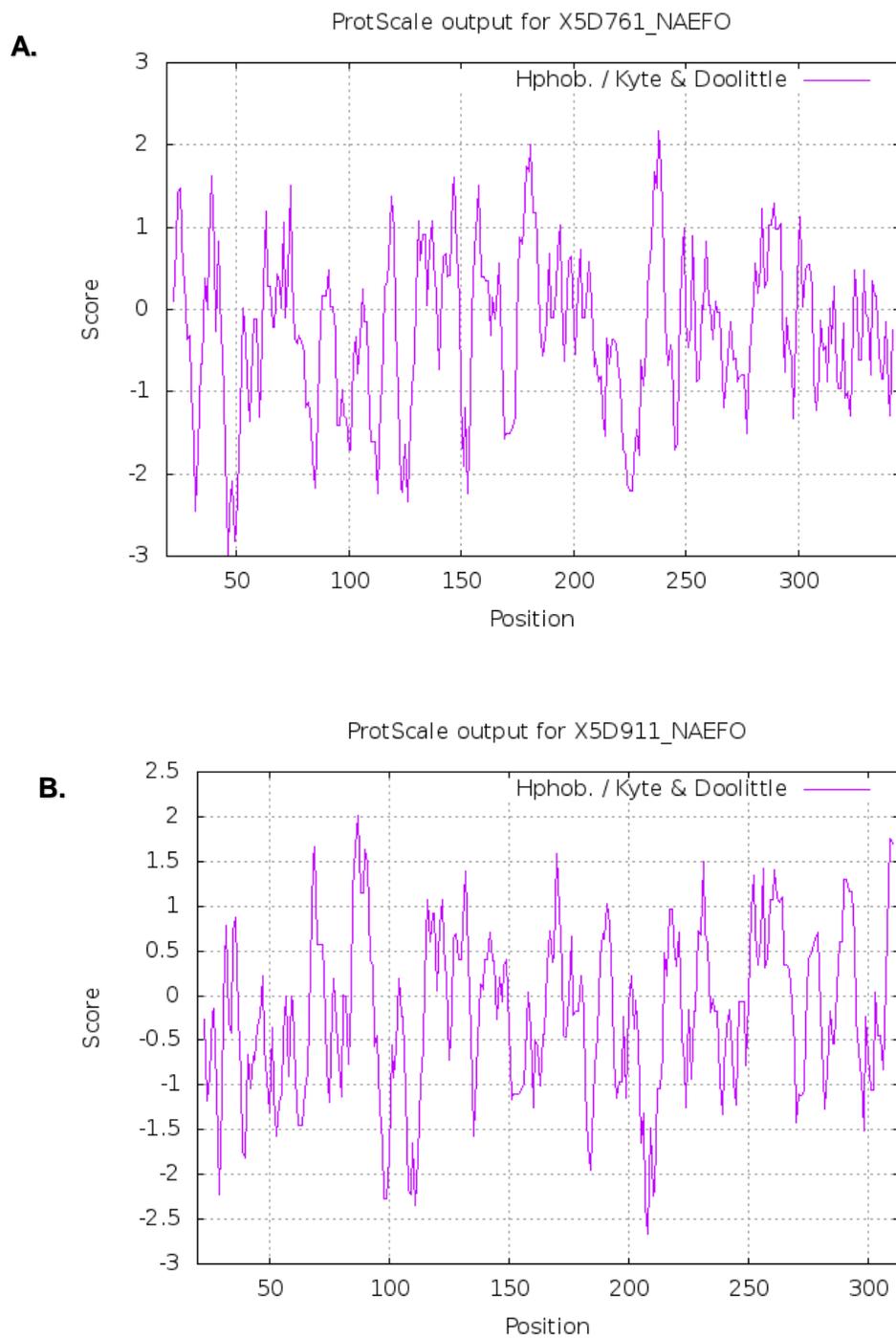


Figura 4: Índice de hidrofobicidad de las proteínas **A.** NfCPB y **B.** NfCPB-L. Escalas basadas en el algoritmo Kyte&Doolittle. Eje Y: Rango de punto de corte; Eje x: Posición del aminoácido. Tomado de: ExPaSy Bioinformatics Resource Portal [Internet]. Suiza

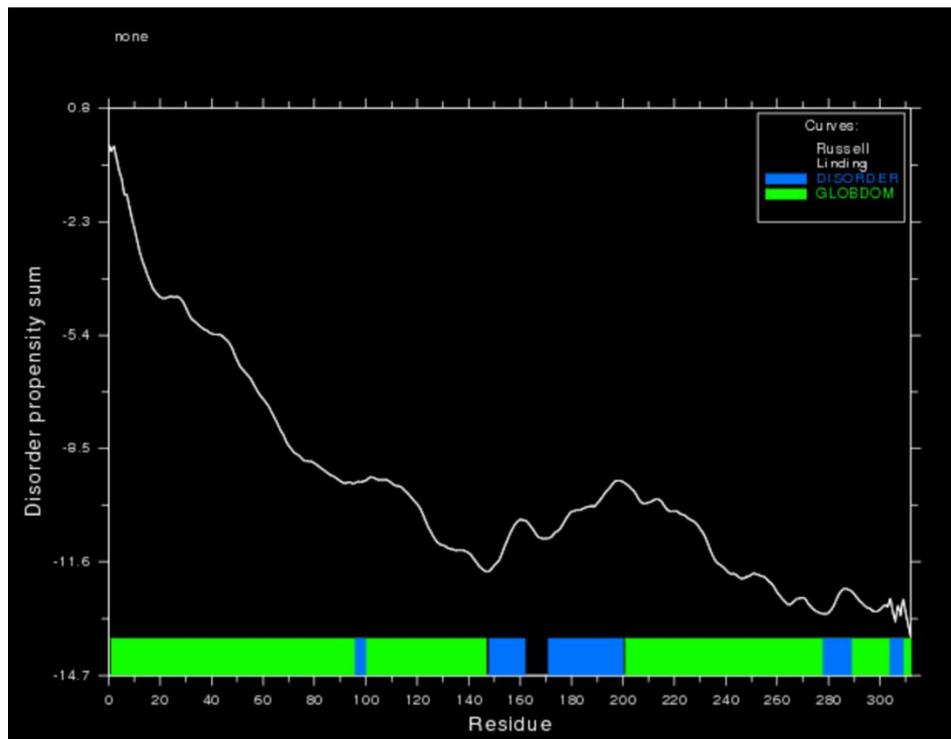
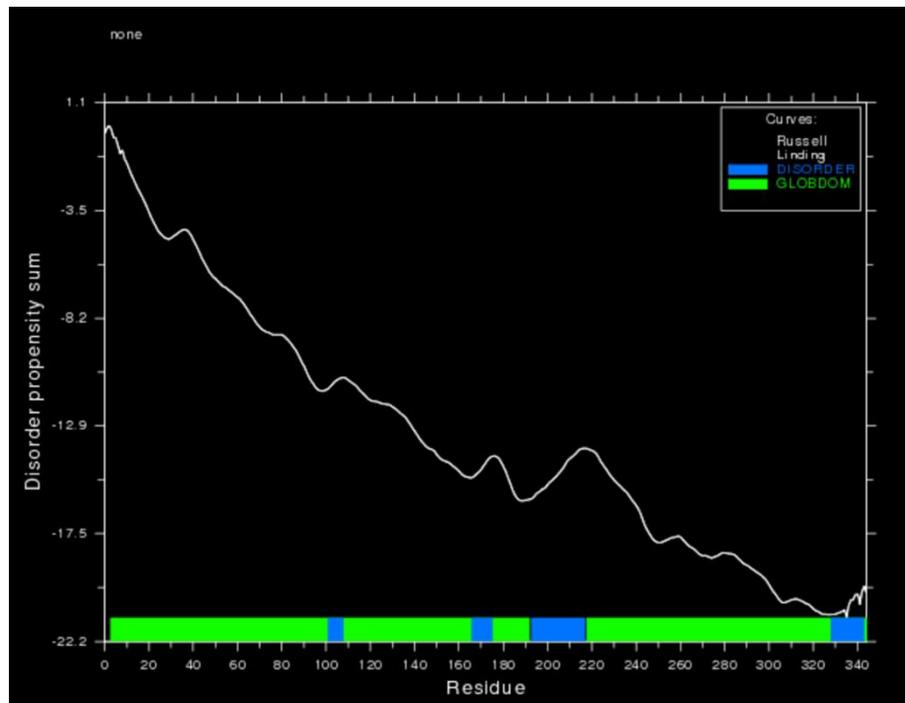


Figura 6: Análisis de las proteínas **A.** NfCPB y **B.** NfCPB-L. Las regiones no estructuradas corresponden al área azul, los dominios globulares corresponden a las regiones en verde. **Eje x:** Propensión al desorden; **Eje y:** residuos.

En NfCPB (**figura 6a**) se observa la existencia de cuatro regiones desordenadas en los residuos 101-108, 166-175, 193-217 y 328-343, mientras que en NfCPB-L (**figura 6b**) son cinco las regiones desordenadas que se encuentran en los residuos 96-100, 148-162, 171-200, 278-289 y 304-309.

El análisis de motivos funcionales y sitios activos se realizó mediante el programa PROSITE, cuyos resultados se muestran en la **figura 7**

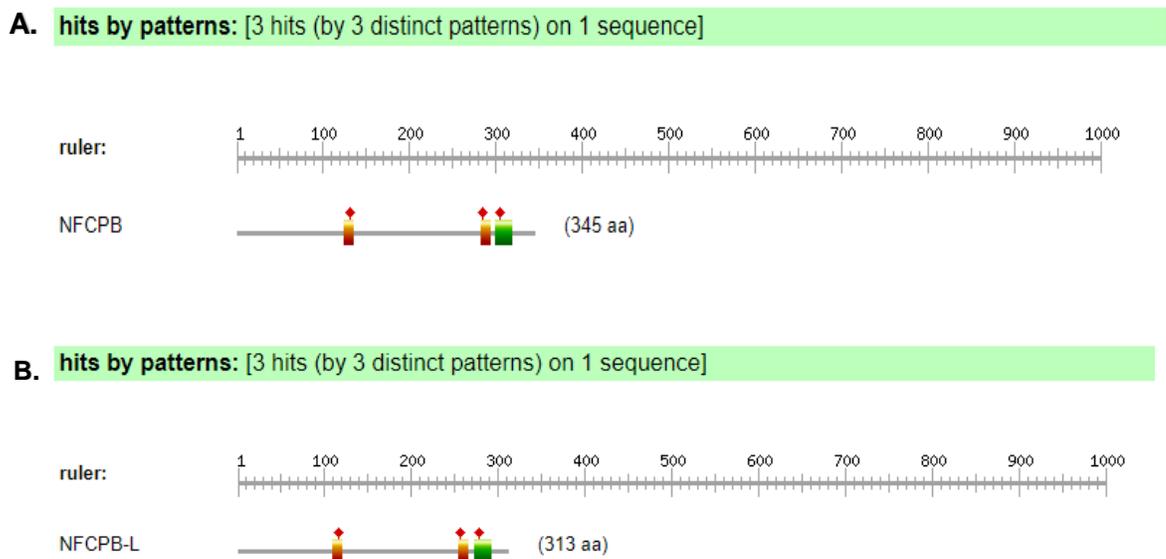


Figura 7. Patrones determinados por PROSITE para las proteínas **A.**NfCPB y **B.**NfCPB-L de *Naegleria fowleri*. El **rombo rojo** son los sitios activos.

