



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Respuesta inmune frente a *Entamoeba
histolytica***

Autor: Ugarte Mer Merino, Elena

Tutor: FranciscoFrancisco Ponce Gordo

Convocatoria: JuJunio 2018

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción y antecedentes	3
3. Objetivos.....	5
4. Metodología.....	5
5. Resultados y discusión	
5.1 Curso de la infección por <i>Entamoeba histolytica</i>	5
5.2 Respuesta inmunitaria frente a <i>Entamoeba histolytica</i>	6
1. Inmunidad innata.....	6
a) Lipopeptidoglicano (LPPG).....	7
b) Secreción de PGE2 por la ameba	8
c) Neutrófilos	8
d) Macrófagos	9
e) Factor activador de la migración de macrófagos (MIF)	11
2. Inmunidad adaptativa	11
5.3 Mecanismos de evasión inmune por <i>Entamoeba histolytica</i>	13
a) Interrupción de las barreras físicas del hospedador	13
b) Inactivación del sistema del complemento	14
c) Interferencia con las funciones de los neutrófilos	15
d) Inhibición del estallido respiratorio de los macrófagos.....	15
e) Participación de PGE2 en la evasión del sistema inmune	16
f) Muerte celular inducida por <i>Entamoeba histolytica</i>	16
f.1) Muerte celular apoptótica	16
f.2) Fagocitosis	17
f.3) Trogocitosis	17
6. Conclusiones.....	18
7. Bibliografía.....	19

1. RESUMEN

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito intestinal responsable de producir la disentería amebiana, y en un menor número de casos, de producir amebiasis extraintestinal. Esta enfermedad afecta al 10% de la población mundial, causando aproximadamente 100.000 muertes cada año. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad pueden variar en función de factores genéticos, tanto del parásito como del individuo infectado, y de factores exógenos como la microbiota humana. Además, la infección amebiana presenta diferentes etapas, pero no todas ocurren en todos los individuos. Estas etapas son la degradación e invasión de la capa mucosa del intestino, adherencia al epitelio intestinal, invasión de tejidos y diseminación hacia diferentes órganos.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito que afecta al ser humano. Otra especie que afecta al ser humano es *Entamoeba dispar*, pero carece del poder patógeno que presenta *E. histolytica*.

Las amebas presentan dos fases de desarrollo, una trófica o vegetativa, durante la cual se forma el trofozoito, y una fase quística o de resistencia, durante la que aparece el quiste. Los trofozoitos colonizan el intestino grueso del huésped, se movilizan mediante pseudópodos y se multiplican mediante fisión binaria, que es un mecanismo de reproducción asexual que consiste en la duplicación del ADN, seguida de la división del citoplasma, dando lugar a dos células hijas. A continuación, durante su camino hacia el exterior del huésped, se dividen en formas más pequeñas, dejan de alimentarse y se rodean de una pared delgada y resistente para transformarse en quistes. En un principio estos quistes son mononucleares, pero después se subdividen mediante dos mitosis consecutivas, dando lugar sucesivamente a dos y cuatro núcleos. Estos quistes multinucleares se expulsan al exterior mediante las heces del huésped; al ser ingeridos por otro huésped a través de alimentos o agua contaminados se desenquistan en el intestino delgado y dan origen a cuatro trofozoitos nuevos que avanzan al intestino grueso, donde se reanuda la multiplicación.

Los trofozoitos son prácticamente las únicas formas presentes en las heces diarreicas, y tienen poca importancia en la transmisión de la enfermedad debido a que son poco resistentes a la desecación y a la acción de los jugos gástricos a su paso por el estómago.

Por el contrario, los quistes se encuentran en las deposiciones pastosas o formadas, y son los principales responsables de la transmisión de la enfermedad a otros individuos, ya que sobreviven a temperaturas de 28°C-34°C durante 8 días, y a temperaturas de 2°C-6°C durante 40 días. Por estas razones, el portador sano o el enfermo crónico son fuentes más efectivas de transmisión que el enfermo agudo.

