



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

***Entamoeba histolytica*: influencia de la  
respuesta inmunitaria en la virulencia**

Autora: **Diana Rammal Sansón**

D.N.I.: 05944398-W

Tutor: Juan José Nogal Ruiz.

Convocatoria: 23 de Junio de 2016

## **1. RESUMEN**

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito que infecta al 10% de la población mundial dando lugar a 40.000-100.000 muertes al año por disentería amebiana y, menos frecuentemente, amebosis extraintestinal. El hospedador desarrolla una respuesta proinflamatoria excesiva e ineficaz una vez que el parásito entra en contacto con las células del mismo, lo cual causa daño tisular y ocasiona la patogenia de la enfermedad. Dentro de la respuesta inmunitaria del hospedador nos encontramos con la respuesta innata donde destacan los neutrófilos, los macrófagos y el complemento; y la adaptativa con la IgA y las células T (fenotipo Th1). Sin embargo, *E. histolytica* escapa de la respuesta inmunitaria del hospedador a través de diversos mecanismos. Uno de los más destacados es la adherencia, que induce múltiples efectos citotóxicos que pueden promover la muerte celular a través de la apoptosis, fagocitosis o trogocitosis, que pueden jugar un papel crítico en la evasión de la respuesta inmune.

## **2. ABSTRACT**

*Entamoeba histolytica* is a protozoan parasite that infects 10% of the world's population resulting in 40,000-100,000 deaths per year from amoebic dysentery and, less frequently, extraintestinal amebiasis. The host develops an excessive and ineffective proinflammatory response when the parasite contacts with the host cells. That causes tissue damage and participates in disease pathogenesis. Within the host immune response we find the innate response which includes neutrophils, macrophages and complement; and the adaptive response with IgA and T cells (Th1 phenotype). However, *E. histolytica* escapes host immune response by several mechanisms. One of the most important is the adherence, that induces multiple cytotoxic effects which can promote cell death through apoptosis, phagocytosis or trogocytosis, which may play a critical role in immune evasion.

## **3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

*Entamoeba histolytica*, el agente causal de la amebosis, es un protozoo parásito intestinal que coloniza el lumen intestinal de manera asintomática (no invasiva) en aproximadamente el 90% de los casos. Sin embargo, en el 10% de los individuos, esta relación asintomática desaparece y el parásito rompe la barrera mucosa e invade la subyacente lámina propia produciendo 40.000-100.000 muertes al año en el mundo. La incidencia de la infección por *E. histolytica* es de aproximadamente 50 millones de

personas al año. La amebosis es considerada una causa importante de morbilidad y de mortalidad en el mundo y constituye en los países en desarrollo la tercera causa de muerte por un agente parasitario, después de la malaria y de la esquistosomosis. Se trata de una afección cosmopolita siendo su prevalencia mayor en zonas templadas y con un saneamiento ambiental deficiente. Es endémica en áreas de México, América del Centro y del Sur, Asia, África y las islas del Pacífico. Además, es la tercera causa más común de diarrea crónica en viajeros.

La identificación en pacientes de otras especies de *Entamoeba* como *E. dispar* y *E. moshkovskii* ha complicado el diagnóstico de *E. histolytica*, ya que estas tres especies son indistinguibles morfológicamente por microscopía. Las dos primeras se consideran comensales aunque en estudios recientes se sugiere que pueden desempeñar un papel patógeno. Por ello, la prevalencia de la amebosis por *E. histolytica* es difícil de determinar ya que el diagnóstico por técnicas directas no es definitivo (1,2).

*E. histolytica* es anaerobio o microaerófilo, aunque es capaz de afrontar el estrés oxidativo (3). Los trofozoítos carecen de mitocondria aunque presentan mitosomas, un orgánulo subcelular que podría haber involucionado de la mitocondria (4). Su principal fuente de energía es la glucosa, pero no desarrolla el ciclo de Krebs ni la fosforilación oxidativa (5). No presenta vías para la síntesis *ex novo* de purinas, pirimidinas y timidilato porque carece de la ribonucleótido reductasa (6). La síntesis de aminoácidos se encuentra reducida salvo en el caso de la serina y la cisteína, que es muy importante por su carácter antioxidante.

Presenta dos formas bien establecidas: el trofozoíto y el quiste. El ciclo de *E. histolytica* es un ciclo directo. Los quistes son transmitidos a través de aguas, alimentos o manos contaminadas con materia fecal. Una vez que se ingiere el quiste maduro, éste desciende a través del tubo digestivo hasta el intestino, iniciándose el proceso de desenquistamiento al reblandecerse la pared del quiste. Los núcleos se duplican a ocho y finalmente se liberan pequeñas formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, las cuales crecen a trofozoítos maduros y se multiplican por fisión binaria. Los trofozoítos se desplazan del intestino delgado al grueso mediante el efecto del peristaltismo intestinal. Los trofozoítos colonizan el intestino grueso estableciéndose en la luz intestinal. De estos sitios, el parásito es nuevamente arrastrado con el tránsito intestinal, se desarrolla el enquistamiento y es expulsado con las heces en forma de quiste. El ciclo biológico se cierra con la ingestión por otra persona del quiste maduro. Los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio ambiente gracias a la

protección que les confieren sus paredes. En muchos casos, los trofozoítos se mantienen en el lumen intestinal (infección no invasiva) de los individuos que son portadores asintomáticos, eliminando quistes en las heces. En algunos pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad intestinal), o pueden invadir tejidos por contigüidad anatómica o vía hemática llegando a localizaciones extraintestinales como el hígado, el cerebro y los pulmones (enfermedad extraintestinal). Cuando el parásito invade la pared intestinal causa una serie de lesiones que conllevan al desarrollo de la disentería amebiana (7).