Se encontró para las proteínas NfCPB y NfCPB-L 3 sitios de Tiol-proteasas que contienen Cisteína, Histidina y Asparagina y se encontraron también sitios de N-glicosilación, uno para la proteína NfCPB y dos para la proteína NfCPB-L; los sitios de N-glicosilación se resumen en la siguiente tabla (**tabla 4**):

NfCPB			
PATRON	ID	NÚMERO DE AA	AMINOÁCIDOS
N-(P)-[ST]-[P]	ASN-	305-308	NSWS
	GLICOSILACIÓN		

NfCPB-L			
PATRON	ID	NÚMERO DE AA	AMINOÁCIDOS
N-(P)-[ST]-[P]	ASN-	279-282	NSWG
	GLICOSILACIÓN	288-291	NGFF

Tabla 4. Patrones determinados por PROSITE en las proteínas NfCPB y NfCPB-L. El ID corresponde al nombre del sitio funcional encontrado. Se especifica las regiones entre los residuos en la cual está presente el patrón funcional y los aminoácidos involucrados en dicha región.

7.3. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*

Por medio del servidor NSP@ se realizó una predicción consenso con 6 algoritmos diferentes: DPM⁷², DSC⁷³, GOR IV⁷⁴, PHD⁷⁵, PREDATOR⁷⁶, SOPM⁷⁷; los resultados de este consenso para las proteínas NfCPB y NfCP-L se muestran en la **figura 8** y la **figura 9** respectivamente.

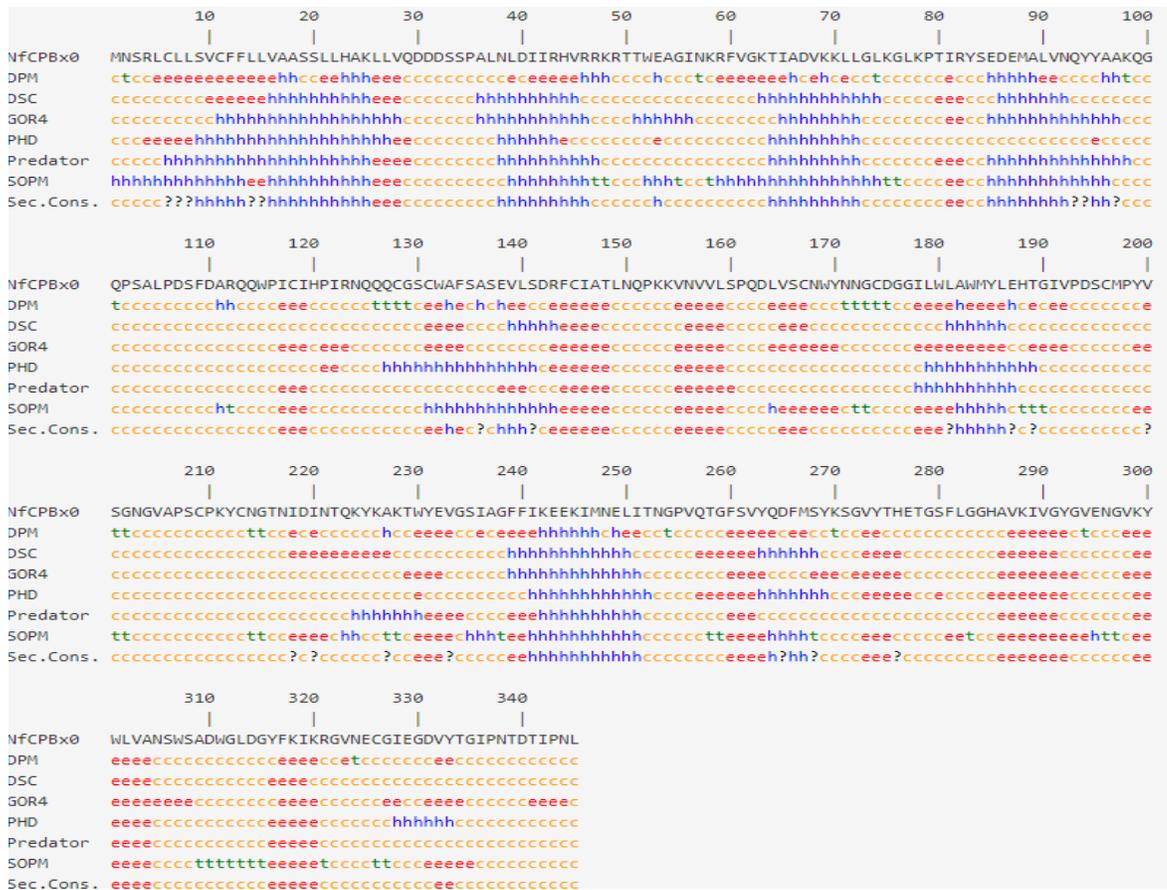


Figura 8. Consenso de la estructura secundaria de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* generado por NSP@ con base en los 6 algoritmos usados en los programas seleccionados para la predicción (DMP, DSC, GOR4, PHD, PREDATOR, SOMP). En la parte inferior se puede observar la secuencia consenso (Sec. Cons). Las regiones están indicadas; **Hélices α** (letra h), **Láminas β** (letra e), **Bucles** (letra c).

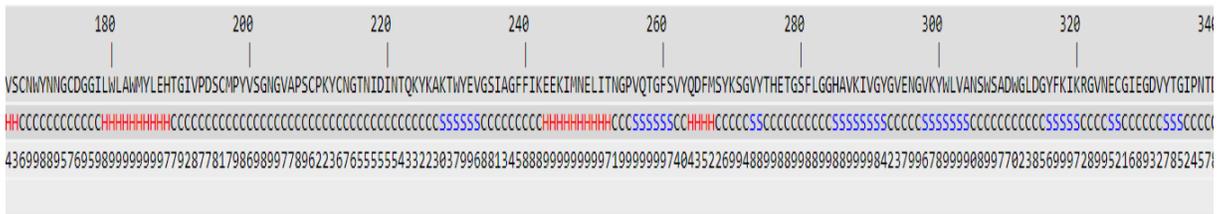


Figura 10. Estructura secundaria de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* generado por PSSpred del servidor I-TASSER. Hélices α (letra H), láminas β (letra S) y bucles (letra C). **Sequence:** secuencia problema. **Prediction:** predicción realizada por el programa. **Conf. Score:** puntuación de la predicción.

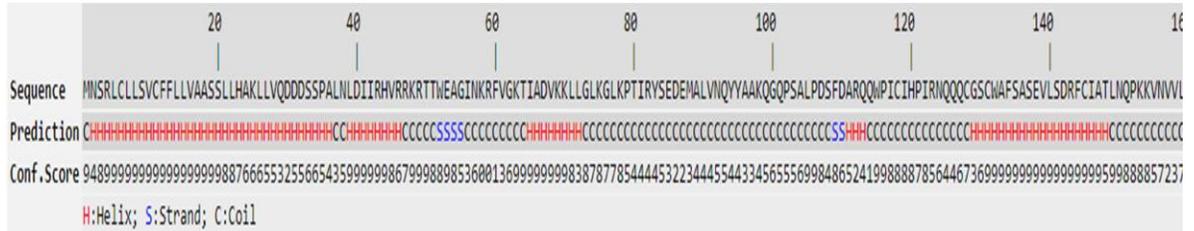


Figura 11. Estructura secundaria de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* generado por PSSpred del servidor I-TASSER. Hélices α (letra H), láminas β (letra S) y bucles (letra C). **Sequence:** secuencia problema. **Prediction:** predicción realizada por el programa. **Conf. Score:** puntuación de la predicción.

Para la proteína NfCPB (**figura 10**), I-TASSER reporta 5 Hélices α comprendidos por los aminoácidos 3-23, 39-45, 65-72, 131-147, 179-188 y 243-252, aunque el programa reporta más hélices, no se tuvieron en cuenta por que no cumplían con el criterio de inclusión o el número de residuos necesarios (3.6)⁶⁵; también se evidenció que la proteína cuenta con 3 láminas β comprendida en los residuos 255-266, 285-291, 299-305. En cuanto a la proteína NfCPB-L (**figura 11**) se reportaron 6 hélices α ubicadas en los residuos 2-19, 31-39, 59-65, 116-133, 161-170 y 215-

224; se evidencian 3 láminas β comprendidas en los residuos 229-234, 257-263, 273-278.

En la **figura 12** se muestra el factor B- normalizado de las proteínas NfCPB (**figura 12a**) y NfCPB-L (**Figura 12b**), en el cual los valores que son superiores a cero determinan residuos menos estables (más flexibles) y los valores negativos indican mayor estabilidad (menos flexibilidad) del residuo dentro de la estructura.⁷⁹

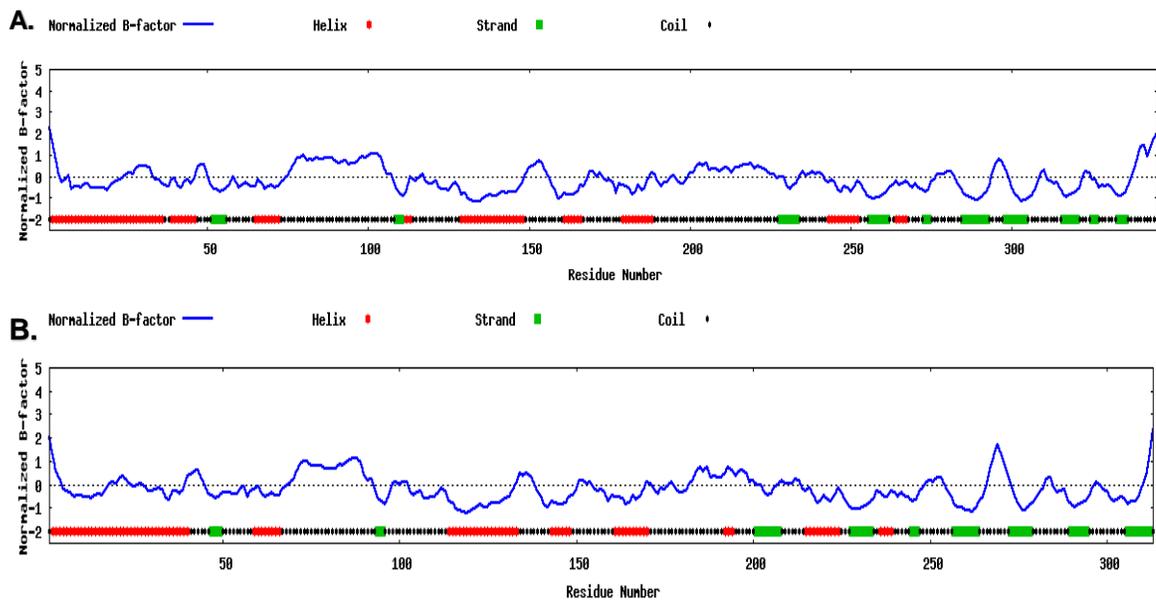


Figura 12. Predicción del factor normalizado de las proteínas **A.**NfCPB y **B.**NfCPB-L; hélices α (color rojo), láminas β (color verde) y bucles (color negro). Puntaje de cada aminoácido (línea color azul).