También se ha demostrado que las prácticas sexuales que incluyen contactos anales constituyen un importante factor de riesgo para la transmisión de la amebiasis.

El diagnóstico de esta enfermedad se establece mediante el cuadro clínico, análisis de sangre e identificación del parásito en las heces. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea líquida generalmente acompañada de moco y sangre, sudoración, fiebre, cansancio, cefaleas, pérdida del apetito, náuseas y vómitos, dolor en el tórax, leucocitosis y dolor intenso en el abdomen, sobre todo al presionarlo. Otro estudio que ayuda al diagnóstico es la colonoscopia, que permite la observación directa de las ulceraciones intestinales causadas por el parásito. Por otro lado, el análisis de sangre se realiza mediante técnicas como ELISA y “western blot”, que buscan antígenos del parásito o anticuerpos humanos frente a éste. Por último, el examen de heces se realiza haciendo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para distinguir *E. histolytica* de *E. dispar*, pero es una técnica costosa que no está al alcance en lugares donde la enfermedad se presenta con mayor frecuencia.

Actualmente, no existe una vacuna efectiva frente a esta enfermedad, sin embargo existen fármacos que sí lo son, como la cloroquina, la emetina y el metronidazol. El metronidazol es el fármaco de elección debido a sus mínimos efectos secundarios, y pertenece al grupo los nitroimidazoles. Este fármaco tiene buena biodisponibilidad y distribución por todos los tejidos, ya que penetra fácilmente por difusión pasiva, convirtiéndose en su forma activa en microambientes con potencial reducción-oxidación negativo donde se encuentran microorganismos anaerobios o microanaerobios. De esta forma permanece inocuo en el resto de tejidos del hospedador. Por otro lado, una de las razones por las que la amebiasis continúa siendo un grave problema de salud en los países pobres, es que ningún fármaco, incluyendo al metronidazol, tiene efecto citotóxico sobre los quistes del parásito.

3. OBJETIVOS

En este trabajo se realiza una revisión bibliográfica para:

- Estudiar cómo el parásito es capaz de colonizar e invadir el organismo del huésped mediante diversos mecanismos moleculares.
- Analizar cómo el sistema inmunitario del huésped responde a dicha invasión mediante diferentes procesos inmunológicos.
- Estudiar los mecanismos por los cuáles el parásito contraataca al sistema inmunitario para conseguir sobrevivir en el organismo hospedador.

4. METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando PubMed y Google Académico como fuentes de artículos sobre la patogenia de *E. histolytica* y los mecanismos de evasión de este parásito.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Curso de la infección por *Entamoeba histolytica*

Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* presentan una glucoproteína de superficie llamada **lectina galactosa/N-acetil-D-galactosamina** (lectina Gal/GalNAc), que reconoce residuos de N-acetil-D-galactosamina de las glucoproteínas del mucus intestinal o de la matriz extracelular, lo que hace posible la adherencia del parásito al mucus intestinal y a las células hospedadoras (1). Esta glucoproteína puede estar implicada en la activación de la caspasa humana 3 y en la inducción de la apoptosis celular, además de ser fundamental en los procesos de locomoción y fagocitosis de los trofozoitos. Debido a su parecido estructural, presenta reactividad antigénica cruzada con CD59 que se une al componente C9 del complemento, por lo que inhibe la formación del complejo de ataque a membrana del sistema del complemento (2).

Otra molécula importante en el proceso de adherencia es la **adhesina EhADH112**, que se encuentra en el complejo inmunogénico EhCPADH, el cual es un complejo de proteínas heterodiméricas localizado en la membrana plasmática y en las vacuolas citoplasmáticas. La adhesina EhADH112 es una glucoproteína que, además, está involucrada directamente en la ingestión de células diana por los trofozoitos, por lo que también se le considera una fagosina (3).