El hospedador desarrolla una respuesta inmune tanto innata como adaptativa contra el parásito que invade el colon. La ameba, sin embargo, ha desarrollado complejas estrategias para evadir las defensas del hospedador y promover su propia supervivencia.

#### **4. OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es revisar la influencia que tiene la respuesta inmunitaria innata y adaptativa del hospedador en la patogenia de *E. histolytica* así como los mecanismos de evasión que presenta este parásito.

#### **5. METODOLOGÍA**

En esta revisión bibliográfica, se ha utilizado PubMed, ScienceDirect y Google Académico como fuentes de artículos sobre la respuesta inmunitaria frente a *E. histolytica* así como de los mecanismos de evasión de este parásito.

#### **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **6.1. La respuesta inmunitaria innata frente a *Entamoeba histolytica***

La primera línea de defensa que se puede encuadrar dentro de la inmunidad innata la constituyen una serie de barreras físicas, químicas y biológicas que actúan protegiendo el organismo. Pretenden evitar la entrada y el asentamiento de los organismos patógenos. Son inespecíficas e intemporales. Entre otras, destacamos:

##### **a) El pH ácido del estómago (ácido clorhídrico)**

Es una línea de defensa frente a enteropatógenos sensibles al ácido. Sin embargo, los quistes de *E. histolytica* son muy resistentes porque su pared se encuentra formada por quitina y debido a ello, pasan intactos al intestino. Una vez allí, se produce la desenquistación y la migración de los trofozoítos al colon (8).

## **b) La capa mucosa del intestino**

Previene que *E. histolytica* invada las células epiteliales intestinales. La unión a las células epiteliales intestinales se produce a través de la lectina galactosa/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc) del parásito que reconoce los residuos D-galactosa y N-acetilgalactosamina presentes en las glucoproteínas. Este moco intestinal se encuentra formado por mucinas que son glucoproteínas secretadas por las células de Goblet y las glándulas submucosales. La mucina-2 (MUC2) es la mucina predominante del moco intestinal y se encuentra codificada por el gen *MUC2*. Los trofozoítos inducen la secreción de mucina a través de un secretagogo de mucina que secretan, la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). La lectina del parásito se va a unir a las glucoproteínas presentes en el moco, resultando inhibida y previniendo así la adhesión del parásito a las células del epitelio. Las glucosidasas producidas por las bacterias anaerobias residentes en el colon y las proteasas pancreáticas, pueden destruir la lectina de adherencia, impidiendo también la adhesión del parásito a las células (9).

Sin embargo, los trofozoítos pueden romper la capa mucosa y la barrera intestinal secretando cisteín proteasas y glicosidasas para permitir la penetración. Destaca específicamente la cisteín proteasa-A5 (*EhCP-A5*) que degrada la MUC2 y las proteínas de la matriz extracelular anulando su función protectora permitiendo que el parásito abra una brecha en la capa mucosa y se una a las subyacentes células epiteliales (10). La importancia de las cisteín proteasas fue demostrada en un modelo intestinal humano *ex vivo* donde trofozoítos con la *EhCP-A5* silenciada no fueron capaces de penetrar en la lámina propia (11). Además, la hipersecreción de mucina debida a la PGE<sub>2</sub> conlleva a la depleción de mucina por parte de las células intestinales epiteliales.

## **c) Los péptidos antimicrobianos intestinales**

En humanos, están divididos en tres familias: defensinas, catelicidinas e histaminas. La mayoría son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas. Estas características químicas son importantes en el mecanismo de acción microbicida. En el ser humano, la catelicidina LL-37 y en los murinos la CRAMP, son inducidos por los trofozoítos a partir del nivel del ARN mensajero y proteínas en las células epiteliales intestinales (12).