Los valores reportados en la **figura 12** indican que la proteína NfCPB tuvo valores negativos en 2 de las hélices de mayor tamaño (**figura 12 a**), las cuales corresponden a los residuos 3-36 y 129-148; en cuanto a las láminas, se encontraron valores negativos en 3 de las láminas de mayor tamaño,

correspondientes a los residuos 228-233, 284-292 y 298-304. Con estos resultados se puede concluir que estos fragmentos son estructuras más estables (menos flexibles). La proteína NfCPB-L presentó valores negativos en 2 de las hélices de mayor tamaño, las cuales corresponden a los residuos 2-40 y 114-133; las láminas presentaron un valor negativo en los residuos 229-234, 257-263, 273-278 (**figura 12 b**).

Antes de la determinación del modelo tridimensional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L, I-TASSER realizó alineamientos a través del servidor LOMETS⁸¹, que utiliza los programas FFAS-3D, HHsearch, MUSTER, pGenTHREADER, PPAS, PRC, PROSPECT2⁸⁴, SP3, and SPARKS-X. La base de datos utilizada por LOMETS para el alineamiento de secuencias es la PDB. I-TASSER reporta las 10 secuencias con mayor puntuación Z basadas en el promedio realizado por LOMETS (**figura 13**).

A.

Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.
1	5fpwA	0.37	0.33	0.83	3.67	Download
2	1pbhA	0.46	0.40	0.82	3.58	Download
3	5fpwA	0.39	0.33	0.82	4.97	Download
4	5fpwA	0.38	0.33	0.83	2.16	Download
5	1by8A	0.28	0.29	0.86	1.61	Download
6	1pciA	0.28	0.29	0.87	4.19	Download
7	3pdfA	0.38	0.33	0.65	2.35	Download
8	3pbhA	0.43	0.40	0.83	4.50	Download
9	5fpwA	0.38	0.33	0.83	4.01	Download
10	1pbhA	0.42	0.40	0.86	5.61	Download

B.

Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.
1	5fpwA	0.32	0.34	0.91	3.93	Download
2	4n4zA	0.36	0.38	0.89	3.55	Download
3	5fpwA	0.34	0.34	0.91	5.17	Download
4	5fpwA	0.35	0.34	0.90	2.16	Download
5	1by8A	0.26	0.28	0.94	1.60	Download
6	3qj3A	0.26	0.33	0.95	3.95	Download
7	3qj3A	0.27	0.33	0.95	2.41	Download
8	4i04A	0.42	0.40	0.87	4.28	Download
9	5fpwA	0.33	0.34	0.91	4.26	Download
10	1by8A	0.26	0.28	0.94	5.24	Download

Figura 13. Listado de las diez mejores alineaciones realizadas por LOMETS para las proteínas **A.** NfCPB y **B.** NfCPB-L de *Naegleria fowleri*. **PDB Hit:** código de acceso al PDB. **Iden 1:** porcentaje de identidad de la región alineada de la plantilla frente a la secuencia de NfCPB y NfCPB-L. **Iden 2:** porcentaje de identidad de la totalidad de la plantilla frente a la secuencia de NfCPB y NfCPB-L. **Cov:** cobertura de alineación. **Norm. Z-Score:** puntuación Z normalizada. Los valores mayores a uno significan un buen alineamiento. **Download Align:** opción de descarga del alineamiento.

Para NfCPB (**figura 13a**), el alineamiento número seis corresponde a la estructura cristalina de la proteína procaricaína de *Carica papaya*, su porcentaje de cobertura fue de 87% contando con un alineamiento de 300.2 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB, la procaricaína dio inicio a estudios sobre el comportamiento de activación y posible inhibición de las cisteínprotesas⁸⁹; en el alineamiento número uno encontramos a la estructura cristalina de la proteína proCatepsina B S9 de *Trypanosoma congolense*, es importante resaltar que el porcentaje de cobertura es del 83%, es decir, hay un alineamiento de 286.4 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB (345 aminoácidos). También se evidenció que en siete alineamientos se introdujeron gaps en la primera parte de la secuencia,

correspondiente a los residuos 1-33, y que en el alineamiento número siete se introdujo un gap correspondiente a los aminoácidos 2-103.

Para la proteína NfCPB-L (**figura 13b**) el alineamiento número seis corresponde a la estructura cristalina de la proteína Catepsina L-L que se encuentra en el intestino medio de *Tenebrio molitor*, su porcentaje de cobertura fue de 95% contando con un alineamiento de 298.3 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB-L; en el alineamiento número diez encontramos a la estructura cristalina de la proteína Procatepsina K de *Homo sapiens*, es importante resaltar que esta catepsina está presente en los osteoclastos y que juegan un papel primordial en la reabsorción de los huesos⁹⁶; El porcentaje de cobertura es del 94%, es decir, hay un alineamiento de 295 aminoácidos sobre el total de residuos de NfCPB-L (314 aminoácidos). Los gaps en la primera parte de la secuencia en NfCPB-L solo se vieron en los alineamientos 1-4, ocho y nueve, también se vio un patrón similar a NfCPB correspondiente a los residuos 1-33.

Después del alineamiento múltiple con LOMETS, I-TASSER generó un conjunto de conformaciones estructurales llamados “señuelos” usando el programa SPIKER, este conjunto de señuelos se logra agrupándolos con base en su similitud estructural, teniendo como producto final un informe de los cinco mejores modelos para las proteínas NfCPB y NfCPB-L^{90, 91}. Para la determinación del modelo tridimensional se usaron parámetros tales como puntaje C y puntaje TM.

I-TASSER muestra cinco posibles estructuras para las proteínas NfCPB y NfCPB-L respectivamente; teniendo en cuenta los parámetros mencionados anteriormente se escogieron los siguientes modelos (**Figura 14 y 15**).



Figura 14. Predicción del modelo tridimensional de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER y visualizado por Swiss-Pdb. Hélices α en color amarillo. Láminas β en color rojo. Bucles y giros en color blanco.

El modelo escogido para la proteína NfCPB (**figura 14**) posee un puntaje C de 0.12 y una puntuación TM 0.74 ± 0.11 ; este modelo está entre el rango de valores de una predicción confiable, el puntaje C está cercano a 0, y la puntuación TM supera el valor de 0.5 indicando así una aproximación a la topología real de la proteína. También se evidencia en este modelo que las hélices α (color amarillo) comprenden los residuos 3-22, 39-44, 65-71, 99-10, 111-114, 131-146, 161-166, 179-188, 243-

252, y 265-267; las láminas β (color rojo) comprenden los residuos 51-55, 91-93, 123-125, 158-160, 192-194, 234-236, 256-264, 268-273, 280-295, 298-308, y 315-321. Los bucles (color blanco) comprenden el resto de la estructura.

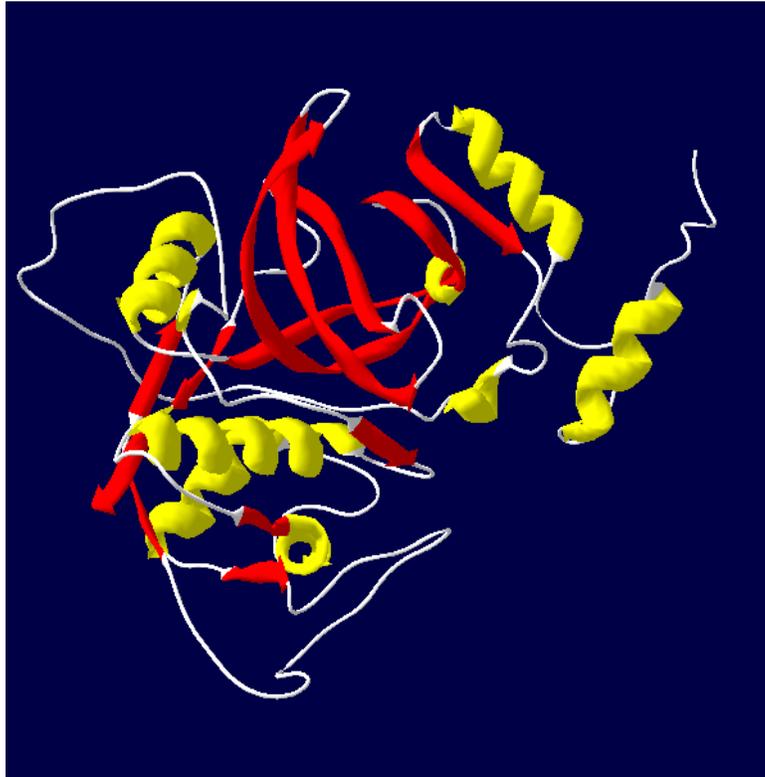


Figura 15. Predicción del modelo tridimensional de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER y visualizado por Swiss-Pdb. Hélices α en color amarillo. Láminas β en color rojo. Bucles y giros en color blanco.

El modelo escogido para la proteína NfCPB-L (**figura 15**) posee un puntaje C de 0.93 y una puntuación TM 0.84 ± 0.08 ; este modelo está entre el rango de valores de una predicción confiable, el puntaje C está cercano a 1, y la puntuación TM supera el valor de 0.5 indicando así una aproximación a la topología real de la proteína. En este modelo las hélices α (color amarillo) comprenden los residuos 10-19, 32-41, 59-62, 99, 116-131, 143-148, 161-170, 225-224 y 237-239; las láminas β

(color rojo) comprenden los residuos 45-49, 108-110, 140-142, 174-176, 204-206, 209-211, 228-236, 240-245, 252-267, 272-282, 289-295, 306-308 y 310-311. Los bucles (color blanco) comprenden el resto de la estructura.

El siguiente paso de I-TASSER es mostrar la región de unión a ligando, los residuos presentes en esa región y el nombre del posible ligando. Este proceso llevó acabo con dos programas, COFACTOR⁹⁷ que deduce la función de las proteínas haciendo una comparación estructural y COACH⁹⁸ que realiza un alineamiento múltiple de ligandos reportados en el PDB; a esto le siguió una búsqueda de sitios de unión a ligando en la base de datos curada de alta calidad BioLiP. (figura 16 y 17).