Una vez que se produce la adherencia, el parásito es capaz de penetrar en el epitelio y destruir componentes esenciales del hospedador, gracias a los amebaporos, y a enzimas hidrolíticas, como las cisteína proteasas (CP). Los **amebaporos** son proteínas que forman canales que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas, alterando el equilibrio osmótico de la célula y produciéndose la lisis. Las **cisteína proteasas** son proteínas de secreción, críticas para la invasión del tejido por su capacidad para degradar componentes de la matriz extracelular, como colágeno, elastina, fibrinógeno y laminina. También interfieren en la función del sistema inmune al inactivar al precursor inactivo de IL-18, hidrolizar a C3, IgG e IgA (4).

5.2 Respuesta inmunitaria frente a *Entamoeba histolytica*

El organismo se defiende del parásito mediante la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata está constituida por una serie de barreras físicas, químicas y biológicas que protegen al organismo, evitando la entrada y la colonización de epitelios por microorganismos patógenos, mientras que la inmunidad adaptativa es mucho más específica a un patógeno invasor, y ocurre tras la exposición a un antígeno, ya sea de un patógeno o de una vacuna.

1. Inmunidad innata

El **pH ácido del estómago** lo aporta el ácido clorhídrico y actúa como la primera línea de defensa del organismo frente a los enteropatógenos, ya que destruye microorganismos sensibles a los ácidos. Sin embargo, los quistes amebianos, son resistentes al pH ácido estomacal y sobreviven a su paso a través del estómago (5).

En segundo lugar, la **barrera mucosa del colon** presenta una capa de mucina e inmunoglobulinas A (IgAs) procedentes del hospedador y de la microbiota comensal, que evitan que *E. histolytica* invada las células epiteliales intestinales (CEI) (1). La mucina es un componente principal de la capa de moco intestinal, y está secretada por las células caliciformes y por las glándulas submucosas. Las glucoproteínas de la mucina se unen e inhiben a la lectina Gal/GalNAc de adherencia del parásito, evitando así la adhesión al epitelio intestinal y la destrucción de células hospedadoras. Sin embargo, los trofozoitos pueden alterar la capa mucosa mediante la secreción de cisteína proteasas y glicosidasas, permitiendo la penetración de la mucosa colónica. De estos mecanismos de alteración de la mucosa hablaremos más adelante.

La colonización de la capa de mucina del colon por *E. histolytica* va seguida de una respuesta proinflamatoria que causa daño tisular inespecífico, lo que puede conducir a una invasión por el parásito de la mucosa colónica subyacente. Esta respuesta proinflamatoria está estimulada por los siguientes factores:

a) Lipopéptidofosfoglicano (LPPG)

El lipopolisacárido (LPS) es un componente estructural de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, activa muchos tipos de células diferentes e induce inflamación en los tejidos del hospedador. Para determinar si *E. histolytica* tenía una molécula de superficie con propiedades químicas e inmunológicas similares a las de los LPS bacterianos se llevó a cabo un procedimiento de extracción de fenol-agua modificado en trofozoitos de *E. histolytica* y se obtuvo una molécula con un 85% de carbohidratos, un 8% de péptidos, un 2.5% de lípidos y un 1% de fosfato, que se denominó lipopéptidofosfoglicano (LPPG). Las similitudes en la estructura química de estas dos moléculas, y la presencia de un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) en LPPG, sugirieron que LPPG podría ser un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP). Los PAMPs son moléculas esenciales para el metabolismo e integridad estructural del organismo patógeno detectadas por los TLR, lo que explica cómo el sistema inmunitario innato detecta la presencia de la ameba en el organismo.

LPPG es reconocido por los receptores TLR2 y TLR4, lo que hace que se active el factor NF κ B y la liberación de IL-8, IL-10, IL-12p40 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) de monocitos humanos. Los macrófagos humanos y las células dendríticas se encargan de internalizar al LPPG en los endosomas. Además, las células dendríticas activadas por el LPPG tienen una sobreexpresión de moléculas coestimulantes CD80, CD86 y CD40, y producen IL-8, IL-12 y TNF- α . Las células natural killer (NK) también se activan mediante el LPPG, lo que depende de la presencia de CD1d en las células dendríticas y la señalización simultánea de TLR2 y TLR6. Además, la señalización del LPPG a través de los receptores TLR2 y TLR4 inducen la producción de interferón- γ (IFN- γ) por las células NK. El IFN- γ es una citocina que activa a los macrófagos y aumenta la respuesta de células T citotóxicas.