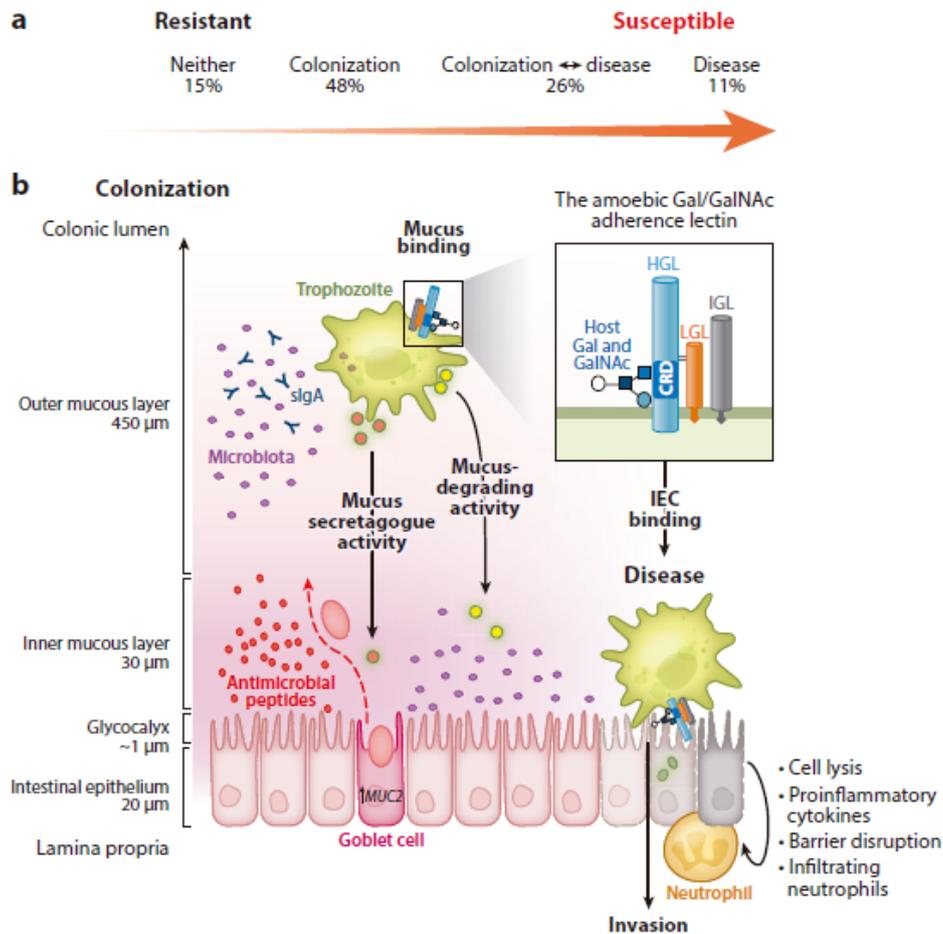
Sin embargo, las cisteín proteasas producidas por el parásito digieren la catelicidina humana LL-37 y los péptidos KR-12, KR-20 y KS-30 derivados de esta molécula antimicrobiana. El KR-20, un péptido derivado de LL-37 de 20 aminoácidos, y el KS-30, de 30 aminoácidos, afectan significativamente a la integridad y el crecimiento de los

trofozoítos. Por otro lado, se ha visto que el KR-12 (el péptido derivado de LL-37 más pequeño, de 12 aminoácidos) que posee actividad antimicrobiana y el propio LL-37 son los menos efectivos contra *E. histolytica* (13).

Además, se ha visto que la **interleucina-10 (IL-10)** mantiene la homeostasis intestinal y la integridad de la barrera mucosa. La IL-10 actúa de múltiples maneras para promover un ambiente homeostático antiinflamatorio en el intestino: amortigua la señal proinflamatoria del factor nuclear kappa B o factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) en las células epiteliales intestinales, afecta positivamente a la producción de MUC2, suprime la activación de las células presentadoras de antígenos, promueve la inducción de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Treg), ayuda a que las células B produzcan inmunoglobulina A (IgA) y tiene efectos antiapoptóticos en el epitelio. También inhibe la producción de otros mediadores inflamatorios como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) producidos por macrófagos por lo que reduce el daño al disminuir la diarrea (14).

Una **respuesta antiinflamatoria al estrés del epitelio** es beneficiosa para el hospedador. Los componentes secretados desde los trofozoítos inducen una respuesta protectora frente al estrés en las células epiteliales del colon a través de una interacción con los macrófagos. Los componentes amebianos secretados inducen la expresión y la activación del factor de transcripción de choque térmico HSF-1. El HSF-1 es un activador transcripcional de proteínas de choque térmico (HSP), lo que conlleva a una expresión al alza de las proteínas HSP 27 y HSP 72. Altos niveles de HSP 72 tienen un efecto antiapoptótico y conlleva a un incremento de la supervivencia del enterocito. Por otro lado, altos niveles de HSP 27 van a suprimir la activación del NF- $\kappa$ B y por lo tanto la expresión de genes proinflamatorios (15).

Posteriormente, si hay una **pérdida de la tolerancia** o no se establece tolerancia, los trofozoítos comienzan la invasión. Las células epiteliales intestinales expuestas o en contacto con los trofozoítos secretan potentes citoquinas inflamatorias tales como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y la proteína quimioatrayente de los monocitos 1 (MCP-1), que produce, por una parte, una moderada inflamación epitelial y subepitelial y, por otro lado, un reclutamiento e infiltración en la lámina propia y el epitelio intestinal de células de la respuesta inmunitaria, tales como los neutrófilos, monocitos, células dendríticas y macrófagos. Esto daría lugar a la diarrea y/o disentería (16).



**Fig.1.** Esquema de la acción de la capa mucosa del intestino y de los péptidos antimicrobianos intestinales y la adhesión del trofozoíto a las células epiteliales intestinales (Tomado de Marie y Petri, 2014).