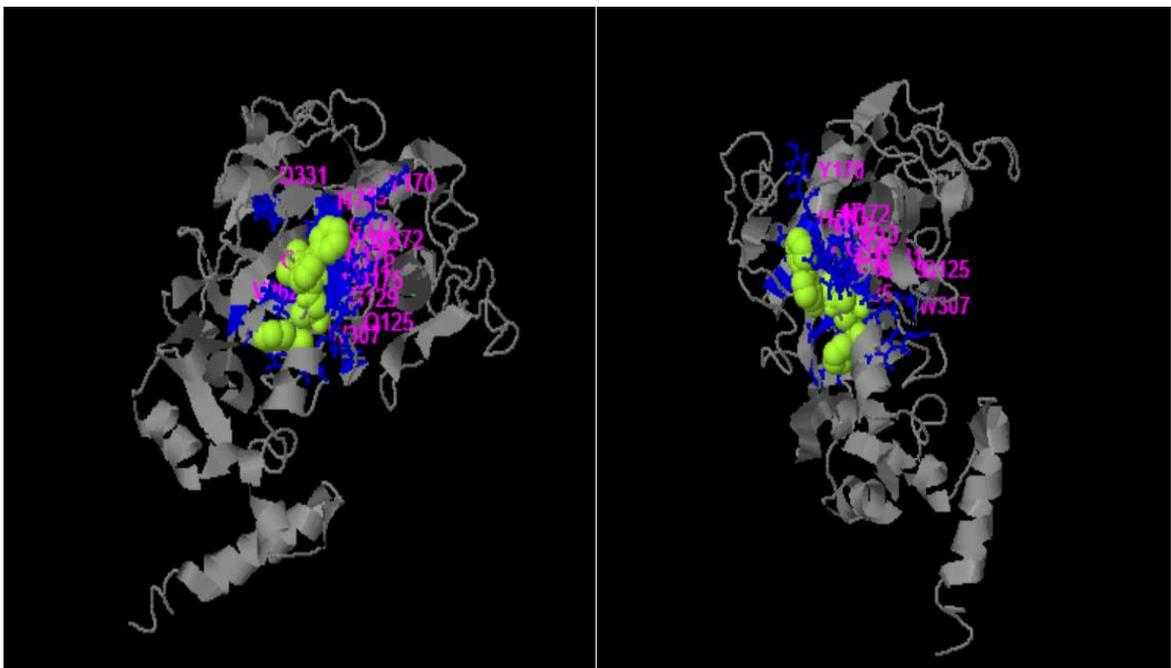


Figura 16. Modelo tridimensional del sitio de unión a ligando de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER. La región de color azul representa los residuos involucrados en el sitio de unión-ligando. La región de color verde representa el ligando. Los números y letras de color rosa corresponden a la posición y aminoácido involucrados en el sitio de unión a ligando.

La información reportada por BioLip en la **figura 16** para la proteína NfCPB dejó en evidencia un sitio de unión al ligando comprendido por los residuos Q125, G129, C131, W132, Y170, N172, D175, G176, G177, I178, L179, V262, Y284, T285, H286, W307, D331. El nombre del ligando reportado en la base de datos de BioLip es 1-[2-(3-Bifenil)-4-Metilvaleril]Amino-3-(2-Piridilsulfonil) Amino-2-Propanona. Esta molécula es la encargada de realizar la hidrólisis de proteínas tales como el colágeno y la fibronectina, convirtiéndolas en polipéptidos o aminoácidos más pequeños por medio del clivaje de sus enlaces peptídicos¹²⁴.

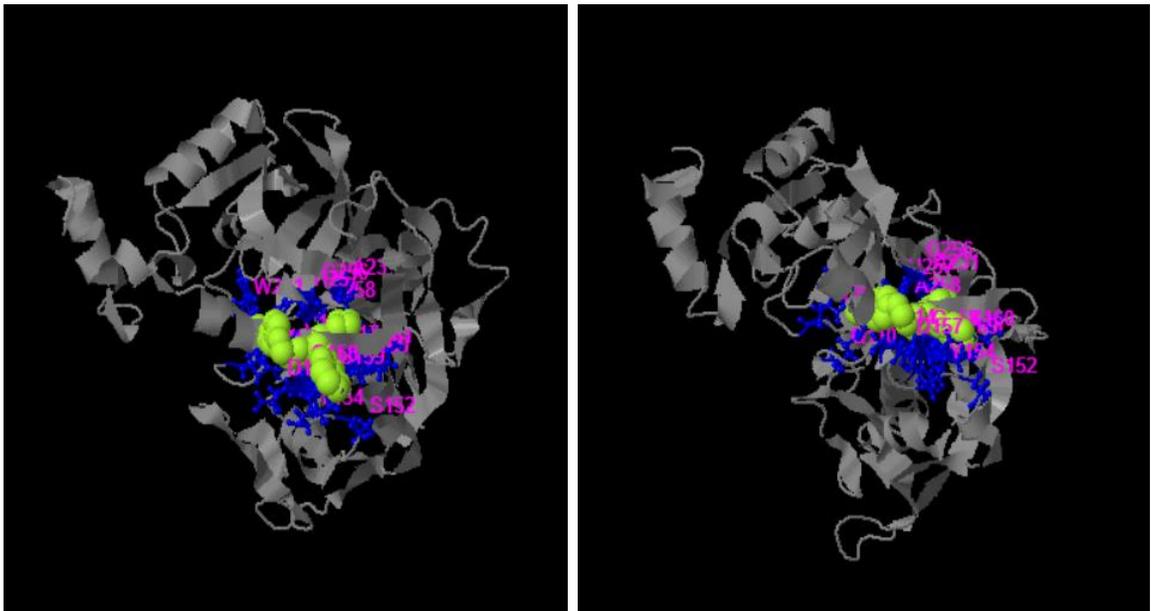


Figura 17. Modelo tridimensional del sitio de unión a ligando de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* generado por I-TASSER. La región de color azul representa los residuos involucrados en el sitio de unión-ligando. La región de color verde representa el ligando. Los números y letras de color rosa corresponden a la posición y aminoácido involucrados en el sitio de unión a ligando.

Para la proteína NfCPB-L (**figura 17**), BioLip dejó en evidencia el sitio un sitio de unión al ligando que está comprendido por los ligandos Q110, G114, C116, W117, S152, Y154, D157, G158, G159, Y160, L161, A231, G256, H257, A258, W281. El

Nombre del ligando reportado en la base de datos BioLip es la arilaminoetil amida heterocíclica, esta molécula está descrita como la responsable de quitar la cadena invariable del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y unirse a las glucoproteínas (inmunoglobulinas) para proceder a hacer su respectiva catálisis^{125,126}.

Finalmente, los modelos tridimensionales de las proteínas NfCPB y NfCPB-L que se obtuvieron a través de I-TASSER requieren una validación de su estabilidad estructural. Esto se logra mediante el análisis de los ángulos de torsión (ψ psi y ϕ phi) que determinan el plegamiento de las proteínas⁹⁹. Para la visualización de los ángulos de torsión de las proteínas NfCPB y NfCPB-L se usó la gráfica de Ramachandran, en la **figura 18** y **figura 19** respectivamente.

Las regiones favorecidas (las cuales están delimitadas por líneas amarillas) corresponden a los sitios donde hay mayor probabilidad de que los ángulos que conforman la estructura proteica sean posibles, mientras que las regiones permitidas (lugares en donde los átomos están más cerca pero no se alcanzan a chocar, están delimitadas por líneas azules) y las no permitidas (Hay un choque de átomos) corresponden a sitios con menor probabilidad de acercamiento al ángulo correcto. ¹⁰²

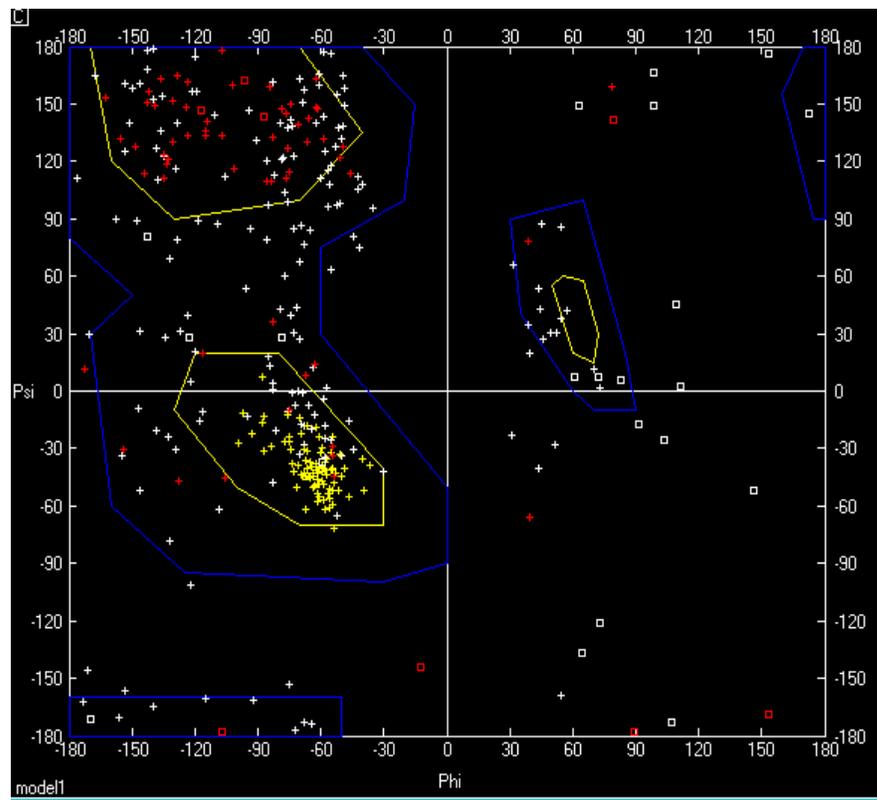


Figura 18. Conformación estereoquímica de los ángulos del modelo de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* según la gráfica de Ramachandran. **Zona color amarillo:** regiones favorables. **Zona color azul:** regiones permitidas. **Cruces color amarillo:** hélices α . **Cruces color rojas:** láminas β . **Cruces color blanco:** bucles y giros.

Para la validación de la proteína NfCPB de *Naegleria fowleri* obtenida mediante Swiss-Pdb Viewer gracias a la gráfica de Ramachandran mostró que 215 aminoácidos (62.4%) están entre la zona favorable, 106 aminoácidos (30.64%) están en la región permitida, y que 24 aminoácidos (6.96%) se encuentran en la región no permitida.