El LPPG es un antígeno de *E. histolytica*, ya que se han detectado anticuerpos anti-LPPG en modelos animales y en pacientes con amebiasis. El mecanismo que conduce a

la producción de estos anticuerpos no ha sido determinado, pero probablemente esté influenciado por la señalización innata.

El hecho de que el LPPG sea un factor de virulencia y presente inmunogenicidad intrínseca, lo hacen un posible candidato para el desarrollo de vacunas frente a *E. histolytica* (6).

b) Secreción de PGE2 por la ameba

La PGE2 es sintetizada por *E. histolytica* a través de una nueva enzima tipo COX, que se cree que juega un papel importante en el mantenimiento del ciclo celular de las amebas. Para demostrarlo se realizó un ensayo, en el cual se utilizaron altas concentraciones del inhibidor no específico de la COX (aspirina) y por otro lado, altas concentraciones de los inhibidores específicos de la COX-1/2. Los resultados mostraron cómo la síntesis de PGE2 disminuyó con el inhibidor no específico de la COX, mientras que con los otros inhibidores no.

La PGE2 secretada por las amebas vivas se encuentra en proteínas secretoras (SP) y en componentes solubles de la ameba (SAP), y estimula la producción de interleucina-8 (IL-8), la cual es una potente quimiocina proinflamatoria quimiotáctica capaz de promover la activación de neutrófilos y leucocitos en el lugar inflamado, causando un daño tisular inespecífico. PGE2 ejerce sus efectos biológicos por acoplamiento y señalización a través de los receptores de prostaglandinas EP2 y EP4. Usando agonistas y antagonistas de estos receptores se demostró que PGE2 se une exclusivamente a través de receptores EP4 en células epiteliales colónicas para estimular la producción de IL-8. Además, el silenciamiento del receptor EP4 eliminó por completo la producción de IL-8 inducida por SP y SAP (7).

c) Neutrófilos

Los neutrófilos representan más del 90% de los granulocitos circulantes y responden a una variedad de citoquinas y factores solubles durante la respuesta inflamatoria. En la amebiasis estas células son reclutadas de forma rápida y se activan en respuesta a la citoquina proinflamatoria IL-8 secretada por las células epiteliales del colon. Existen diferentes mecanismos para la regulación positiva de la secreción de IL-8:

- Algunas líneas de células epiteliales colónicas aumentan la secreción de IL-8 en respuesta a la IL-1a preformada liberada de las células lisadas por *E. histolytica*.

- Otras líneas celulares carecen de IL-1a preformada y el aumento de la secreción de IL-8 se debe a la adherencia de los trofozoitos a través de la lectina Gal/GalNAc.
- En otras ocasiones el aumento de la secreción de IL-8 se debe a la presencia de productos secretados por *E. histolytica*, por ejemplo, la PGE2 como se ha mencionado anteriormente.

En muchas infecciones parasitarias los neutrófilos son capaces de destruir a los microorganismos invasores mediante mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. El mecanismo dependiente de oxígeno consiste en la producción de un estallido oxidativo intenso, dando lugar a especies reactivas de oxígeno tóxicas para el parásito (8). Los mecanismos independientes de oxígeno son la desgranulación para la liberación de moléculas altamente citotóxicas para el parásito, y la formación de trampas extracelulares (NET: trampas extracelulares de neutrófilos). Las NET son redes de DNA decoradas con proteínas granulares y citoplasmáticas, que surgen de la liberación de los contenidos nucleares de los neutrófilos, y cuya formación está inducida por factores inmunes y microbianos. Una de las proteínas que contienen es la catelicidina (LL-37), que es un péptido antimicrobiano catiónico (9).