### 6.1.1. La función del LPPG como un PAMP y su papel en la inflamación

Los proteofosfoglicanos (PPG) se caracterizan por tener un anclaje glicosilfosfatidilinositol y son abundantes en la superficie de los trofozoítos. Pueden subdividirse en dos familias: los lipofosfoglicanos (LPG) y los lipofosfopeptidoglicanos (LPPG) (17). Las similitudes en la estructura química entre el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas y el LPPG y la presencia de un punto de anclaje glicosilfosfatidilinositol en el LPPG, sugieren que el LPPG sea un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP). Esto podría explicar cómo el sistema inmune detecta la presencia de *E. histolytica*, evento que es necesario para que tenga lugar la respuesta inflamatoria. El LPPG actúa como un PAMP que es reconocido a través de los receptores de tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4). Esta interacción produce la activación del NF-κB y la liberación de interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12p40) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) por los monocitos humanos

(18). También induce la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), una citoquina que activa a los macrófagos e incrementa las respuestas citotóxicas de las células T, a través de las células NKT (19).

Los macrófagos y las células dendríticas (CDs) internalizan el LPPG que favorece su activación. Los neutrófilos son las primeras células que se infiltran en las lesiones necróticas producidas por *E. histolytica* en el intestino y en el hígado. Las enzimas y las especies reactivas de oxígeno liberadas por los neutrófilos incrementan el daño tisular, y en este contexto, el LPPG puede ser visto como un factor de virulencia que promueve la invasión tisular causando un daño inflamatorio a las células del hospedador.

La lectina Gal/GalNAc y el ADN de los trofozoítos también actúan como PAMPs. Cuando la lectina Gal/GalNAc se une a los macrófagos, se activan el NF- $\kappa$ B y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) incrementando la expresión del TLR2 y suprimiendo la del TLR4. Además, la unión de la lectina al TLR2 activa la vía NF- $\kappa$ B aumentando la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 e IL-8. También aumenta la producción de la molécula coestimuladora CD80 que es necesaria para activar a los linfocitos T CD4+.

La unión de la lectina Gal/GalNAc así como la unión del LPPG a las células dendríticas a través de los TLR2 y TLR4 aumenta la expresión de citoquinas como la interleucina 12 (IL-12), TNF- $\alpha$ , moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40 y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II).

Adicionalmente, el ADN de *E. histolytica* puede activar a los macrófagos a través de la interacción con el receptor de tipo Toll 9 (TLR9) produciendo la liberación de TNF- $\alpha$  (20,21,22).

Por lo tanto, se podría decir que el LPPG, la lectina Gal/GalNAc y el ADN del parásito, contribuyen a la iniciación de la inflamación en la respuesta frente a *E. histolytica*.

Recientemente se ha visto que el LPPG protege frente a la amebosis invasiva. La estructura química del LPPG tiene algunas similitudes con la alfa-galactosilceramida, que se relaciona con la activación de células Natural Killer T (NKT) (23).

### **6.1.2. Los neutrófilos**

Son una de las primeras células inmunes en responder a la invasión amebiana. *In vitro*, se ha visto que los neutrófilos son activados por el IFN- $\gamma$  o por el TNF- $\alpha$  llevando a cabo una actividad amebicida liberando especies reactivas de oxígeno (ROS) (24).

Los neutrófilos activados son capaces de eliminar los trofozoítos de *E. histolytica* a través de mecanismos como la producción de óxido nítrico (NO) y otros intermediarios de oxígeno. En un modelo murino, en el cual el gen para la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) no se expresa, los abscesos hepáticos eran de mayor tamaño que los observados en los ratones normales. Aunque juegan un papel protector en la amebosis, se ha señalado también que estas células están asociadas al daño observado en las lesiones amebianas y posiblemente contribuyan a la diseminación del parásito a capas más profundas del tejido intestinal. *E. histolytica* es capaz de eliminar, lisar y fagocitar a los neutrófilos. *In vitro*, se pudo observar que un trofozoíto elimina aproximadamente 3.000 neutrófilos (25).

Hay varios mecanismos opuestos por los cuales las amebas interfieren con las funciones de los neutrófilos:

1. *E. histolytica* puede interrumpir la actividad de la NADPH oxidasa e inhibir el estallido respiratorio de los neutrófilos, para evitar el estrés oxidativo, a través de enzimas antioxidantes. Entre ellas destacan: la ferro-superóxido dismutasa, la NADPH:flavín oxidorreductasa, la peroxirredoxina y la tiorredoxina. Las dos primeras son capaces de detoxificar las especies reactivas de oxígeno produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (26,27). La peroxirredoxina es una proteína de superficie rica en cisteína de 29 kDa que tiene una potente actividad antioxidante protegiendo a la ameba, especialmente, del peróxido de hidrógeno (28).
2. Estudios han mostrado que *E. histolytica* puede inducir la apoptosis en los neutrófilos debido a la generación de ROS por la NADPH oxidasa a través de la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) (29). Además, el trofozoíto se puede adherir al neutrófilo a través de la integrina-β2 (CD18) dando lugar a las siguientes respuestas en el fagocito: producción de ROS a partir de la activación de la NADPH oxidasa modulada por la integrina-β2, degranulación, redistribución del citoesqueleto, migración a focos inflamatorios, transcripción de genes, proliferación celular y apoptosis (30).
3. Los trofozoítos activados secretan un inhibidor de la serín proteasa denominado *Ehserp*, que se une formando un complejo e inactiva a la catepsina G liberada por los neutrófilos activados (31).