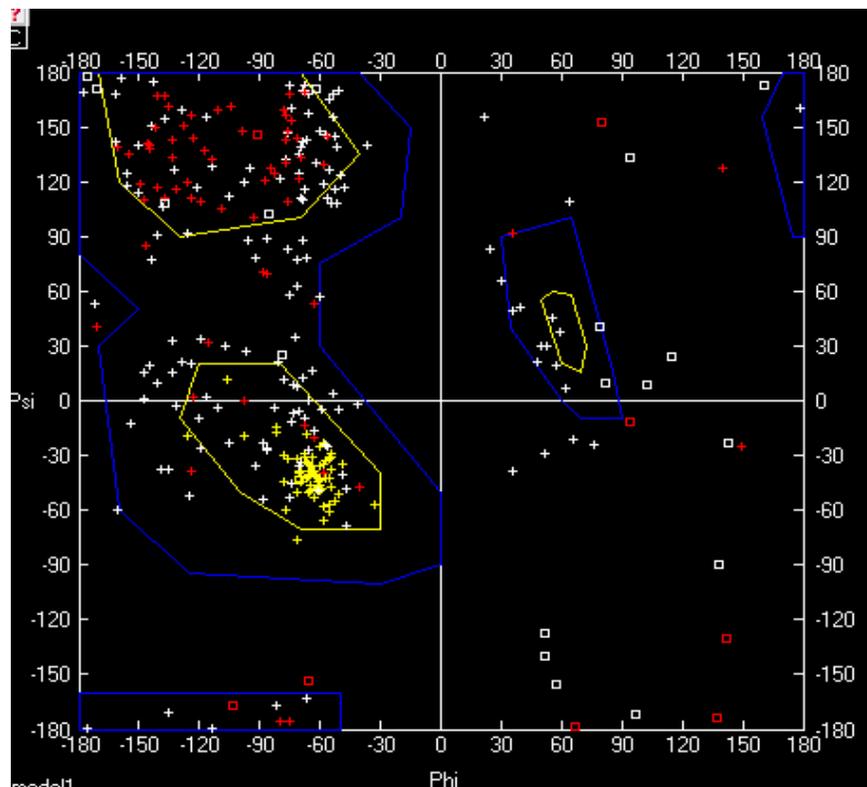


Figura 19. Conformación estereoquímica de los ángulos del modelo de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* según la gráfica de Ramachandran. **Zona color amarillo:** regiones favorables. **Zona color azul:** regiones permitidas. **Cruces color amarillo:** hélices α . **Cruces color rojas:** láminas β . **Cruces color blanco:** bucles y giros.

Para la validación de la proteína NfCPB-L de *Naegleria fowleri* obtenida mediante Swiss-Pdb Viewer gracias a la gráfica de Ramachandran mostró que 198 aminoácidos (63.05%) están entre la zona favorable, 91 aminoácidos (30.64%) están en la región permitida, y que 25 aminoácidos (7.96%) se encuentran en la región no permitida.

Basándose en los resultados mostrados por Swiss-Pdb Viewer, y teniendo en cuenta la distribución de aminoácidos en las zonas favorables de la gráfica de Ramachandran, es posible deducir que el modelo constituye un buen acercamiento a la estructura real de las proteínas NfCPB y NfCPB-L.

8. DISCUSIÓN

La meningoencefalitis primaria amebiana (PAM) es una enfermedad de amplia distribución; aunque se han reportado más de 440 casos a nivel mundial desde 1962^{104,106}, estudios indican que la incidencia de PAM es muchísimo mayor, pero la estadística mundial se ha visto afectada por la gran tasa de casos no reportados y subdiagnosticados¹⁰³. En Colombia el panorama no es ajeno al subdiagnóstico, ya que todavía no se consideran las meningitis parasitarias como un posible diagnóstico.

PAM es causado por *Naegleria fowleri*, la única subespecie del género *Naegleria* patógena para los seres humanos. Actualmente los estudios se enfocan en el análisis de las proteínas de membrana para elucidar mecanismos de patogenicidad que permitan evidenciar posibles sitios para dianas terapéuticas. Las proteínas NfCPB y NfCPB-L han mostrado tener un gran potencial investigativo, ya que entre sus funciones se han descrito gran parte de las actividades proteolíticas sobre las Inmunoglobulinas, fibronectina, hemoglobina y albúmina¹³.

Aunque se ha demostrado lo esencial que son estas catepsinas B en la patogénesis de *Naegleria fowleri*, todavía no se ha realizado una cristalización de las proteínas y tampoco existen modelos bioinformáticos que permitan analizar sus estructuras tridimensionales.

Este estudio se enfocó en proponer un modelo tridimensional para las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*, iniciando desde el análisis de sus estructuras primarias y secundarias, y de esta manera aportar al esclarecimiento de su función en *Naegleria fowleri* y su papel en el desarrollo de PAM.

Las propiedades fisicoquímicas obtenidas por PROTPARAM permitieron establecer el peso molecular, el índice de estabilidad, el punto isoeléctrico, el tiempo de vida, el índice alifático y el promedio general de hidropatía de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*.

El índice alifático, que se define como el volumen relativo que ocupan las cadenas alifáticas laterales de los aminoácidos Alanina, Valina, Isoleucina y Leucina; el índice alifático y la termoestabilidad de la proteína son directamente proporcionales, es decir, la termoestabilidad aumenta cuando el índice alifático aumenta¹⁰⁷. La proteína NfCPB tiene un índice alifático de 81.96, sugiriendo que la proteína es bastante termoestable, este índice se debe a su alto porcentaje de Lisina y Valina que la componen (6.70% y 7.30% respectivamente); Para la proteína NfCPB-L, el índice alifático es 74.29, también es una proteína termoestable, y su índice alifático se debe a su porcentaje de Alanina y Valina (7.50%). Es importante destacar que para futuros estudios de las proteínas se debe tener en cuenta el dato del índice alifático para llevar a cabo aislamiento y purificación de las mismas.

Usualmente, los compuestos que tienen un peso molecular de 10.000 a 100.000 Da y un índice de inestabilidad menor de 40 son inmunógenos potentes ^{108,109}; La proteína NfCPB tiene un peso molecular de 38404.94 Da y un índice de inestabilidad

de 34.63, mientras que la proteína NfCPB-L tiene un peso molecular de 34154.82 y un índice de inestabilidad de 32.20. Con estos valores, las proteínas NfCPB y NfCPB-L están en el rango propuesto para ser inmunógenos potentes, haciéndolas capaces de desencadenar entonces una respuesta inmune.

El punto isoeléctrico es aquel pH en el que hay un equilibrio de cargas, es decir, las cargas positivas y las cargas negativas son iguales, haciendo así que la carga neta del aminoácido sea cero logrando generar una quietud total en un campo eléctrico¹¹⁰. Las proteínas NfCPB y NfCPB-L tienen un punto isoeléctrico de 7.66 y 7.73 respectivamente, haciendo a ambas proteínas aptas para realizar un aislamiento en campo eléctrico.¹¹¹

El índice de estabilidad hace referencia a la estabilidad de la proteína en un tubo de ensayo, si se obtienen valores superiores a 40, estaríamos hablando de una proteína inestable⁴². Las proteínas NfCPB y NfCPB-L tienen un índice de inestabilidad de 34.63 y 32.20 respectivamente, haciéndolas unas proteínas estables. Como se mencionó anteriormente, las proteínas NfCPB y NfCPB-L hacen parte de los mecanismos de invasión independientes al contacto, por ende, estas proteínas no son lábiles o sensibles a los daños con tratamientos químicos y mecánicos, permitiendo así su uso para estudios experimentales.

El tiempo de vida media es una predicción del tiempo que se demora en desaparecer la mitad de la proteína una vez es sintetizada por la célula, este valor depende del aminoácido que ocupa la porción amino terminal de la misma; por ejemplo, la arginina, lisina, fenilalanina y glutamina generan un tiempo de vida media

reducido al ocupar este espacio ya que su cadena lateral contiene un grupo amino protonable, y su ionización depende del pH, mientras que la metionina, glicina, prolina o valina pueden alargar dicho promedio de vida. Las proteínas NfCPB y NfCPB-L poseen un tiempo de vida media de 30 horas en reticulocitos de mamíferos, >20 horas en levaduras y >10 horas en *E.coli*. Este resultado de tiempo de vida media puede ser fundamental para la determinación e identificación de su residuo N terminal por medio de métodos experimentales^{112,113} como la degradación de Edman. La vida media de las proteínas es una característica muy variable y está relacionada con la funcionalidad o la ubicación de las mismas dentro de la célula¹⁰⁰. El promedio general de hidropatía (GRAVY) es la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos, dividido por el número de residuos en la secuencia¹¹⁴, esta suma, medida en kJ/mol, es la energía necesaria para transferir un segmento de secuencia de longitud definida de un medio hidrofóbico a un medio hidrofílico; este valor de hidropatía permite tener indicios sobre la topología, dominios transmembranales y probables sitios antigénicos expuestos en la superficie de la proteína¹¹¹. Para las proteínas NfCPB y NfCPB-L se obtuvieron valores de -0.261 y -0.189 respectivamente, indicando que son proteínas hidrofílicas.

Para comprobar la hidropatía de las proteínas NfCPB y NfCPB-L, se usó la escala Kyte&Doolittle, PROTSCALE usó un tamaño de ventana de 7, este tamaño de ventana fue muy útil para encontrar las regiones expuestas haciéndolas potencialmente antigénicas¹¹⁶. Este análisis mostró que las proteínas son altamente

hidrofílicas, coincidiendo con los resultados arrojados por PROTPARAM en cuanto al promedio GRAVY.

Se ha descrito que las regiones teóricamente asociadas con la falta de compactación de las proteínas bajo condiciones fisiológicas normales son aquellas en donde hay bajos niveles de aminoácidos hidrofóbicos junto a largos intervalos de residuos hidrofílicos, dando como resultado estructuras nativas desordenadas⁵⁸. GLOBPROT realizó un análisis de regiones desordenadas en las proteínas NfCPB y NfCPB-L. La predicción de regiones desordenadas reveladas sugiere que NfCPB tiene 4 regiones flexibles y desordenadas (residuos 101-108, 166-175, 193-217, 328-343) y que NfCPB-L posee 5 regiones flexibles (residuos 96-100, 148-162, 171-200, 278-289, 304-309); estos resultados podrían indicar que esas regiones estarían involucradas en funciones importantes para *Naegleria fowleri*. Los resultados combinados de GLOBPROT y PROTSCALE muestran una coincidencia en cuanto a la predicción de una región desordenada entre los residuos 180-250 y 150-300 para NfCPB y NfCPB-L respectivamente.

Se ha descubierto que los segmentos desordenados de las proteínas contienen importantes sitios funcionales predichos como motivos lineales⁵⁸. En la identificación de motivos, en las proteínas NfCPB y NfCPB-L se encontraron 3 regiones TioI-proteasas que contienen Cisteína, Histidina y Asparagina como sitio activo (entradas PS00139, PS00639 y PS00640)^{117,118,119}, y tres sitios N-glicosilación, uno para NfCPB y el dos para NfCPB-L. Las tioI-proteasas son endopeptidasas que trabajan a partir de la catálisis por intermedio de un tioéster, y

se ve facilitada por una cadena lateral de histidina cercana; una Asparagina completa la tríada catalítica esencial¹²⁰. Los sitios de N-glicosilación se han descrito en bacterias Gram negativas, como sitios importantes para la patogénesis, ya que se ven involucrados en la adhesión, protección contra la degradación proteolítica, en el incremento de la solubilidad y en la variación antigénica¹²¹. Ya que las proteínas NfCPB y NfCPB-L son proteínas de superficie, es posible resaltar la importancia de los sitios de N-glicosilación para generar una protección extra contra el sistema inmune del hospedero; Si se tiene en consideración la importancia de los sitios de glicosilación para la patogénesis de *Naegleria fowleri* y su interacción con el sistema inmunológico, estos sitios podrían presentar a futuro blancos terapéuticos, logrando una alteración por medio de inhibiciones de las interacciones carbohidrato-receptor.¹²¹

Para la determinación de la estructura secundaria de las proteínas se usó un consenso de programas disponibles en el servidor NSP@; la determinación y análisis de las estructuras secundarias de las proteínas contribuye enormemente a la predicción del modelo tridimensional de la misma, esta estructura secundaria se verá favorecida si se usan consensos de programas para hacer clasificaciones estructurales, brindando así aproximaciones y resultados más confiables de la estructura tridimensional¹²².