Pero existen mecanismos por los que *E. histolytica* es capaz de interferir con las funciones de los neutrófilos, de los cuales hablaremos más adelante.

d) Macrófagos

Los macrófagos son estimulados por el IFN- γ y por el TNF- α cuando se produce una destrucción de trofozoitos de *E. histolytica*, además, estas dos interleucinas potencian la expresión de la enzima iNOS. La producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos requiere la presencia de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), una familia de enzimas que incluye 4 isoformas: la isoforma inducible iNOS, también denominada NOS2 que no requiere Ca^{2+} para su función y se expresa en diversos tipos celulares, como macrófagos y células endoteliales; y las isoformas neuronal (nNOS o NOS1), endotelial (eNOS o NOS3) y mitocondrial (mtNOS o NOS4) dependientes de Ca^{2+} . La isoforma iNOS permite que las células liberen grandes cantidades de NO en respuesta a citocinas como el IFN- γ , el TNF- α y la IL-1. El NO es capaz de mediar algunos de los efectos citotóxicos y citostáticos del sistema inmunitario pero su actividad por sí misma es

débil. El NO reacciona con el anión superóxido (O_2^-) producido por macrófagos activados, produciendo el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), causante del daño tisular (10).

La enzima NOS utiliza como sustrato de reacción para la producción de NO a la L-arginina. La producción de $ONOO^-$ aumenta por dos mecanismos en condiciones de hipoxia e isquemia. En primer lugar, la hipoxia en el hígado conduce a una disminución de la concentración de L-arginina y oxígeno, lo que mejora la actividad de la arginasa de los macrófagos. La arginasa es la enzima principal del ciclo de la urea e hidroliza la L-arginina en urea y L-ornitina. Por lo tanto, la arginasa compite con las enzimas NOS por su sustrato común (L-arginina), lo que conduce al desacoplamiento de las isoformas de NOS. En segundo lugar, la hipoxia induce la producción del factor inducible por hipoxia, que también promueve el desacoplamiento de las isoformas de NOS. Este desacoplamiento va a producir de forma simultánea O_2^- y NO, lo que conduce a una producción adicional de $ONOO^-$ (11)

El anión $ONOO^-$ puede reaccionar de forma directa o indirecta con tejidos biológicos:

- Reacciona de forma directa con grupos tiol (-SH) causando daño oxidativo a los centros hierro-azufre y con grupos -SH de los centros activos de tirosina fosfatasas. También reacciona con lípidos y CO_2 .
- Cuando se encuentra en la forma protonada ($ONOOH$) es más inestable, y actúa de forma indirecta por su descomposición en radicales de dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). El radical $\cdot OH$ tiene un efecto muy oxidante en muchas biomoléculas, incluyendo residuos de tirosina, tioles, ADN y fosfolípidos que contienen ácidos grasos insaturados (11).

Estas reacciones del $ONOO^-$ con diferentes moléculas conducen a modulaciones de la señalización celular y a lesiones oxidativas celulares que terminan en necrosis o apoptosis. Cuando se produce necrosis tisular, la liberación del contenido de las células puede desencadenar una respuesta inflamatoria adicional que conduce a un ciclo de retroalimentación positiva de la producción de $ONOO^-$ (11).

