



FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

### ***Entamoeba histolytica: factores de virulencia***

**Autora: Ana María Terrero García.**

D.N.I.: 03933039-Q

Tutora: Mercedes Martínez Grueiro

Convocatoria: 30 de Junio de 2015.

## 1. RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es una ameba parásita, responsable de causar disentería amebiana en el hombre y menos frecuentemente, amebosis extraintestinal. La capacidad de invasión está estrechamente relacionada con la virulencia que está determinada por la capacidad de adhesión (lectina de adhesión y otras proteínas como STIRP, SHERP, Ariel y el complejo EhCPADH), la capacidad de destrucción celular (cisteín proteasas y ameboporos), de modificación de la respuesta inmune (cisteín proteasas) y de inducir la muerte celular, fagocitar y diseminarse. Estos factores de virulencia, junto con su resistencia al estrés oxidativo, permiten al parásito sobrevivir en el hospedador y serán los responsables de la patogenia.

## 2. ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is a parasite amoeba that causes amoebic dysentery and, less frequently, extraintestinal amoebiasis. The invasiveness is closely related to virulence, and this is determined by adherence (mediated by Gal/GalNAc lectin and others proteins like STIRP, SHERP, Ariel and EhCPADH complex), celular destruction (mediated by cysteine proteases and amebopore), alteration of the immune response (mediated by cysteine proteases), phagocytosis, induction of cells death and dissemination. Virulence factors and resistance to oxidative stress, allow the parasite to survive in the host and develop the infection.

## 3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

De las especies del género *Entamoeba* que infectan al hombre, *Entamoeba histolytica* es la más letal e importante al ser el agente causal de la amebosis humana. La forma de presentación más común es la disentería amebiana, pero también produce amebosis extraintestinal: abscesos en el hígado, pulmón, cerebro u otras localizaciones. Es una enfermedad cosmopolita con una alta prevalencia en África, Asia, India, Sur América y México, que causa 40.000-100.000 muertes al año. Su prevalencia varía entre el 0,8 y el 60% dependiendo del lugar donde se dé, del grado de saneamiento del medio ambiente, el clima, la edad, el nivel socioeconómico y cultural, los hábitos de higiene y las técnicas usadas en el diagnóstico. Afecta indistintamente del sexo del individuo (a excepción de la amebosis hepática, que es más común en el sexo masculino) o raza; se ha visto que la frecuencia de la enfermedad es superior en niños que en adultos.

Se estima que cada año se producen 500 millones de infecciones por amebas, de los cuales el 90% está causados por otras especies del género *Entamoeba* como *Entamoeba dispar* (1), *Entamoeba moshkovskii* o *Entamoeba bangladeshi*, comensales morfológicamente indistinguibles de *E. histolytica* mediante microscopía, que también afectan al hombre. Por ello, es difícil tener un conocimiento exacto de la prevalencia real de esta parasitosis, ya que el diagnóstico por técnicas directas no es de utilidad. Asimismo, del resto de casos que se atribuyen a *E. histolytica*, aquellos que son exclusivamente lumbinales son asintomáticos (portadores sanos); mientras que el 10% de las personas infectadas presentan manifestaciones clínicas, que ocurren cuando el parásito invade la pared intestinal, causando una serie de lesiones que conducen al desarrollo de la disentería amebiana. De ellos, en un 2-20% de los casos, el parásito se propaga a través de circulación portal hacia el hígado y a otras localizaciones, causando una amebosis extraintestinal.

En África, la región más afectada por esta parasitosis, resulta difícil establecer la prevalencia real de la enfermedad; sin embargo, en países de América Central y América del Sur, *E. histolytica* se comporta de manera endémica, destacando México donde se ha estimado una prevalencia de hasta un 50%; en Colombia de 45 a 60%; en Chile 18-20% en función de la región (2,3). En países asiáticos, el riesgo de amebosis ha aumentado en varones homosexuales, así como en viajeros e inmigrantes. En España, debido a la mejoría en las condiciones higiénico-sanitarias, apenas hay casos y la mayor parte de ellos se deben a viajeros e inmigrantes procedentes de zonas endémicas (4).

*E. histolytica*, puede presentar dos formas: trofozoíto o quiste. El trofozoíto es la forma activa, que se reproduce mediante fisión binaria, y que es capaz de invadir los tejidos del hospedador. Los trofozoítos (10-60  $\mu\text{m}$ ) se caracterizan por ser uninucleados y moverse rápidamente emitiendo pseudópodos anchos, unidireccionales. Tienen capacidad fagocítica y pueden ingerir microorganismos en el intestino delgado, así como glóbulos rojos durante la invasión al hospedador, constituyendo la fagocitosis uno de los factores determinantes de la virulencia del parásito. En estudios *in vitro* se ha visto que en cultivos xénicos, *E. histolytica* muestra un comportamiento fagocítico, mientras que en cultivos axénicos se alimenta por pinocitosis, siendo el desarrollo del parásito mucho más lento (5,6).

Como parásito con capacidad fagocítica, *E. histolytica* tiene acceso a gran variedad de microorganismos comensales que habitan en el intestino del hombre, así como compuestos orgánicos derivados de la digestión. En función de la población

bacteriana que esté presente, la virulencia estará condicionada de una u otra manera, del mismo modo en que varía al cambiar las condiciones del cultivo (5).

Los trofozoítos de *E. histolytica* carecen de mitocondria aunque presentan un orgánulo derivado de las mitocondrias denominado mitosoma, donde se produce la activación del sulfato; contiene una serie de enzimas que participan en este proceso como ATP sulfurilasa, ATP quinasa, una pirofosfatasa inorgánica, así como un transportador sodio-sulfato (6). Tampoco cuenta con aparato de Golgi y retículo endoplásmico, si bien hay una estructura similar a este último (7).