Los resultados dados por NSP@ indican que en los residuos 16-52 hay una hélice α para la proteína NfCPB, comparando ese resultado con el promedio GRAVY y la gráfica del índice de hidrofobicidad, encontraríamos una región que posiblemente

se encuentra anclada a la parte interna de la membrana de *Naegleria fowleri*, ya que dichos residuos están en la región que supera el valor de 1.6, indicando que este segmento posee propiedades hidrofóbicas. Para NfCPB-L, la hélice α que va de los residuos 3-19 sería el segmento con propiedades hidrofóbicas.

Es importante resaltar que los residuos de las hélices mencionadas se encuentran dentro la región transmembranal obtenida por el consenso de programas DAS, SOSUI, TOPPRED2, TMAP, TMPRED, SPLIT4, PHDHTM, TMHMM2, HMMTOP2. Se puede también observar que, dentro de la conformación de las hélices mencionadas, para NfCPB, 20 de sus 36 residuos son no polares y 8 son polares (mayoría hidrofóbicos). Para la proteína NfCPB-L, 11 de sus 17 residuos son apolares y 4 son polares. Si se tiene en cuenta la predicción de la estructura secundaria obtenida por I- TASSER contra la estructura de NPS@, estas coincidieron en su mayoría con la posición y cantidad de los residuos que conforman las hélices α y láminas β .

La estructura de una proteína es la combinación de fragmentos rígidos y flexibles, esta combinación en conjunto es supremamente necesaria para un funcionamiento correcto de la misma; las regiones rígidas son aquellas en donde hay una menor movilidad de átomos, haciéndolas regiones más estables, mientras que las regiones flexibles son aquellas que gracias a su movilidad de átomos pueden realizar cambios conformacionales que pueden estar implicados en interacciones con otras moléculas¹²³. En cero absolutos de temperatura, los átomos de una proteína permanecen en una posición de equilibrio y con una energía muy baja; a medida

que la temperatura aumenta, la energía hace que los átomos oscilen alrededor de la posición de equilibrio, estos alcances de oscilación varían a menudo del modelo tridimensional de la proteína y de la interacción con los átomos ligandos y solventes⁸⁰. El factor B normalizado es un factor que analiza y proporciona datos sobre la movilidad térmica de los átomos en una estructura proteica para así determinar la flexibilidad y estabilidad de los diferentes segmentos que componen a dicha proteína⁷⁹, todo esto, con el fin de dar un indicio sobre las posibles interacciones que puede realizar con otras estructuras⁷⁸; en la **figura 12**, podemos deducir que las láminas y hélices que tienen valores negativos (estructuras rígidas) podrían ser segmentos poco variantes, por ende, esta estabilidad podría ser importante en el correcto funcionamiento de las mismas.

Ahora, si se hace una correlación de los valores de predicción en las **figuras 10 y 11** con el valor del factor B normalizado, podemos inferir que en la **figura 12**, todos los valores positivos (regiones flexibles) se ubicaron en los residuos que poseen una puntuación menor a 7 en la predicción de estructura secundaria, indicando que los residuos flexibles, al ser estructuras con una mayor movilidad atómica, generan una predicción con valores menores a 7.

Se vio un patrón de introducción de gaps en las secuencias alineadas por LOMETS en los residuos 1-33, y en un alineamiento se introdujo un gap correspondiente a los aminoácidos 2-103 para la proteína NfCPB, mientras que NfCPB-L mostró un comportamiento muy similar a NfCPB en la introducción de gaps en los residuos 1-33; esto indica que en esta región hay elementos que son muy propios de las

proteínas, llegando a estar involucrados en las funciones específicas de las mismas para llevar a cabo la patogénesis de PAM.

La evaluación cuantitativa de cada modelo tridimensional se realizó por medio de un puntaje C, el cual es calculado con base en las alineaciones de la plantilla y los parámetros de convergencia de cada modelo. El puntaje C está entre los rangos de -5.2 a 2, donde un valor cercano a 0 equivale a un modelo de mayor confianza; los valores mayores a -1.5 indican una buena topología del modelo.^{94, 95} El puntaje TM se usó para medir la similitud conformacional entre dos estructuras ya que es menos sensible a las variaciones estructurales locales. Para lograr una topología correcta de la estructura, el valor del puntaje TM debe ser mayor a 0.5, un valor menor a 0.17 indica un modelo de topología basado en estructuras tomadas al azar.⁹⁵

La predicción del ligando-receptor de las proteínas NfCPB y NfCPB-L evidenció que, en estas regiones, la mayoría de residuos son apolares, indicando que podrían interactuar con las regiones hidrofóbicas de las moléculas que actúan como ligando.

Para la proteína NfCPB el ligando reportado por BioLip es la 1-[2-(3-Bifenil)-4-Metilvaleril]]Amino-3-(2-Piridilsulfonil) Amino-2-Propanona, como se describió anteriormente, este ligando cliva el colágeno y la fibronectina por medio de hidrólisis. Dicho esto, este estudio sugiere que este ligando se une a la región rica en azúcares que hay tanto en la fibronectina, como en el colágeno.

La fibronectina es una glucoproteína que se encuentra en casi todos los espacios extracelulares de los tejidos, fibroblastos, células epiteliales, plasma y otros

fluidos¹²⁷. Ya que esta glicoproteína se encuentra ampliamente distribuida en todo el cuerpo, y NfCPB se ancla a ella, se puede sugerir que esta unión es el primer paso para generar un daño celular el epitelio olfativo y después en el neuroepitelio, provocando entonces la herniación cerebral.

Se describe también el clivaje del colágeno; esta proteína se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, y es secretado por células como los fibroblastos¹²⁸. NfCPB podría actuar principalmente en el colágeno tipo III y IV; el colágeno tipo IV está principalmente en células epiteliales, garantizando así el daño celular. En cuanto a el colágeno tipo III, se sintetiza en la glía, y es fundamental para el equilibrio y la regulación bioquímica del crecimiento neuronal, desarrollo de los axones y dendritas, y la protección física de las neuronas contra patógenos¹³¹. Como ya se describió anteriormente, PAM se caracteriza por la rápida degeneración neuronal gracias a la exacerbación de la respuesta inmune; se puede deducir entonces que NfCPB actúa directamente en la eliminación de la primera barrera de protección neuronal, dando vía libre a otras proteínas tales como las esfingomielinasas, neuroaminidasas y lipofosfolipasas para cumplir su objetivo de desmielinización neuronal.

En cuanto a la proteína NfCPB-L, el ligando reportado por BioLip fue arilaminoetil amida heterocíclica. El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II se encuentra en células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, algunas células epiteliales y en los linfocitos B; al tener dos cadenas (α y β) su afinidad se ve determinada por la longitud de la cadena de aminoácidos del

antígeno¹²⁹, al impedir la unión del CMH clase II para la presentación antigénica, NfCPB-L gana tiempo para su propagación hacia el neuroepitelio¹³⁰.

NfCPB-L se une a las inmunoglobulinas, evadiendo así gran parte de la respuesta inmune; esto sugiere, que NfCPB-L es una proteína primordial para la entrada exitosa de *Naegleria fowleri* a el neuroepitelio, y es fundamental para el correcto funcionamiento de otros mecanismos de patogenicidad de la misma.

El análisis funcional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* se hizo basándose en los resultados de cada uno de los programas usados para la predicción estructural de las mismas, y con el apoyo de los datos reportados por la literatura con el fin de entender y elucidar el rol de estas proteínas en la patogénesis de PAM.

Existen algunos ángulos de torsión o diédricos que no son físicamente posibles debido al choque de los átomos presentes en la unión entre los aminoácidos¹⁰¹, el rango permitido de ángulos de una estructura es muy restrictivo, lo que limita las posibles conformaciones tridimensionales de las proteínas, haciendo que las combinaciones de ángulos de torsión no sean al azar¹⁰⁰. El modelo tridimensional de las proteínas NfCPB y NfCPB-L que se obtuvo a través de distintas herramientas computacionales cumple con los parámetros estereoquímicos de una estructura estable, esta verificación se llevó a cabo con la gráfica de Ramachandran; se deduce entonces que los dos modelos tridimensionales se aproximan a las estructuras reales de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri*.

9. CONCLUSIONES

- Las proteínas NfCPB y NfCPB-L hacen parte de los mecanismos independientes de contacto de la ameba de vida libre *Naegleria fowleri*, están compuestas por 345 y 313 aminoácidos respectivamente, son termoestables, y pesan 38404.43 y 34154.82 Da.
- Estas proteínas son altamente hidrofílicas, pero posee regiones hidrofóbicas que permiten que tengan regiones transmembrana reportadas por el consenso de programas usados.
- Los métodos computacionales usados en esta investigación permitieron hacer una aproximación al conocimiento estructural de las proteínas NfCPB y NfCPB-L, siendo importante para el entendimiento de los mecanismos de acción de éstas con base en su estructura tridimensional.
- El modelo tridimensional de la proteína NfCPB está compuesta por 10 hélices α , y 11 láminas β ; y de la proteína NfCPB-L está compuesta por 9 hélices α , y 13 láminas β . Las dos estructuras están compuestas mayoritariamente por bucles y giros β .
- El sitio ligando de la proteína NfCPB reportado por BioLip es la 1-[2-(3-Bifenil)-4-Metilvaleril]]Amino-3-(2-Piridilsulfonil) Amino-2-Propanona; este ligando sería primordial para la colonización y el daño celular, haciendo que el sistema inmune monte una respuesta exacerbada, complicando el cuadro de PAM.

- Los modelos tridimensionales de las proteínas NfCPB y NfCPB-L de *Naegleria fowleri* propuestos cumplen con los parámetros esteroquímicos de las conformaciones permitidas en los polipéptidos; la gráfica de Ramachandran para NfCPB mostró que 215 aminoácidos (62.4%) están entre la zona favorable, 106 aminoácidos (30.64%) están en la región permitida, y que 24 aminoácidos (6.96%) se encuentran en la región no permitida; para NfCPB-L la gráfica de Ramachandran mostró que 198 aminoácidos (63.05%) están entre la zona favorable, 91 aminoácidos (30.64%) están en la región permitida, y que 25 aminoácidos (7.96%) se encuentran en la región no permitida, indicando que la predicción de los modelos tridimensionales de las proteínas se acercan a la realidad estructural de las mismas.