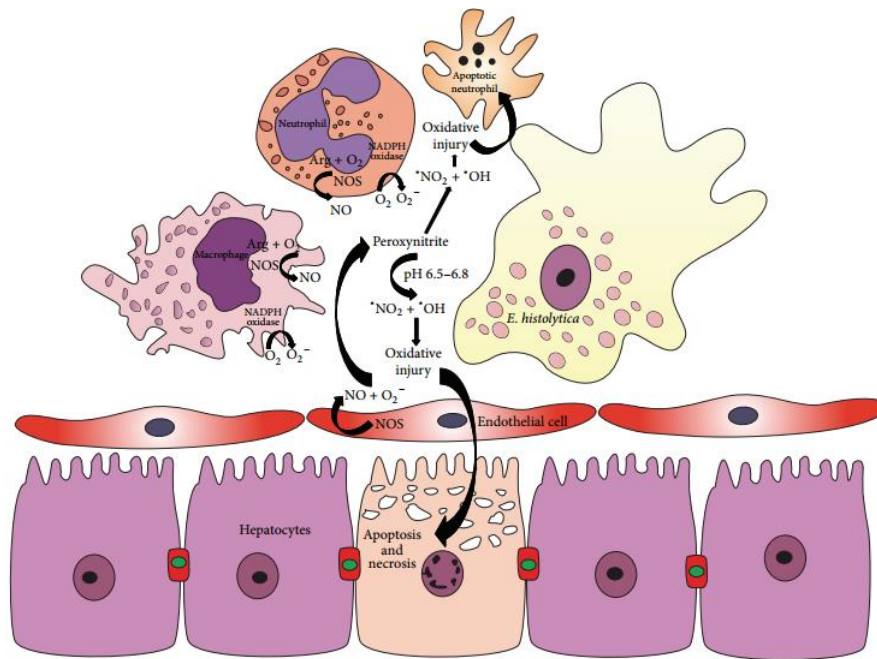


Figura 1: Modelo de generación de ONOO⁻ en amebiasis intestinal. ¹¹

e) Factor activador de la migración de macrófagos (MIF)

El factor activador de la migración de macrófagos de los mamíferos es una citocina proinflamatoria con un papel importante en las enfermedades inflamatorias. En el genoma de *E. histolytica* existe un homólogo del gen MIF (*EhMIF*) de mamíferos. *EhMIF* se expresa como una proteína de 12 kDa localizada en el citoplasma de los trofozoitos, que interactúa con el receptor MIF CD74 y se une a los macrófagos de forma similar al MIF de mamíferos, induciendo la producción de IL-6. La capacidad de *EhMIF* para modular la función de los macrófagos del huésped puede promover una respuesta inmune proinflamatoria exagerada y por tanto contribuir al daño tisular (12).

2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa está constituida por la inmunidad humoral y la celular. Ambas participan en la defensa del huésped frente a *E. histolytica*. La inmunidad humoral la constituyen las inmunoglobulinas (Igs). Las Igs intestinales son el componente mayoritario de defensa intestinal, entre ellas la IgA secretora. La IgA está producida por las células plasmáticas y se encarga de prevenir la adherencia y destrucción de la barrera mucosa por los trofozoitos (1).

Por otro lado, la inmunidad celular actúa mediante la participación de los linfocitos T, que pueden ser de dos tipos: las células T CD8+ y las células T CD4+. En la amebiasis, los linfocitos T citotóxicos CD8+ se han relacionado con la destrucción de trofozoitos *in vitro*. De forma similar, los linfocitos T CD4+ de pacientes con abscesos hepáticos amebianos también fueron capaces de eliminar trofozoitos, sin embargo, en modelos de ratones con abscesos hepáticos los linfocitos se encuentran formando parte de los infiltrados inflamatorios en las lesiones amebianas pero no tienen un papel importante en la resistencia a la amebiasis.

En estudios en ratones inoculados intestinalmente con trofozoitos de *E. histolytica* se observó que durante la infección, la población de linfocitos T CD4+ era elevada y estaba asociada a una respuesta de células T cooperadoras tipo 2 (células Th2). Esto se debe a que los linfocitos T CD4+ inhiben la producción de células T cooperadoras tipo 1 (células Th1) desviando la respuesta inmune hacia la respuesta celular Th2, que consiste en el reclutamiento de células cebadas y eosinófilos, los cuales no atacan de forma directa al parásito por lo que no tienen gran importancia en su destrucción (13). La diferencia entre los dos subtipos de células T cooperadoras se encuentra en las distintas citocinas que son capaces de activar. Las células Th1 secretan INF- γ e IL-2, mientras que las células Th2 secretan IL-4 e IL-13, además de reclutar eosinófilos y células cebadas (14).