Para *E. histolytica* la principal fuente de energía es la glucosa, pero no desarrolla el ciclo de Krebs ni la fosforilación oxidativa. La glucólisis se produce en el citosol y el paso último de piruvato a acetilCoA está mediado por la piruvato ferredoxin óxido reductasa. La activación del fármaco de elección, el metronidazol, está ligado a este sistema enzimático. La ferredoxina cede los electrones al grupo nitro del fármaco, un profármaco, activándolo. Las especies reactivas generadas serán las que ostenten la actividad antiparasitaria (8). No presenta vías de síntesis *de novo* de purinas, pirimidinas y timidilato al carecer de ribonucleótido reductasa (9) y la síntesis de aminoácidos se encuentra reducida salvo en el caso de serina y cisteína.

*E. histolytica* es anaerobio o microaerófilo, pero puede acceder al torrente circulatorio, donde la presión parcial de oxígeno es superior, y debe afrontar el estrés oxidativo. Cuenta con una protección antioxidante muy notable que está relacionada con su virulencia y que le permite sobrevivir en el proceso de diseminación, así como hacer frente a la respuesta defensiva del hospedador que involucra a neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos secretan una gran variedad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como enzimas proteolíticas (10).

El ciclo biológico de *E. histolytica* es un ciclo directo. Los quistes tetranucleados (10-20  $\mu\text{m}$ ) entran en el hospedador por vía oral y avanzan por el tubo digestivo llegando al intestino grueso, donde se abren y emerge un organismo tetranucleado, que sufre una serie de divisiones que originan ocho pequeños trofozoítos metaquísticos, que pueden establecerse en el colon o el recto. Los trofozoítos se establecen en el intestino grueso donde el peristaltismo es menor y allí se multiplican por fisión binaria. En la mayoría de los casos, *E. histolytica* se comporta como un comensal y los trofozoítos que son arrastrados a la parte distal se enquistan y son eliminados, con las heces, al medio externo. En un 10% de los casos, el parásito invade la pared intestinal (11), destruyendo la mucosa y la capa muscular; cuando se encuentra en la submucosa se extiende

radialmente en lo que se conoce como úlcera en “botón de camisa” o “cuello de botella” (12).

*E. histolytica* entra en contacto con el epitelio intestinal y logra perforarlo, provocando una inflamación que se caracteriza por el aumento de IL-1, IL-8 e IFN $\gamma$ . Las úlceras producidas se traducen en manifestaciones clínicas como dolor abdominal, diarrea, disentería, pérdida de peso y fiebre; pueden presentarse complicaciones como colitis fulminante, amebomas (que pueden conducir a obstrucción intestinal) o infecciones secundarias. Desde la pared intestinal, *E. histolytica* puede llegar, por vía hemática o por continuidad anatómica, a otros órganos, como cerebro, piel, pulmón e hígado, causando en este último el absceso hepático amebiano, la forma más frecuente de amebosis extraintestinal (13).

La capacidad de invasión y de destrucción tisular de esta ameba viene determinada por la expresión y actuación de una serie de proteínas y mecanismos que se configuran como los determinantes de su virulencia. Entre ellos, ocupa un lugar importante la lectina presente en su membrana, que se une a galactosa/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc) y media la adhesión de la ameba al mucus y posteriormente a las células. Otras proteínas de superficie, los proteofosfolucanos, también denominados lipofosfolucanos, juegan un papel importante en la adhesión e inducción de la respuesta innata y adaptativa, siendo uno de los principales antígenos de superficie.

La adhesión va seguida de la destrucción del mucus y de las células del hospedador. La muerte celular la causan a través de la secreción de péptidos formadores de poros (ameboporos A, B y C), que forman canales iónicos y microporos que llevan a la ruptura celular, todo ello acompañado del aumento del calcio intracelular. También secretan cisteína proteasas (14), que tienen un papel importante en la invasión y digestión del material fagocitado, así como fosfatasa. Otra manera de provocar la muerte celular es inducir la apoptosis, mediante la vía 3-caspasas, de células intestinales y epiteliales, además de hepatocitos y células del sistema inmune.

Todos estos factores de virulencia serán revisados a continuación.

#### 4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es revisar en profundidad los factores de virulencia ligados a la ameba parásita más importante del hombre, *E. histolytica*.

## 5. METODOLOGÍA

En esta revisión bibliográfica, se ha acudido a PUBMED como fuente principal de artículos sobre los factores de virulencia de *E. histolytica*.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Lectina galactosa/N- acetilgalactosamina (Gal/GalNAc)

La lectina es una molécula fundamental en el proceso de colonización, enquistamiento e invasión. Se ha visto que las células de los mamíferos que no expresan residuos de galactosa o N-acetil-D-galactosamina, son resistentes a la muerte por el parásito y que la inhibición de la lectina torna a la ameba incapaz de adherirse y de causar la lisis de las células del hospedador. Es una glucoproteína multimérica de 260 kDa que reconoce residuos de galactosa/N-acetil- D-galactosamina en las glucoproteínas del mucus o de la matriz extracelular, lo que hace posible la adhesión de la ameba al mucus del colon, en primer lugar, y posteriormente a las células del hospedador. Se localiza en la membrana plasmática y se caracteriza por ser un heterodímero constituido por una cadena pesada (170 kDa) y otra ligera (35/31 kDa), unidas entre sí por puentes disulfuro y asociadas a una proteína intermedia (150 kDa). La presencia de puentes disulfuro hace que la proteína se pliegue sobre sí misma confiriéndole una estructura resistente a proteasas (15). La subunidad pesada (Hgl), situada a nivel transmembrana, está codificada por una familia de 5 genes que presentan entre ellos una similitud del 85-95%(16). La subunidad pesada puede presentar tres isoformas (Hgl-1, Hgl-2 y Hgl-3). Hgl 2 presenta una menor adhesión y una mayor capacidad de resistencia a la respuesta inmune del hospedador y esto repercute en la formación del absceso. A pesar de que encuentra una mayor dificultad para llegar al hígado, cuando lo consigue se produce una exacerbación de la virulencia por su resistencia inmunológica (17).