### **6.1.3. Los macrófagos**

Juegan también un papel importante en la amebosis intestinal, actuando como amebicidas, tras ser estimulados por el IFN-γ o el TNF-α (32,33). La inducción de

interleucinas, como el TNF- $\alpha$ , está asociada a la destrucción de los trofozoítos de *E. histolytica*. Además, el aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  disminuye la incidencia de la infección por este parásito. Estas dos interleucinas potencian la expresión de la iNOS.

La actividad amebicida de los macrófagos se relaciona con la producción de NO. El NO se produce por la acción de la iNOS a partir de la L-arginina. Se ha demostrado experimentalmente que los ratones deficientes en iNOS son más susceptibles al absceso hepático amebiano (AHA) y a la apoptosis hepatocítica inducida por *E. histolytica*, mostrando el papel crítico del NO en la defensa del hospedador frente a la amebosis (34).

Dentro de los mecanismos de evasión de los macrófagos nos encontramos con:

1. Los trofozoítos inhiben el estallido respiratorio (ROS: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sup>2-</sup>, OH<sup>-</sup>) y la producción de óxido nítrico:
  - a. El sustrato de la iNOS, la L-arginina, se convierte competitivamente a L-ornitina a través de la arginasa de la ameba, lo cual limitará la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos (35).
  - b. *E. histolytica* produce directamente o induce a los macrófagos a producir la molécula inmunorreguladora PGE<sub>2</sub>. La PGE<sub>2</sub> es sintetizada a través de una enzima similar a la ciclooxigenasa (COX) producida por el parásito (36). Uniéndose a los receptores de prostaglandina E 2 y 4 (EP2/4), la PGE<sub>2</sub> incrementa los niveles en el macrófago de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que inhibe la liberación de citoquinas características del perfil Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), el estallido oxidativo mediado por la NADPH oxidasa y la síntesis de óxido nítrico a través de la vía de la proteína quinasa C (PKC). Además, la PGE<sub>2</sub> induce la IL-8 pero reduce la expresión del CMH-II de los macrófagos, que podría inhibir la activación de las células T y su capacidad oxidativa. Asimismo, altos niveles de PGE<sub>2</sub> bloquean la producción de TNF- $\alpha$ , lo cual a su vez podría ejercer efectos negativos sobre la síntesis de óxido nítrico, y tienen la capacidad de inhibir el efecto inductor del IFN- $\gamma$  (37).
  - c. El pentapéptido inmunosupresor denominado factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) producido por *E. histolytica* muestra actividades antiinflamatorias al inhibir la producción de óxido nítrico y el estallido respiratorio modulando así la función de los macrófagos y neutrófilos (38).

#### 6.1.4. El complemento

El complemento es el principal sistema efector citolítico presente en el suero. Los trofozoítos de *E. histolytica* activan el complemento por las vías clásica y alternativa. Inducen la conversión del componente B en Bb y Ba y también activan la vía clásica porque unen moléculas C3b a sus membranas en ausencia de anticuerpos específicos. El complemento puede participar en el daño a los trofozoítos por mecanismos como lisis provocada por la acción del complemento en forma dependiente o independiente de anticuerpos y muerte de las amebas mediada por células fagocíticas. El sistema del complemento del hospedador es capaz de prevenir la diseminación de los trofozoítos hacia el espacio extraintestinal (39). La activación del complemento tiene lugar a partir de la ruptura de C3 a partir de la proteasa neutra de cisteína de 56 KDa (40). La degradación de C3 se da en la cadena  $\alpha$  entre los residuos Ser y Asn en las posiciones 78 y 79, de manera muy similar a la ruptura de C3 por las convertasas. También se produce la ruptura de C5.

El parásito cuenta con diversas estrategias para evadir la actividad del complemento:

a) Según Reed y colaboradores, la resistencia o susceptibilidad al complemento está correlacionada con los zimodemos de los trofozoítos aislados. El zimodemo es una población de *E. histolytica* que difiere de una población similar de acuerdo con la movilidad electroforética que presenten ciertas isoenzimas. Las isoenzimas son distintas formas moleculares de una misma enzima que presentan o muestran especificidad por el mismo sustrato. Las alteraciones en la carga eléctrica neta se producen por sustitución de un aminoácido por otro de distinta polaridad. Las amebas mantenidas en medio de Robinson con zimodemo I y III no patógenos fueron susceptibles a la lisis por la activación de la vía alterna del complemento. Por el contrario, 9 de 11 cepas patógenas (zimodemos II, IX y XIV) cultivadas bajo condiciones idénticas, fueron resistentes a la citolisis por el complemento (41). Otros autores sugieren que la resistencia es una capacidad adquirida y no el resultado de un proceso de selección de una subclona genéticamente resistente. Esta resistencia depende de la presencia continua de suero, lo que sugiere que es inducida por el complemento.

b) La activación del complemento finaliza con la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), que potencialmente puede lisar al parásito. Existe una proteína de membrana inhibitoria del MAC denominada protectina o CD59 que inhibe la unión del C9 al complejo C5b678 del complemento. La lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica*

presenta analogía de secuencia con la protectina. Esto hace que no se forme el MAC y no se lise el parásito (42).

c) Los componentes C3a y C5a (anafilotoxinas) relacionados con el inicio de la fase vascular de la inflamación son degradados por las cisteín proteasas extracelulares secretadas por *E. histolytica* (43).