10. BIBLIOGRAFIA

1. De Jonckheere JF. What do we know by now about the genus *Naegleria*? |Experimental parasitology. 2014 Nov 30; 145:S2-9.
2. Yu Z, Miller HC, Puzon GJ, Clowers BH. Development of Untargeted Metabolomics Methods for the Rapid Detection of Pathogenic *Naegleria fowleri*. Environmental Science & Technology. 2017 Mar 29; 51(8):4210-9.
3. *Naegleria fowleri* -Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM) –Amebic Encephalitis.<https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/infection-sources.html> (consultado el 25 de septiembre de 2017).
4. Vélez M, Zapata AL, Ortiz DC, Trujillo M, Restrepo A, Garcés C. Case report and literature review of a patient with meningoencephalitis from free-living amoebae. Infectio. 2013 Sep; 17(3):153-9.
5. RÉVEILLER, F. L., SUH, S. J., SULLIVAN, K., CABANES, P. A., & MARCIANO-CABRAL, F. R. A. N. C. I. N. E. (2001). Isolation of a unique membrane protein from *Naegleria fowleri*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 48(6), 676-682.
6. Zysset-Burri DC, Müller N, Beuret C, Heller M, Schürch N, Gottstein B, Wittwer M. Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. BMC genomics. 2014 Jun 19; 15(1):496.

7. Ilzins O, Isea R, Hoebeke J. Can Bioinformatics Be Considered as an Experimental Biological Science? . arXiv preprint arXiv: 1607.04836. 2016 Jul 17.
8. Werner, E. (2005). «The Future and Limits of Systems Biology». *Science Signaling* 2005 (278). American Association for the Advancement of Science.Science's STKE. AAAS.
9. Isea, R. (2015). The Present-Day Meaning of the Word Bioinformatics. *Global Journal of Advanced Research*, 2, 70-73.
10. Cope, J. R., & Ali, I. K. (2016). Primary Amebic Meningoencephalitis: What Have We Learned in the Last 5 Years? *Current infectious disease reports*, 18(10), 31.
11. Butt CG. Primary amebic meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*. 1966 Jun 30; 274(26):1473-6.
12. Marciano-Cabral F, Cabral GA. The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007 Sep 25; 51(2):243-59.
13. Seong GS, Sohn HJ, Kang H, Seo GE, Kim JH, Shin HJ. Production and characterization of monoclonal antibodies against cathepsin B and cathepsin B-Like proteins of *Naegleria fowleri*. *Experimental Parasitology*. 2017 Sep 14.
14. Lee J, Kim JH, Sohn HJ, Yang HJ, Na BK, Chwae YJ, Park S, Kim K, Shin HJ. Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory–secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitology research*. 2014 Aug 1; 113(8):2765-76.

15. Siddiqui R, Ali IK, Cope JR, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta tropica*. 2016 Dec 31; 164:375-94.
16. Grace E, Asbill S, Virga K. *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015 Nov 1; 59(11):6677-81.
17. Khwon WJ, Park JS. Morphology and Phylogenetic Analyses of Three Novel *Naegleria* Isolated from Freshwaters on Jeju Island, Korea, During the Winter Period. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2017 Jun 12.
18. Tymi T, Skulinová K, Kavan J, Ditrich O, Kostka M, Dyková I. Heterolobosean amoebae from Arctic and Antarctic extremes: 18 novel strains of *Allovalkampa*, *Vahlkampfi* and *Naegleria*. *European journal of protistology*. 2016 Oct 31; 56:119-33.
19. DE JONCKHEERE JF. Brain-eating Amoebae: Biology and Pathogenesis of *Naegleria fowleri* Paperback—1 Jun 2016 by Ruqaiyyah Siddiqui, Ibne Karim M. Ali, Jennifer R. Cope, Naveed Ahmed Khan. Caister Academic Press. Book reviewer: Dr. Johan F. De Jonckheere. *Epidemiology & Infection*. 2017 Jun; 145(8):1737-.
20. SHIN HJ, CHO MS, JUNG SY, KIM HI, PARK S, KIM HJ, IM KI. Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2001 Nov 1; 48(6):713-7.
21. Young JD, Lowrey DM. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic

- ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *Journal of Biological Chemistry*. 1989 Jan 15; 264(2):1077-83.
22. Herbst R, Ott C, Jacobs T, Marti T, Marciano-Cabral F, Leippe M. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Jun 21; 277(25):22353-60.
23. Rojas-Hernandez S, Jarillo-Luna A, Rodríguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitology research*. 2004 Sep 1; 94(1):31-6.
24. FISCHER-STENGER KR, CABRAL GA, MARCIANO-CABRAL FR. The interaction of *Naegleria fowleri* amoebae with murine macrophage cell lines. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1990 May 1; 37(3):168-73.
25. Im KI, Ryu JS, Lee KT. Immunodepression during experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. *Kisaengch'unghak chapchi. The Korean journal of parasitology*. 1987 Dec; 25(2):195-8.
26. TONEY DM, MARCIANO-CABRAL FR. Modulation of complement resistance and virulence of *Naegleria fowleri* amoebae by alterations in growth media. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1994 Jul 1; 41(4):337-43.
27. Carrasco-Yeppez M, Campos-Rodríguez R, Lopez-Reyes I, Bonilla-Lemus P, Rodríguez-Cortés AY, de Oca AC, Jarillo-Luna A, Miliar-García A, Rojas-Hernández S. 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*. 2014 Nov 30; 145:S84-92.
28. Centers for Disease Control and Prevention. Primary amebic meningoencephalitis--Arizona, Florida, and Texas, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008 May 30. 57(21):573-7.
29. Kaushal V, Chhina DK, Ram S, Singh G, Kaushal RK, Kumar R. Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *JAPI*. 2008 Jun 1; 56:459-62.
30. Shakoor S, Beg MA, Mahmood SF, Bandea R, Sriram R, Noman F, Ali F, Visvesvara GS, Zafar A. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerging infectious diseases*. 2011 Feb; 17(2):258.
31. Chappell CL, Dresden MH. *Schistosoma mansoni*: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms. *Experimental parasitology*. 1986 Apr 1;61(2):160-7.
32. Keene WE, Pettitt MG, Allen S, Mckerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine*. 1986 Mar 1;163(3):536-49.
33. Long Y, Cao B, Yu L, Tukayo M, Feng C, Wang Y, Luo D. *Angiostrongylus cantonensis* cathepsin B-like protease (Ac-cathB-1) is involved in host gut penetration. *Parasite*. 2015;22.

34. National Center for Biotechnology Information. NCBI REference Sequence (RefSeq). [Online]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
35. UniProt. Reference Sequence (RefSeq). [Online]. Available from: <http://www.uniprot.org/>
36. Ristow P, Bourhy P, Weykamp F, Pereira C, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. PLoS Pathogens. 2007; 3(7): p. 894-903.
37. Dunn, A. L., Reed, T., Stewart, C., & Levy, R. A. (2016). Naegleria Fowleri that induces primary amoebic Meningoencephalitis: rapid diagnosis and rare case of survival in a 12-year-old Caucasian girl. Laboratory medicine, 47(2), 149-154.
38. Pugh, J. J., & Levy, R. A. (2016). Naegleria fowleri: Diagnosis, pathophysiology of brain inflammation, and antimicrobial treatments.
39. Hinestroza Gil BP. Acercamiento al estado actual de meningoencefalitis amebiana primaria en Colombia producida por Naegleria fowleri (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
40. National Center for Biotechnology Information. NCBI REference Sequence (RefSeq). [Online]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
41. EMBL-EBI. Clustal Omega. [Online].; 2018. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
42. PROTPARAM. SIB Bioinformatics Resource Portal. [Online].; ExpASY. Available from: <http://web.expasy.org/protparam/>.

43. ExPASy. A View From The web. Gross, Robert H. 4, 2001, Biotech Software & Internet Report, Vol. 2, pág. 161.
44. M. Cserzo, E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne and A. Elofsson: Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method; Prot. Eng. vol. 10, no. 6, 673-676, 1997
45. TmDAS, "DAS" - Transmembrane Prediction server [Online], 2018; Available from: <https://tmdas.bioinfo.se/DAS/index.html> .
46. Hirokawa T., Boon-Chieng S., and Mitaku S., Bioinformatics, 14 378-9 (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins.
47. SOSUI: Submit a protein sequence [Online]; Available from: http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html .
48. Resources for Bioinformatics Research; TOPPRED2 [Online]: Available from: <https://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html> .
49. Alterovitz, Gil, Benson, Roseann y Ramoni, Marco. Automation In Proteomics and Genomics. an Engineering Case-Based Approach. New Delhi: John Wiley & Sons, 2009. pág. 340.
50. Emboss, TMap [Online]: Available from: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/tmap>
51. SIB Bioinformatics Resource Portal. [Online].; ExPASy. Available from: https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html .
52. Split 4.0 SERVER, [Online]: Available from: <http://splitbioinf.pmfst.hr/split/4/>

53. Juretic, D., Zoranic, L., Zucic, D. "Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology" , J. Chem. Inf. Comput. Sci. Vol. 42, pp. 620-632, 2002.
54. PredictProtein, PHDhtm; [Online]: Available from:
<https://www.predictprotein.org/>
55. DTU Bioinformatics, TMHMM Server v. 2.0, [Online]: Available from:
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>
56. Institute of Enzymology, Budapest, Hungary, HMMTOP v. 2.9, [Online]:
Available from: <http://www.enzim.hu/~tusi/hmmtop/>
57. PROSCALE. SIB Bioinformatics Resource Portal. [Online].; ExPASy.
Available from: <http://web.expasy.org/protscale/>.
58. Understanding protein non-folding. Uversky, Vladimir N y Dunker, A Keith. 6, 2010, Biochimica et Biophysica Acta , Vol. 1804, págs. 1231-1264.
59. Prediction of Intrinsic Disorder and Its Use in Functional Proteomics. Uversky, Vladimir N, y otros. 1, 2007, Methods in Molecular Biology, Vol. 408, págs. 69-92.
60. NPS@: network protein sequence analysis. Combet, C, y otros. 3, 2000, Trends in Biochemical Sciences, Vol. 25, págs. 147-150.
61. Rost B, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. Journal of molecular biology. 1993 Jul 20;232(2):584-99.
62. Frishman D, Argos P. Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. Protein Engineering, Design and Selection. 1996 Feb 1;9(2):133-42.

63. Geourjon C, Deleage G. SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Engineering, Design and Selection*. 1994 Feb 1;7(2):157-64.
64. Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *Journal of molecular biology*. 1978 Mar 25;120(1):97-120.
65. Voet , Voet , Pratt. *Fundamentos de Bioquímica, la vida a nivel molecular*. Panamericana Médica. 2007; Segunda edición.
66. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*. 2015 Jan;12(1):7.
67. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*. 2008 Dec;9(1):40.
68. Hooft RW, Sander C, Vriend G. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. *Bioinformatics*. 1997 Aug 1;13(4):425-30.
69. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*. 1993 Apr 1;26(2):283-91.
70. Ho BK, Thomas A, Brasseur R. Revisiting the Ramachandran plot: Hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the α -helix. *Protein Science*. 2003 Nov 1;12(11):2508-22.