En el extremo terminal de la subunidad pesada se encuentra el dominio de adhesión (18), rico en cisteína (CR), que reconoce específicamente la galactosa/N-acetil-D-galactosamina. Su secuencia presenta homología con las integrinas  $\beta 2$  y  $\beta 7$ , ambas relacionadas con procesos de adherencia (15), además de un parecido estructural con CD59 (presente en muchas células del hospedador), que protege al parásito de la actividad lítica del complemento, inhibe el complejo de ataque al unirse a al componente C9 del mismo. La lectina es, por tanto, una proteína multifuncional cuya

actividad resulta crucial para la evasión de la respuesta inmune y la citotoxicidad de la ameba (11).

La subunidad ligera (Lgl), de 31 o 35 kDa, está codificada por una familia de seis genes, similares en un 79-85%, y presenta distintas isoformas. La isoforma de 35 kDa se caracteriza por ser una estructura altamente glicosilada y por carecer de anclaje GPI, que sí se encuentran en la isoforma de 31 kDa (19). Esta subunidad de la lectina contribuye a la regulación de la adherencia y a la señalización de eventos asociados con la virulencia (19).

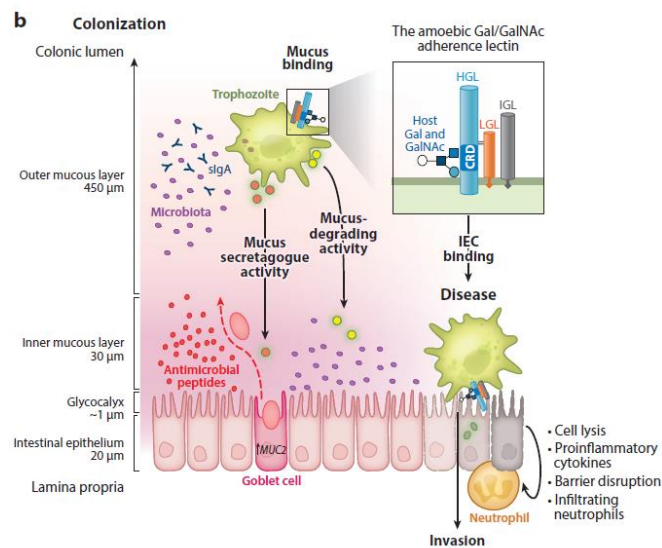
La subunidad intermedia (Igl) está asociada mediante enlaces no covalentes al heterodímero formado por la subunidad pesada y la ligera. El bloqueo de esta subunidad con anticuerpos monoclonales inhibe la adhesión del trofozoíto (20).

La lectina es un antígeno inmunodominante reconocido por el 95% de los pacientes con absceso hepático amebiano (AHA) (21). Los niños con IgA específicas parecen estar protegidos frente a la infección intestinal (22). Se está utilizando para el diagnóstico diferencial de *E.histolytica*/ *E. dispar* y en múltiples ensayos de vacunación.

La lectina Gal- GalNac, a través de una serie de quinazas transmembrana, induce cambios estructurales en el trofozoíto y en la célula blanco a través de mecanismos no identificados, para formar una “placa de anclaje” (22). La interacción de la lectina con glucoconjugados del hospedador se caracteriza por ser multivalente y de alta especificidad. El espacio óptimo de los residuos de Gal/ NAcGal de la lectina no ha sido definido, pero se sabe que la la lectina puede reconocer maxiclusters. Así, la lectina y el contacto mediado con las células del hospedador provoca el aumento de calcio intracelular al igual que la activación de la caspasa 3 y la formación de radicales libres (ROS) en el interior de las células del hospedador, lo que ocasiona la apoptosis de dichas células (20). La lectina juega un papel fundamental en la patogénesis del absceso amebiano. Su tropismo por el tejido hepático se debe a la competición entre el dominio de reconocimiento de carbohidratos y un factor de crecimiento de los hepatocitos (20).

La adhesión que media esta lectina se ve condicionada por el mucus, que forma una barrera física que impide el contacto de la ameba con el epitelio. La mucina secretada mayoritariamente por el intestino se encuentra codificada por el gen *MUC2*. La proteína *MUC2* está altamente glicosilada, lo que hace que la lectina de adhesión presente una gran afinidad por ella. Los diferentes polimorfismos de *MUC2* explican la variación de sensibilidad que presentan distintos individuos a la infección por *E. histolytica*. Los trofozoítos inducen la secreción de mucina por las células caliciformes

y utilizan como fuente de nutrientes los polímeros de mucina que degradan y la microbiota presente en el intestino a través de la fagocitosis. Las glucosidasas producidas por las bacterias anaerobias residentes en el colon y las proteasas pancreáticas, pueden destruir la lectina de adherencia (una glicoproteína) de los trofozoítos de *Entamoeba*, impidiendo su adhesión a las células (23). La capa de mucus previene que los trofozoítos alcancen las células epiteliales, la invasión, por tanto, se produce cuando los mecanismos de protección (capa de mucus y flora bacteriana protectora) se pierden. En países desarrollados, donde es común la presencia de infecciones entéricas y el uso inapropiado de antimicrobianos, la pérdida de los mecanismos protectores es más frecuente y la invasión de la mucosa por los trofozoítos se encuentra favorecida.