### **6.1.5. Citotoxicidad contacto-dependiente**

#### **a) Inducción de la muerte celular o apoptosis**

El parásito se adhiere a la célula diana a través de la lectina Gal/GalNAc a determinantes carbohidratados que contengan residuos de D-galactosa o N-acetilgalactosamina. Esto produce la producción de ROS y un aumento del calcio intracelular. Este calcio va a activar a la calpaína que es una cisteín proteasa que necesita calcio para su activación. Esta proteasa activará a la caspasa 12 y ésta a la caspasa 3, produciéndose finalmente la muerte celular. En este caso la apoptosis no se encuentra mediada por la vía clásica del Fas/FasL (Fas ligando) o del receptor TNF- $\alpha$ . También cabe destacar que esta apoptosis es inmunológicamente silenciosa (44).

#### **b) Fagocitosis**

En el caso de *E. histolytica* al igual que en otros organismos multicelulares, la fagocitosis es el último paso de la apoptosis para limpiar las células muertas sin provocar una respuesta inflamatoria por los componentes tóxicos de los restos celulares (45). Una vez que la célula sufre la apoptosis, ésta expresa en su superficie la fosfatidilserina (PS) la cual es una molécula clave para que se produzca la fagocitosis. Las células del hospedador serán fagocitadas por este parásito con la ayuda de la C1q y la fosfatidilserina, las cuales se unen a la calreticulina amebiana y al dominio 2 de la proteína quinasa de *E. histolytica* (*EhC2PK*), respectivamente. Las quinasas amebianas PATMK, TMKB1-9 y TMK39 también se encuentran involucradas en la fagocitosis. Con esta estrategia, *E. histolytica* restringe las respuestas inflamatorias del hospedador y hace que la infección sea más prolongada (46).

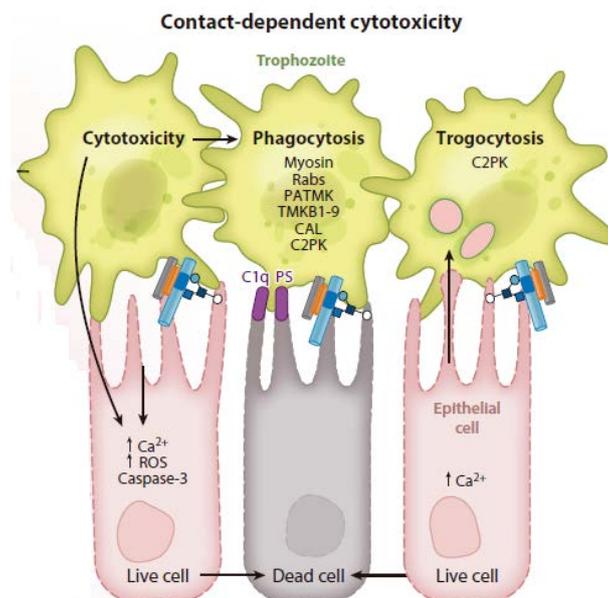
#### **c) Trogocitosis**

La trogocitosis amebiana tiene lugar en células vivas y consiste en ingerir porciones de las células del hospedador. La trogocitosis se inicia cuando la lectina Gal/GalNAc

del parásito se une a las glucoproteínas del hospedador que contienen D-galactosa o N-acetilgalactosamina provocando un aumento del calcio intracelular de la célula del hospedador a través de la activación de canales de calcio. En el proceso de la trogocitosis también participan la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PIK3) y la *EhC2PK*. La ingestión de fragmentos del material celular de la célula del hospedador eventualmente da lugar a la muerte celular. Ésta se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana y el potencial mitocondrial. Una vez se ha producido la muerte celular, la ameba se disocia de la célula muerta (47).

### 6.1.6. Efectos contacto-independientes

La  $PGE_2$  secretada por la ameba se une al receptor 4 de la prostaglandina E (EP4) de las células epiteliales intestinales del hospedador y altera la localización de la claudina-4. La claudina-4 es una proteína integral de membrana que participa en el mantenimiento de la propiedad formadora de barrera de las uniones estrechas. Esto conlleva a la disminución de la integridad de la unión celular y al incremento de la secreción luminal de  $Cl^-$ . La  $PGE_2$  también altera el gradiente de iones al disminuir la absorción celular de  $Na^{2+}$  e incrementar la secreción de  $Na^{2+}$  y  $Cl^-$  hacia la zona luminal. La ruptura de la barrera celular junto con la alteración del gradiente de iones en el epitelio intestinal da lugar a la diarrea (48).



**Fig.2.** Citotoxicidad contacto-dependiente de *E. histolytica*: apoptosis, fagocitosis y trogocitosis (Tomado de Marie y Petri 2014).