71. Nicolas G, Alexandre D, Manuel P, Torsten S. Swiss-Pdb. [Online].; 2016.
Available from: <http://spdbv.vital-it.ch/>.
72. Network Protein Sequence @nalysis. DPM SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD. [Online]. Available from: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_dpm.html.
73. Network Protein Sequence @nalysis. DSC SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD. [Online]. Available from: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_dsc.html.
74. Network Protein Sequence @nalysis. GOR IV SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD. [Online]. Available from: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html.
75. Network Protein Sequence @nalysis. PHD SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD. [Online]. Available from: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html.
76. Network Protein Sequence @nalysis. PREDATOR SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD. [Online]. Available from: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_predator.html.
77. Network Protein Sequence @nalysis. SOPM SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD. [Online]. Available from: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopm.html
78. Smith DK, Radivojac P, Obradovic Z, Dunker AK, Zhu G. Improved amino acid flexibility parameters. Protein Science. 2003 May 1;12(5):1060-72.

79. Yang J, Wang Y, Zhang Y. ResQ: an approach to unified estimation of B-factor and residue-specific error in protein structure prediction. *Journal of molecular biology*. 2016 Feb 22;428(4):693-701.
80. Sherwood D, Cooper J. *Crystals, X-rays and Proteins: Comprehensive Protein Crystallography*: Oxford Univ Pr; 2011.
81. Wu S, Zhang Y. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic acids research*. 2007 May 1;35(10):3375-82.
82. Shi,J., Blundell,T.L. and Mizuguchi,K. (2001) FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment specific substitution tables and structure-dependent gap penalties.*J. Mol. Biol.*, 310, 243–257.
83. Soding,J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21, 951–960.
84. Xu,Y. and Xu,D. (2000) Protein threading using PROSPECT: design and evaluation. *Proteins*, 40, 343–354.
85. Karplus,K., Karchin,R., Draper,J., Casper,J., MandelGutfreund,Y., Diekhans,M. and Hughey,R. (2003) Combining local-structure, fold-recognition, and new fold methods for protein structure prediction. *Proteins*, 53(Suppl. 6), 491–496.
86. Zhou,H. and Zhou,Y. (2004) Single-body residue-level knowledge-based energy score combined with sequence-profile and secondary structure information for fold recognition. *Proteins*, 55, 1005–1013.

87. Zhou, H. and Zhou, Y. (2005) Fold recognition by combining sequence profiles derived from evolution and from depth-dependent structural alignment of fragments. *Proteins*, 58, 321–328
88. Vermelho, A. B., Branquinha, M. H., Levy, C., Santos, A. L. S. D., Dias, E. P. D. S., & Melo, A. C. N. D. (2010). Biological roles of peptidases in trypanosomatids.
89. Groves MR, Taylor MA, Scott M, Cummings NJ, Pickersgill RW, Jenkins JA. The prosequence of procaricain forms an α -helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure*. 1996 Oct 15;4(10):1193-203.
90. I-TASSER. Results for job id S361168. [Online].; 2018 [cited 2018 Junio 8. Available from: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S361168/>
91. I-TASSER. Results for job id S361593. [Online].; 2018 [cited 2018 Junio 8. Available from: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S361593/>
92. Jianyi Yang, Renxiang Yan, Ambrish Roy, Dong Xu, Jonathan Poisson, Yang Zhang. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12: 7-8 (2015).
93. Ambrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5: 725-738 (2010).
94. Yang Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9:40 (2008).

95. I-TASSER. More about C-Score. [Online].; 2018 [cited 2018 Junio 8]. Available from: <http://zhanqlab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S361168/cscore.txt>.
96. LaLonde JM, Zhao B, Janson CA, D'Alessio KJ, McQueney MS, Orsini MJ, Debouck CM, Smith WW. The crystal structure of human procathepsin K. *Biochemistry*. 1999 Jan 19;38(3):862-9.
97. Chengxin Zhang, Peter L. Freddolino, and Yang Zhang. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Research*, 45: W291-299 (2017).
98. Jianyi Yang, Ambrish Roy, and Yang Zhang. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment, *Bioinformatics*, 29:2588-2595 (2013)
99. Kleywegt, G. J., & Jones, T. A. (1996). Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, 4(12), 1395-1400.
100. Muller-Esterl W. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida* Barcelona, España: Reverté; 2008.
101. Ho, B. K., Thomas, A., & Brasseur, R. (2003). Revisiting the Ramachandran plot: Hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the α -helix. *Protein Science*, 12(11), 2508-2522.
102. Kleywegt, G. J., & Jones, T. A. (1996). Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, 4(12), 1395-1400.

103. Matanock A, Mehal JM, Liu L, Blau DM, Cope JR. Estimation of Undiagnosed *Naegleria fowleri* Primary Amebic Meningoencephalitis, United States. *Emerging infectious diseases*. 2018 Jan;24(1):162.
104. Matanock A, Mehal JM, Liu L, Blau DM, Cope JR. Estimation of Undiagnosed *Naegleria fowleri* Primary Amebic Meningoencephalitis, United States. *Emerging infectious diseases*. 2018 Jan;24(1):162.
105. Peterson K, Barbel P, Heavey E. Nurse's guide to primary amebic meningoencephalitis. *Nursing* 2018. 2018 Apr 1;48(4):42-5.
106. Bellini NK, Santos TM, da Silva MT, Thiemann OH. The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. *Experimental parasitology*. 2018 Mar 1.
107. Battaner E. *Biomoléculas, una introducción estructural a la bioquímica*. primera ed. España: Ediciones Universidad Salamanca; 2012.
108. Khan, Fahim Halim. *The Elements of Immunology*. s.l.: Pearson Education, 2009. pág. 473.
109. Rojas E. *Inmunología*. Tercera ed. Panamericana, editor. México: Editorial Medica Internacional; 2006.
110. Gonzalez V. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Ph y equilibrios acido-base. Universidad de Salamanca.
111. Werner, Muller Sterl. *Biología: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Barcelona: Reverté, 2008. pág. 661.
112. Uversky VN. Functions of short lifetime biological structures at large: the case of intrinsically disordered proteins. *Briefings in Functional Genomics*. 2018 Jul 3.

113. Uversky VN, Radivojac P, Iakoucheva LM, Obradovic Z, Dunker AK. Prediction of intrinsic disorder and its use in functional proteomics. InGene Function Analysis 2007 (pp. 69-92). Humana Press.
114. Kyte, J.; Doolittle, R.F., «A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein.,» J. Mol. Biol., 1982
115. Lieberman, Michael, Marks, Allan D y Smith, Colleen M. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach Third Edition. s.l: Wolters Kluwer Health, 2009. pág. 997.
116. Jinling C, Dandan Z, Pei S, Wei S, Gengfu X, Yinong D, Ying Z. Bioinformatics analysis on ORF1 protein of Torque teno virus (SANBAN isolate). Asian Pacific journal of tropical medicine. 2011 Nov 1;4(11):850-6.
117. PROTSITE. SIB Bioinformatics Resource Portal. [Online].; ExpASY. Available from: <https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/nicedoc.pl?PS00139>
118. PROTSITE. SIB Bioinformatics Resource Portal. [Online].; ExpASY. Available from: <https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/nicedoc.pl?PS00639>
119. PROTSITE. SIB Bioinformatics Resource Portal. [Online].; ExpASY. Available from: <https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/nicedoc.pl?PS00640>
120. Fersht A. Estructura y mecanismo de los enzimas. Reverté; 1980. Pag.

121. Renesto P, Rovey C, Schrenzel J, Leroy Q, Huyghe A, Li W, Lepidi H, François P, Raoult D. *Rickettsia conorii* transcriptional response within inoculation eschar. *PloS one*. 2008 Nov 10;3(11):e3681.
122. Pollastri G, Martin AJ, Mooney C, Vullo A. Accurate prediction of protein secondary structure and solvent accessibility by consensus combiners of sequence and structure information. *BMC bioinformatics*. 2007 Dec;8(1):201.
123. Smith D, Radivojac P, Obradovic Z, Dunker K, Zhu G. Improved amino acid flexibility parameters. *Rev. Protein Science*. 2013; 12(5): p. 1060-1072.
124. Lu J, Wang M, Wang Z, Fu Z, Lu A, Zhang G. Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2018 Jan 1;33(1):890-904.
125. Tully DC, Liu H, Alper PB, Chatterjee AK, Epple R, Roberts MJ, Williams JA, Nguyen KT, Woodmansee DH, Tumanut C, Li J. Synthesis and evaluation of arylaminoethyl amides as noncovalent inhibitors of cathepsin S. Part 3: Heterocyclic P3. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006 Apr 1;16(7):1975-80.
126. Lee-Dutra A, Wiener DK, Sun S. Cathepsin S inhibitors: 2004–2010. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2011 Mar 1;21(3):311-37.
127. HOOK M, Switalski L, Wadstrom T, Lindberg M. Interactions of pathogenic microorganisms with fibronectin. *Fibronectin*. 1989;1:295-308.
128. Miller EJ. Collagen types: structure, distribution, and functions. *In*Collagen 2018 Jan 18 (pp. 139-156). CRC Press.

129. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, Sette A, Peters B, Nielsen M. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018 Jul.
130. Sidhom JW, Pardoll D, Baras A. AI-MHC: an allele-integrated deep learning framework for improving Class I & Class II HLA-binding predictions. *bioRxiv*. 2018 Jan 1:318881.
131. Pannese E. *Neurocytology: fine structure of neurons, nerve processes, and neuroglial cells*. Springer; 2015 Mar 16.
132. Kang SY, Song KJ, Jeong SR, Kim JH, Park S, Kim K, Kwon MH, Shin HJ. Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2005 Jul 1;12(7):873-6.
133. FRITZINGER AE, MARCIANO-CABRAL FR. Modulation of a “CD59-like” Protein in *Naegleria fowleri* Amebae by Bacteria 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2004 Sep;51(5):522-8.
134. Wang Q, Li J, Ji J, Yang L, Chen L, Zhou R, Yang Y, Zheng H, Yuan J, Li L, Bi Y. A case of *Naegleria fowleri* related primary amoebic meningoencephalitis in China diagnosed by next-generation sequencing. *BMC infectious diseases*. 2018 Dec;18(1):349.
135. Peterson K, Barbel P, Heavey E. Nurse's guide to primary amoebic meningoencephalitis. *Nursing2018*. 2018 Apr 1;48(4):42-5.
136. Baig AM, Khan NA. Novel chemotherapeutic strategies in the management of primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *CNS Neurosci Ther*. 2014 Mar 1;20(3):289-90.
137. Debnath, A., Calvet, C. M., Jennings, G., Zhou, W., Aksenov, A., Luth, M. R., ... Podust, L. M. (2017). CYP51 is an essential drug target for the

treatment of primary amoebic meningoencephalitis (PAM). PLOS Neglected Tropical Diseases, 11(12), e0006104. doi:10.1371/journal.pntd.0006104