**Fig.1.** Tomado de Petri y Petri. (2014)

Otras proteínas, además de la lectina de adhesión a Gal/GalNac, han sido implicadas en los procesos de adhesión; entre ellas, dos proteínas ricas en lisina (K) y ácido glutámico (E) que se han denominado KERP1 y KERP2. La primera no presenta homologías con otras proteínas conocidas, incluidas las presentes en *E. dispar*; se localiza en la membrana plasmática y en vesículas internas y se une a la superficie de las células del hospedador. Estudios experimentales en cricetos, la han relacionado con el desarrollo de abscesos hepáticos (24).

STIRP es una proteína rica en serina, treonina e isoleucina, que se expresa exclusivamente en las cepas virulentas de *Entamoeba*. Silenciando esta proteína se

produce un descenso de la adherencia a las células del hospedador de un 35%, así como una reducción de la citotoxicidad (24).

SREHP es una proteína inmunogénica, rica en serina, y Ariel es una proteína rica en asparraguina, que se encuentran en la superficie y que se cree que tienen un papel importante en la adhesión y en la fagocitosis. Ambas tienen una similitud del 89% (21).

El complejo EhCPADH, formado por la cisteína proteasa EhCP112 y la adhesina EhADH, que contiene un dominio de adhesión a las células del hospedador, implicado además en la fagocitosis y citólisis. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta adhesina reducen la adhesión en más de un 50% y consecuentemente la citotoxicidad y fagocitosis.

El parásito contiene además dominios ricos en colesterol (“balsas lipídicas”) que están involucrados en la adherencia, regulando la función de la lectina. La caracterización y purificación de estos dominios, así como los estudios realizados sobre ellos ha demostrado que su presencia aumenta la capacidad de la ameba de interactuar con los residuos de Gal/ NAcGal, a pesar de que no aumenta los niveles de la lectina en la superficie del parásito (25).

## 6.2. Proteofosfoglicanos (PPG)

Los proteofosfoglicanos (PPG), lipofosfoglicanos (LPG) y lipopeptidofosfoglicanos (LPPG), son complejos macromoleculares altamente inmunogénicos, que se encuentran en la superficie de *E. histolytica*, expuestos al sistema inmune del hospedador (26). Las poblaciones virulentas del parásito sintetizan dos tipos de PPGs: LPG o PPG1 y LPPG o PPG2, mientras que la cepa atenuada Rahman sólo sintetiza una clase de PPGs (27). En cuanto a la estructura del PPG (100 y 190 kDa) (27) es un polisacárido que presenta un 75-80% de carbohidratos, un 8% de proteínas, 2-5% de lípidos y un 1% de fosfatos. Contiene un polipéptido con residuos de serina que forman enlaces fosfodiéster con regiones de polisacáridos, formados a su vez por enlaces de glucosa-galactosa de tipo  $\alpha$  (1-6) y  $\beta$ (1-6). El polipéptido está anclado a GPI y se caracteriza por ser patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Al estimular la respuesta innata y adaptativa se consideran adyuvantes muy efectivos (28).

Los PPGs son reconocidos por los receptores TLR 2 y TLR 4 de macrófagos y células dendríticas e inducen la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 e IL-12. Estas citoquinas están involucradas en la respuesta inflamatoria que se desarrolla para la

eliminación del parásito. TNF- $\alpha$  y IL-8 atraen células inmunocompetentes como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas que destruyen las amebas generando especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, lo que también puede dañar los tejidos del hospedador (28). IL-12 activa a las células NK y NKT, debido a la similitud estructural de los PPG a alfa-galactosil ceramida, un activador conocido de células NKT, (29), que a su vez producen IFN- $\gamma$ . Esta citoquina también puede activar a los linfocitos T aumentando su respuesta citotóxica al promover la secreción de citoquinas propias de la respuesta Th1.

También se ha demostrado que PPG aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 por parte de las células dendríticas (28). Silenciando específicamente LPPG mediante el uso de anticuerpos monoclonales EH5 (29) se reduce la inflamación a nivel intestinal y el desarrollo del absceso hepático, así como la citotoxicidad y la adhesión, tal y como se ha comprobado en modelos animales.

Los LPPGs también producen una respuesta humoral; se han detectado anticuerpos anti-LPPG en modelos animales de amebosis. Los anticuerpos anti-LPPG reducen la adhesión y la citotoxicidad, indicándonos que los LPPGs juegan un papel importante en la interacción parásito-hospedador (28). Cuando se inhibe su síntesis y se reduce su presencia en la superficie de los trofozoítos, estos se hacen más susceptibles a la acción del complemento y estas poblaciones no denotan virulencia en modelos experimentales (absceso hepático amebiano en criceto) (29).

La inmunogenicidad intrínseca que poseen los PPGs hace que se empiecen a estudiar posibilidades para el desarrollo de vacunas, lo que confiere a estas moléculas una importancia adicional.