## 6.2. La respuesta inmunitaria adaptativa frente a *Entamoeba histolytica*

Tanto la respuesta inmune humoral como la celular participan en la defensa del hospedador frente a la invasión por *E. histolytica*. La producción de IgA secretora contra el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de la lectina Gal/GalNAc, previene la adherencia de los trofozoítos a la capa mucosa y células epiteliales. Actúa de múltiples maneras previniendo la invasión y manteniendo la interacción comensal entre el hospedador y el parásito (49). Se ha relacionado con protección contra la infección y el desarrollo de enfermedad. Los niños que forman estos anticuerpos tienen 85% menos reinfecciones que aquellos niños que no poseen la IgA secretora (50). En contraste, los anticuerpos IgA e inmuglobulina G (IgG) séricos contra la lectina no parecen proporcionar protección.

También se ha detectado la producción de anticuerpos anti-LPPG, confirmando la teoría de que esta molécula es capaz de activar tanto el sistema inmune innato como el adaptativo (51).

A pesar de esto, *E. histolytica* ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Entre estos, podemos mencionar el *capping*, un mecanismo de evasión inmunológica a través del cual los receptores de la superficie del parásito, que han sido reconocidos por anticuerpos del hospedador, son polarizados hacia el extremo posterior del mismo y eliminados de la superficie. Esto se consigue a través de la actividad de la proteasa romboidal 1, una enzima amebiana que es capaz de cortar proteínas integrales en su dominio transmembrana. Se ha demostrado que la proteasa romboidal 1 es capaz de cortar la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc, y que ésta se moviliza hacia la zona de la membrana celular en la que se han agrupado los receptores durante el proceso de *capping* (52).

Además, las cisteín proteasas extracelulares de *E. histolytica* juegan un papel clave en la ruptura de la defensa adaptativa ya que rompen la IgA secretora y la IgG sérica (53).

Una respuesta inmune efectiva requiere de la activación de células T específicas, lo que conlleva a la producción de las citocinas apropiadas y a la citotoxicidad directa sobre este parásito. Para esto, las células T deben interactuar con las células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas se activan por la lectina Gal/GalNAc, lo que provoca un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40 y de moléculas del CMH-II. También la lectina favorece la producción



## **7. CONCLUSIÓN**

Tanto la respuesta inmunitaria innata como adaptativa del hospedador inmunocompetente son consistentes frente a *Entamoeba histolytica*, pero aun así, este parásito es capaz de sobrevivir desarrollando estrategias de evasión frente al sistema inmunitario. Por ello, es necesario profundizar en el conocimiento y en el estudio de estas estrategias de evasión para comprender la relación parásito-hospedador. Como farmacéuticos, es de gran interés conocer esta relación así como las moléculas inmunológicas implicadas para poder desarrollar vacunas y una inmunoterapia efectiva.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, et al. Human Amebiasis: Breaking the Paradigm? Int J Environ Res Public Health. 2010 Mar; 7(3): 1105-1120.
- (2) Chacín-Bonilla L. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. Rev méd Chile. 2013; 141(5): 609-615.
- (3) González M, Carballar R, Carabarán A, Espíritu A, Luisrosales J. Estrés oxidativo y nitrosativo: el inicio de la batalla. Avance y Perspectiva. 2011; 3(2).
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) Anderson IJ, Loftus BJ. *Entamoeba histolytica*: observations on metabolism based on the genome sequence. Exp Parasitol. 2005 Jul; 110(3): 173-177.
- (7) Romero CR. Microbiología y Parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Médica Panamericana; 2007.
- (8) Moonah SN, Jiang NM, Petri WA. Host Immune Response to Intestinal Amebiasis. Knoll LJ, ed. PLoS Pathogens. 2013; 9(8): e1003489.
- (9) Chadee K, Petri WA Jr, Innes DJ, Ravdin JI. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. J Clin Invest. 1987; 80: 1245-1254.

- (10) Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC 2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 9298–9303.
- (11) Bansal D, Ave P, Kerneis S, Frileux P, Boché O, et al. An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Nov 17; 3(11): e551.
- (12) Cobo ER, He C, Hirata K, Hwang G, Tran U, Eckmann L, et al. *Entamoeba histolytica* induces intestinal cathelicidins but is resistant to cathelicidin-mediated killing. *Infect Immun*. 2012; 80: 143-149.
- (13) Rico-Mata R, De Leon-Rodriguez LM, Avila EE. Effect of antimicrobial peptides derived from human cathelicidin LL-37 on *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Exp Parasitol*. 2013 Mar; 133(3): 300–306.
- (14) Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC, Sartor RB, Haller D. IL-10 gene-deficient mice lack TGF- $\beta$ /Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *J Immunol*. 2005; 174: 2990–2999.
- (15) Lejeune M, Rybicka J, Chadee K. Recent Discoveries in the Pathogenesis and Immune Response Toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol*. 2009; 4(1): 105-118.
- (16) Mortimer L, Chadee K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*. 2010 Nov; 126(3): 366-80.
- (17) Lauwaet T, Oliveira MJ, De Bruyne G, Bruchhaus I, Duchêne M, Mareel M, et al. *Entamoeba histolytica* trophozoites transfer lipophosphopeptidoglycans to enteric cell layers. *Int. J. Parasitol*. 2004; 34: 549–556.
- (18) Maldonado C, Trejo W, Ramirez A, et al. Lipophosphopeptidoglycan of *Entamoeba histolytica* induces an anti-inflammatory innate immune response and downregulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes. *Arch Med Res*. 2000; 31(4): 71-73.
- (19) Van-Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol*. 2005; 15(11): 429–431.
- (20) Vivanco-Cid H, Alpuche-Aranda C, Wong-Baeza I, et al. Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunol*. 2007; 29(9): 467–474.