### 6.3. Cisteín proteasas

En el genoma de *E. histolytica* se han descrito 80 genes que codifican proteasas; 50 de ellos cisteín proteasas (CP), de la superfamilia de la papaína. Las cisteín proteasas están directamente implicadas en la invasión tisular por su capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular (laminina y colágeno) así como la mucina 2, el principal componente del mucus del colon (30), también contribuyen a evadir la RI del hospedador, degradando anticuerpos y complemento. *E. histolytica* puede degradar citoquinas y proteínas que contienen hierro, tales como hemoglobina, mioglobina y transferrina (32) y provocar un tipo de apoptosis denominado anoikis, que consiste en la destrucción del anclaje de la matriz extracelular a la célula (31). La inhibición de estas

proteínas evita la degradación (20), lo que da lugar a una disminución de la actividad fagocítica de la ameba, así como del grado de inflamación intestinal y la aparición de amebosis hepática. Asimismo las investigaciones en modelos animales han demostrado que la trans-epoxisuccinil- L-leucil-amido (4-guanidina) butano o E-64 actúa como inhibidor de la actividad de cisteín proteasas, reduciendo la formación de abscesos en el hígado (33).

La secuencia nucleotídica de los genes que codifican estas proteasas difieren en un 40-85%. EhCP1 (27-35 kDa), EhCP2 (35 kDa) y EhCP5 (29 kDa) son las CP más expresadas, representan, aproximadamente, el 90%. Están localizadas dentro de las vacuolas digestivas, pero, además, las EhCP5 y EhCP112 están presentes en la superficie del trofozoíto. El aumento de expresión del gen *EhCP5* potencia la actividad de la EhCP1 y EhCP2. La alta concentración de EhCP5 en cepas invasivas hace que se relacione más con la virulencia que las demás; se ha demostrado que EhCP5 rompe la capa de mucina en su dominio carboxi-terminal, lo cual favorece la invasión. En *E. dispar*, la concentración de cisteín proteasas es menor, así como su actividad biológica, lo que resulta relevante para la explicación de la carencia de capacidad patógena de esta especie. No se expresan la CP1 ni la CP5 (34).

Se ha destacado el papel de EhCP5 por ser exclusiva de *E. histolytica*, localizarse en su superficie y estar implicada en la invasión del colon y la formación del AHA. CP-A5 contiene un dominio –arginina-glicina-ácido aspártico- de unión a integrinas (RGD). La unión de CP-A5 a integrinas del enterocito ( $\alpha\beta3$ ) dispara señales que inducen una respuesta proinflamatoria (NFkB) (31). Se ha observado que CP-A5 daña las neuronas entéricas *in vitro* y en un modelo murino de amebiasis intestinal (32). CP-A5 es también la responsable de la conversión de pre-IL1 $\beta$  en su forma activa (actividad ICE) que induce la producción de especies reactivas de nitrógeno por las células sensibilizadas por  $\gamma$ IFN. La actividad ICE también es responsable de que estas proteínas puedan activar la cascada de las caspasas dentro de los hepatocitos e inducir la apoptosis (33). Cuando se reduce la expresión de esta enzima, por modificaciones genéticas, la patogenicidad en modelos experimentales disminuye, lo que ha llevado a correlacionar su actividad proinflamatoria con la invasión intestinal (33).

Se ha propuesto que la EhCP112, asociado a la adhesina EhADH112 (complejo EhCPADH), podría degradar las proteínas de unión estrecha, produciendo un aumento de la permeabilidad paracelular y contribuyendo a la desorganización y destrucción de

la pared intestinal (34). Anticuerpos contra este complejo inhiben la adherencia y fagocitosis, así como la formación del absceso hepático en modelos animales (34).

El proceso de secreción de cisteín proteasas se encuentra regulado negativamente por dos inhibidores endógenos, ICP1 e ICP2. También se piensa que la flora bacteriana puede influir en la expresión de las cisteín proteasas (35).

Más del 80% de los pacientes con amebosis presentan anticuerpos contra cisteín proteasas (36), lo que plantea la posibilidad de utilizarla en el desarrollo de vacunas o como herramienta para el diagnóstico (32). La transmisión, invasión y ciclo biológico del parásito puede ser interrumpido por medio de la utilización de inhibidores específicos de las proteasas. El estudio de las proteasas y sus inhibidores específicos es importante para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, así como para aumentar la eficacia de los fármacos usados actualmente, para el tratamiento de estas enfermedades.

#### 6.4. Ameboporos

*E. histolytica* posee una familia de pequeños péptidos anfipáticos denominados ameboporos (AP), que se encuentran en vesículas internas y son secretados al exterior. Tienen la capacidad de formar canales iónicos o microporos en las membranas lipídicas de las células del hospedador, siendo su actividad máxima a un pH de 5,2 (36). Por ellos difunden el agua, los iones (salida de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y entrada de Ca<sup>2+</sup>) y otras pequeñas moléculas, lo que ocasiona el cambio del medio celular interno y la lisis celular por choque osmótico. Contienen el dominio SAPLIP (saposin-like proteins), un dominio muy conservado que contiene residuos de seis cisteínas unidas por puentes disulfuro. *E. histolytica* contiene en su genoma 16 genes que codifican para el dominio SAPLIP, pero solo AP-A, AP-B y AP-C muestran actividad formadora de poros. Las tres isoformas están integradas por 77 aminoácidos y se producen en una proporción de 35:10:1 respectivamente (11). En *E. dispar* se ha demostrado que la presencia del amebaporo A y B es mucho menor y tiene menor actividad biológica, lo que se relaciona la carencia de capacidad patógena de esta especie (36).

En modelos animales se ha visto que los ameboporos presentan una estructura y función similares a las N-lisinas, perforinas y granulinas que se encuentran en las células NK y los linfocitos T citotóxicos. Asimismo, se encontró que existía homología entre las secuencias de los amebaporos y la hemolisina III, lo cual sugiere que, además de los amebaporos, las hemolisinas pueden tener un papel importante en la lisis de las células del hospedador (5,37).

La secreción de ameboporos, cisteín proteasas y otros factores de virulencia trae como resultado la destrucción de los neutrófilos y la consecuente liberación de sus productos tóxicos, que pueden amplificar las lesiones causadas por las amebas, produciéndose áreas de necrosis en la mucosa intestinal, focos de ulceración que condicionan los cuadros clínicos de mala absorción y disentería.

Además se ha observado que la presencia de los ameboporos incrementa la actividad de la fosfolipasa A, una enzima de *E. histolytica*  $Ca^{2+}$  dependiente que hidroliza los fosfolípidos de la membrana de las células del hospedador (36).

Los ameboporos se encuentran directamente relacionados con la formación del absceso hepático. Cuando los niveles de este tipo de proteínas son bajos, la virulencia se encuentra a su vez reducida (38). Trofozoítos deficientes en AP-A no producen abscesos hepáticos en modelos animales, pero sí colitis (39). La inhibición de los genes que los codifican, produce una disminución de la virulencia (40,41).

#### 6.5. Fosfatasas

Las quinasas y fosfatasas regulan por medio de fosforilación reversible distintos procesos, crecimiento celular, diferenciación, metabolismo, ciclo celular, comunicación célula-célula, migración celular, transcripción y movilidad. *E. histolytica* presenta fosfatasas ácidas, que pueden encontrarse ancladas a la membrana (MAP), o bien son secretadas al medio extracelular (SAP). Estas últimas no se detectan en *E. dispar* (42-44).

Las MAP tienen actividad tirosín fosfatasa (PTPasa), una actividad que es menor en las poblaciones no patógenas de *E. histolytica*, y en las especies comensales *E. dispar* y *E. moshkovskii* (45), lo que resulta relevante para estudiar las fosfatasas como un posible factor de virulencia.

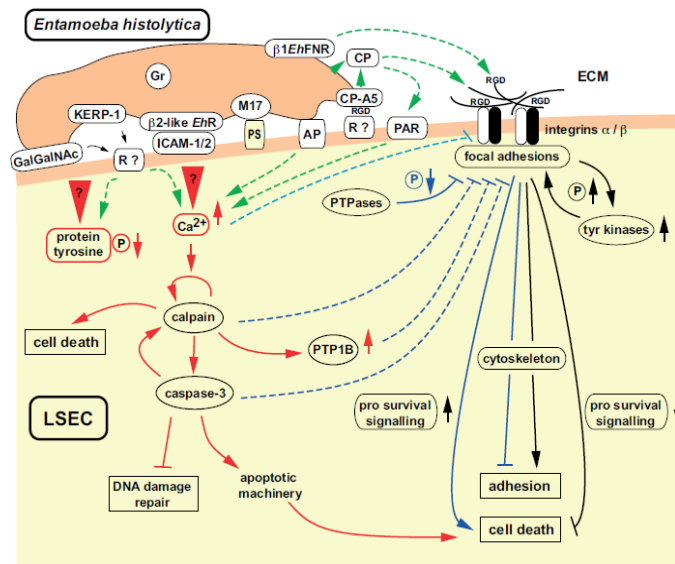
El genoma de *E. histolytica*, presenta cuarenta y dos genes que codifican PTPasas. Se han clonado dos de estos genes *EhPTPA* (46), que se expresa más en los trofozoítos aislados de abscesos hepáticos que en los procedentes de cultivos, y *EhPTPB*, cuya expresión es más uniforme (45).

Tras el contacto con *E. histolytica*, lectina dependiente (47), el estado de fosforilación de las células del hospedador será alterado; se pensaba que esto era debido a la acción de las fosfatasas secretadas por el parásito, pero actualmente se cree que son responsables de ello las fosfatasas del hospedador. La ameba induce un aumento del calcio intracelular, la activación de calpaina y de la PTPasa 1B. Todo esto es requerido

para que se produzca la muerte celular (la muerte no se produce cuándo las células se tratan previamente con un inhibidor de PTPasas) (36). El tratamiento con verapamilo y otros bloqueantes de canales de calcio inhibe la desfosforilación y la apoptosis (47).

### 6.6. Inducción de muerte celular y fagocitosis

*E. histolytica* tiene capacidad para inducir la muerte de las células del hospedador mediante apoptosis o necrosis (36,48). En los sinusoides hepáticos, la ameba entra en contacto con las células endoteliales. El tamaño del trofozoíto es muy superior al del sinusoides (5- 7  $\mu\text{m}$ ) y se produce una obstrucción que causa una disminución del flujo, creando una isquemia en el tejido con la consiguiente disminución de oxígeno y estrés oxidativo, momento en el que se induce la muerte celular por apoptosis o necrosis.



**Fig.2.** Tomado de Faust, Marquay, Santi- Roca y Guillen. (2011)

La diferencia entre ambas es que la muerte por apoptosis no genera respuesta inflamatoria. Se basa en una rápida activación de la caspasa 3, el incremento de calcio intracelular y los procesos de desfosforilación subsiguientes. El parásito induce la actividad de la calpaína, caspasa 3 y tirosín fosfatasa PTP1B (14). La muerte por necrosis, en cambio, sí produce una respuesta inflamatoria debido a la liberación de interleucinas. La respuesta generada atraerá a macrófagos y otras células fagocíticas que suponen un inconveniente para el parásito.

En el parénquima hepático se ha visto que los hepatocitos, que se encuentran en las proximidades del trofozoíto, mueren por necrosis o apoptosis, mientras que aquellos

que se encuentran a una mayor distancia mueren exclusivamente por apoptosis (38), (49).

La fagocitosis es un proceso fundamental para el desarrollo y supervivencia de *E. histolytica*, muy ligado a su capacidad invasiva (50) y virulencia.