- (21) Ivory CPA, Prystajek M, Jobin C, Chadee K. Toll-like receptor 9-dependent macrophage activation by *Entamoeba histolytica* DNA. *Infect Immun*. 2008; 76(1): 289–297.
- (22) Kammanadiminti SJ, Mann BJ, Dutil L, Chadee K. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal lectin of *Entamoeba histolytica*. *FASEB J*. 2004; 18(1): 155–157.
- (23) Burdin N, Brossay L, Koezuka Y, et al. Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J Immunol*. 1998; 161(7): 3271–3281.
- (24) Denis M, Chadee K. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *J Leukoc Biol*. 1989; 46: 270–274.
- (25) Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis*. 1981; 143: 83–93.
- (26) Elnekave K, Siman-Tov R, Ankri S. Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. *Parasite Immunol*. 2003; 25: 597–608.
- (27) Bruchhaus I, Richter S, Tannich E. Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem J*. 1998; 330: 1217–1221.
- (28) Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, Stanley SL. Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol*. 2006; 61: 1523-1532.
- (29) Sim S, Yong TS, Park SJ, Im KI, Kong Y, Ryu JS, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J Immunol*. 2005; 174: 4279–4288.
- (30) Sim S, Park SJ, Yong TS, Im KI, Shin MH. Involvement of  $\beta$ 2-integrin in ROS-mediated neutrophil apoptosis induced by *Entamoeba histolytica*. *Microbes Infect*. 2007; 9: 1368-1375.

- (31) Riahi Y, Simon-Tov R, Ankri S. Molecular cloning, expression and characterization of a serine proteinase inhibitor gene from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004; 133: 153-162.
- (32) Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun*. 1994; 62: 1534-1541.
- (33) Ghadirian E, Denis M. *Entamoeba histolytica* extract and interferon-gamma activation of macrophage-mediated amoebicidal function. *Immunobiology*. 1992; 185: 1-10.
- (34) Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL Jr. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun*. 2000; 68: 400-402.
- (35) Elnekave K, Siman-Tov R, Ankri S. Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. *Parasite Immunol*. 2003; 25: 597-608.
- (36) Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 13561-13566.
- (37) Wang W, Chadee K. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect Immun*. 1995; 63: 1089-1094.
- (38) Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez JA, Kretschmer RR. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res*. 2003; 90: 264-267.
- (39) Calderón J. The role of complement in host defense against *Entamoeba histolytica*. *En Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica*. 1998; 453-463.
- (40) Reed SL, Keene WE, Me Kerrow JH, Gigli I. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol*. 1989; 143: 189-195.
- (41) Reed SL, Sargeant PG, Braude AI. Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987; 77: 248-253.

- (42) Braga LL, Ninomiya H, Me Coy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, et al. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. J Clin Invest. 1992; 90: 1131-1137.
- (43) Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero J.C, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. Trends Parasitol. 2002; 18: 272-278.
- (44) Campos-Rodríguez R, Jarillo-Luna A. The pathogenicity of *Entamoeba histolytica* is related to the capacity of evading innate immunity. Parasite Immunol. 2005 Jan-Feb; 27(1-2): 1-8.
- (45) Fadok V.A, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. J Clin Invest. 2001 Oct; 108(7): 957-62.
- (46) Begum S, Quach J, Chadee K. Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease. Front Microbiol. 2015 Dec 15; 6: 1394.
- (47) Ralston KS. Taking a bite: Amoebic trophocytosis in *Entamoeba histolytica* and beyond. Curr Opin in Microbiol. 2015 Dec; 28: 26-35.
- (48) Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. Cell Host Microbe. 2007; 2: 328-339.
- (49) Marie C, Petri WA Jr. Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. Annu Rev Microbiol. 2014; 68: 493- 520.
- (50) Carrada T. Amebiasis cutánea: parasitosis emergente y letal. Piel. 2005; 20: 28-34.
- (51) Wong-Baeza I, Alcántara-Hernández M, Mancilla-Herrera I, et al. The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*. J Biomed Biotechnol. 2010; 254521.
- (52) Baxt LA, Singh U. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. Curr Opin Infect Dis. 2008; 21: 489-494.
- (53) Que X, Reed SL. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. Parasitol Today. 1997; 13: 190-194.
- (54) Yamamoto M, Vancott JL, Okahashi N et al. The role of Th1 and Th2 cells for mucosal IgA responses. Ann N Y Acad Sci. 1996; 778: 64-71.
- (55) Guo X, Houpt E, Petri WA Jr. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. Curr Opin Immunol. 2007; 19: 376-384.