Para llevar a cabo la fagocitosis el parásito debe entrar en contacto con la célula y lo hace a través de la lectina de adhesión (51); estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición de la lectina reduce la ingestión en un 40%. Además, hay otros ligandos implicados en este proceso como la fosfatidilserina, que se expresa en grandes cantidades en la superficie de las células apoptóticas, y que es reconocida por el parásito para llevar a cabo la fagocitosis (52-55). En el interior de los fagosomas de *E. histolytica* se encuentran hidrolasas, lisozimas y hexosaminidasas, que degradan las bacterias y células fagocitadas (56).

*E. histolytica* es la única de las especies del género *Entamoeba* que presenta la capacidad de fagocitar eritrocitos, lo que resulta útil para diferenciarla de otras especies comensales. La ingestión de los eritrocitos se puede producir de dos maneras: mediante la fagocitosis clásica, a través de la emisión de pseudópodo, o mediante una endocitosis, posterior a un ataque lítico (57). Recientemente se ha relacionado una quinasa transmembrana denominada PATMK (phagosome-associated transmembrane kinase) con la fagocitosis (146 kDa). La inhibición de esta quinasa se traduce en un bloqueo de la fagocitosis de los glóbulos rojos y además previene la invasión y colonización del intestino por parte de la ameba.

## 7. CONCLUSIONES

Es necesario profundizar en el conocimiento y en el estudio de los factores de virulencia que nos permiten comprender la relación parásito-hospedador y entender la enfermedad. Como farmacéuticos, es de especial interés, determinar qué factores y qué características nos pueden ofrecer dianas farmacológicas de interés o moléculas de interés inmunológico para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ackers JP, Mirelman D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2006 Aug;9(4):367-373.
- (2) Becerril M. *Parasitología médica*. . 3º ed. Nueva York: Editorial Mc Graw Hil; 2011.

- (3) Atías A. Parasitología clínica. . 3º ed. Santiago de Chile: Mediterráneo; 1991.
- (4) AMSE. Amebiasis, epidemiología y situación mundial. 2012; Disponible en: [http://www.amse.es/index.php?option=com\\_content&view=article&id=148:amebiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50](http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=148:amebiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50). Se accedió el 14/enero, 2015.
- (5) Loftus B, Anderson L, Davies R, Alsmark C, Samuelson J, Amedeo Pea. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature 2005 2004;43:865-868.
- (6) Mi-ichi F, Abu Yousuf M, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 2009 Dec 22;106(51):21731-21736.
- (7) Teixeira JE, Huston C. Evidence of a Continuous Endoplasmic Reticulum in the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. American Society for Microbiology 2008;7(7):1222-1226.
- (8) Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. J Antimicrob Chemother 1997 Dec;40(6):833-840.
- (9) Anderson IJ, Loftus BJ. *Entamoeba histolytica*: observations on metabolism based on the genome sequence. Exp Parasitol 2005 Jul;110(3):173-177.
- (10) González M, Carballar R, Carabarrín A, Espíritu A, Luisrosales J. Estrés oxidativo y nitrosativo: el inicio de la batalla. Avance y Perspectiva 2011;3(2).
- (11) Faust DM, Guillen N. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. Microbes Infect 2012 Dec;14(15):1428-1441.
- (12) Uribarren T. Entamoebosis o amibiasis o amebiasis. 2015; Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>. Se accedió 15/ENERO, 2015.
- (13) Chacín-Bonilla L. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. Rev méd Chile 2013;141(5):609-615.
- (14) Faust DM, Marquay Markiewicz J, Santi-Rocca J, Guillen N. New insights into host-pathogen interactions during *Entamoeba histolytica* liver infection. Eur J Microbiol Immunol (Bp) 2011 Mar;1(1):10-18.
- (15) Petri WA,Jr, Haque R, Mann BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. Annu Rev Microbiol 2002;56:39-64.

- (16) Purdy JE, Mann BJ, Shugart EC, Petri WA, Jr. Analysis of the gene family encoding the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adhesin 170-kDa subunit. *Mol Biochem Parasitol* 1993 Nov;62(1):53-59.
- (17) Tavares P, Rigotherier MC, Khun H, Roux P, Huerre M, Guillen N. Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. *Infect Immun* 2005 Mar;73(3):1771-1778.
- (18) Gilchrist CA, Petri WA. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Curr Opin Microbiol* 1999 Aug;2(4):433-437.
- (19) Petri WA, Jr, Haque R, Mann BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:39-64.
- (20) Lee YA, Saito-Nakano Y, Kim KA, Min A, Nozaki T, Shin MH. Modulation of endogenous Cysteine Protease Inhibitor (ICP) 1 expression in *Entamoeba histolytica* affects amoebic adhesion to Extracellular Matrix proteins. *Exp Parasitol* 2015 Feb;149:7-15.
- (21) Abd-Alla MD, Jackson TF, Soong GC, Mazanec M, Ravdin JI. Identification of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin epitopes recognized by human immunoglobulin A antibodies following cure of amebic liver abscess. *Infect Immun* 2004 Jul;72(7):3974-3980.
- (22) Haque R, Mondal D, Duggal P, Kabir M, Roy S, Farr BM, et al. *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infect Immun* 2006 Feb;74(2):904-909.
- (23) Variyam EP. Luminal host-defense mechanisms against invasive amebiasis. *Trends Parasitol* 2007 Mar;23(3):108-111.
- (24) Santi-Rocca J, Weber C, Guigon G, Sismeiro O, Coppee JY, Guillen N. The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cell Microbiol* 2008 Jan;10(1):202-217.
- (25) Welter BH, Goldston AM, Temesvari LA. Localisation to lipid rafts correlates with increased function of the Gal/GalNAc lectin in the human protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 2011 Nov;41(13-14):1409-1419.
- (26) Maldonado-Bernal C, Kirschning CJ, Rosenstein Y, Rocha LM, Rios-Sarabia N, Espinosa-Cantellano M, et al. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol* 2005 Apr;27(4):127-137.

- (27) Moody-Haupt S, Patterson JH, Mirelman D, McConville MJ. The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *J Mol Biol* 2000 Mar 24;297(2):409-420.
- (28) Marinets A, Zhang T, Guillen N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, et al. Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1997 Nov 3;186(9):1557-1565.
- (29) Weber C, Blazquez S, Marion S, Ausseur C, Vats D, Krzeminski M, et al. Bioinformatics and functional analysis of an *Entamoeba histolytica* mannosyltransferase necessary for parasite complement resistance and hepatic infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2008 Feb 13;2(2):e165.
- (30) Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2000 Apr;13(2):196-206.
- (31) Hou Y, Mortimer L, Chadee K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. *J Biol Chem* 2010 Nov 12;285(46):35497-35504.
- (32) Mortimer L, Chadee K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 2010 Nov;126(3):366-380.
- (33) Zhang Z, Wang L, Seydel KB, Li E, Ankri S, Mirelman D, et al. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 2000 Aug;37(3):542-548.
- (34) Betanzos A, Javier-Reyna R, Garcia-Rivera G, Banuelos C, Gonzalez-Mariscal L, Schnoor M, et al. The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS One* 2013 Jun 7;8(6):e65100.
- (35) Mendoza-Macias CL, Barrios-Ceballos MP, de la Pena LP, Rangel-Serrano A, Anaya-Velazquez F, Mirelman D, et al. *Entamoeba histolytica*: effect on virulence, growth and gene expression in response to monoxenic culture with *Escherichia coli* 055. *Exp Parasitol* 2009 Feb;121(2):167-174.
- (36) Ralston KS, Petri WA, Jr. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol* 2011 Jun;27(6):254-263.

- (37) Zindrou S, Orozco E, Linder E, Tellez A, Bjorkman A. Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR. *Acta Trop* 2001 Feb 23;78(2):117-125.
- (38) Carranza-Rosales P, Santiago-Mauricio MG, Guzman-Delgado NE, Vargas-Villarreal J, Lozano-Garza G, Viveros-Valdez E, et al. Induction of virulence factors, apoptosis, and cytokines in precision-cut hamster liver slices infected with *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 2012 Dec;132(4):424-433.
- (39) Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL, Jr. Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect Immun* 2004 Feb;72(2):678-683.
- (40) Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* 1999 Nov;34(3):463-472.
- (41) Bracha R, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot Cell* 2003 Apr;2(2):295-305.
- (42) Aguirre-Garcia MM, Anaya-Ruiz M, Talamas-Rohana P. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* 2003 Mar;126(Pt 3):195-202.
- (43) Anaya-Ruiz M, Perez-Santos JL, Talamas-Rohana P. An ecto-protein tyrosine phosphatase of *Entamoeba histolytica* induces cellular detachment by disruption of actin filaments in HeLa cells. *Int J Parasitol* 2003 Jul;33(7):663-670.
- (44) Aguirre-Garcia MM, Cerbon J, Talamas-Rohana P. Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. *Int J Parasitol* 2000 Apr 24;30(5):585-591.
- (45) de Sa Pinheiro AA, Amazonas JN, de Souza Barros F, De Menezes LF, Batista EJ, Silva EF, et al. *Entamoeba histolytica*: an ecto-phosphatase activity regulated by oxidation-reduction reactions. *Exp Parasitol* 2007 Apr;115(4):352-358.
- (46) Rastew E, Vicente JB, Singh U. Oxidative stress resistance genes contribute to the pathogenic potential of the anaerobic protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 2012 Oct;42(11):1007-1015.

- (47) Teixeira JE, Mann BJ. *Entamoeba histolytica*-induced dephosphorylation in host cells. *Infect Immun* 2002 Apr;70(4):1816-1823.
- (48) Berninghausen O, Leippe M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1997 Sep;65(9):3615-3621.
- (49) Villalba-Magdaleno JD, Perez-Ishiwara G, Serrano-Luna J, Tsutsumi V, Shibayama M. In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess. *Microbiology* 2011 May;157(Pt 5):1489-1499.
- (50) Okada M, Huston CD, Oue M, Mann BJ, Petri WA,Jr, Kita K, et al. Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol* 2006 Feb;145(2):171-183.
- (51) Coudrier E, Amblard F, Zimmer C, Roux P, Olivo-Marin JC, Rigotherier MC, et al. Myosin II and the Gal-GalNAc lectin play a crucial role in tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 2005 Jan;7(1):19-27.
- (52) Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA,Jr. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 2003 Feb;71(2):964-972.
- (53) Huston CD, Houghton ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA,Jr. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 2000 Dec;2(6):617-625.
- (54) Boettner DR, Petri WA. *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;289:175-184.
- (55) Boettner DR, Huston CD, Sullivan JA, Petri WA,Jr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infect Immun* 2005 Jun;73(6):3422-3430.
- (56) Furukawa A, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Novel transmembrane receptor involved in phagosome transport of lysozymes and beta-hexosaminidase in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* 2012 Feb;8(2):e1002539.
- (57) Lejeune A, Gicquaud C. Evidence for two mechanisms of human erythrocyte endocytosis by *Entamoeba histolytica*-like amoebae (Laredo strain). *Biol Cell* 1987;59(3):239-245.