Esta desviación hacia el perfil Th2 es un fenómeno producido gracias a la modulación de la respuesta inmune por la ameba, lo que hace que el propio sistema inmune del huésped contribuya al daño tisular (15) Además, en un estudio en ratones se observó que al bloquear la población de linfocitos T CD4+ la carga parasitaria del ratón disminuía, lo que indica que la respuesta celular Th2 puede ser beneficiosa para el parásito y perjudicial para el huésped (13).

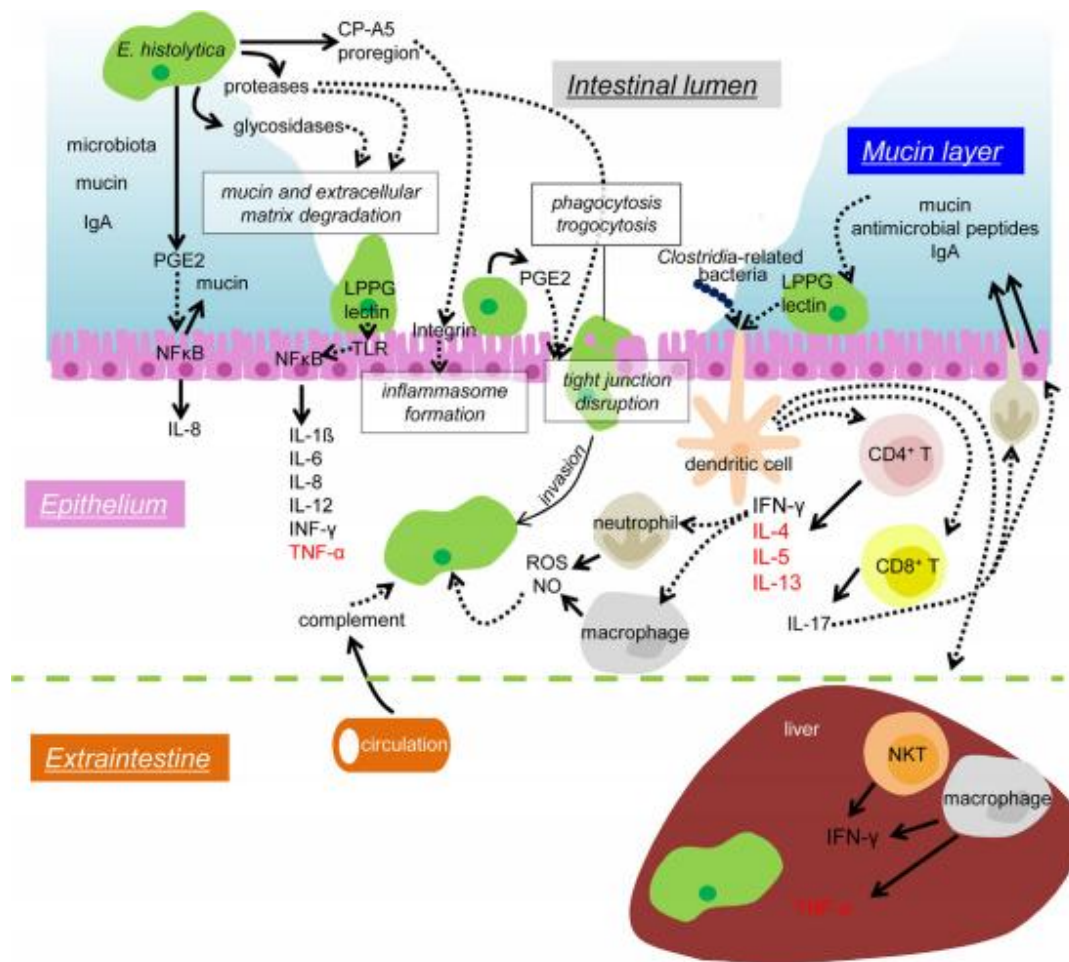


Figura 2: Mecanismos de colonización e invasión de los trofozoitos de *E. histolytica* y respuesta inmune del hospedador para controlar la infección amebiana.¹

5.3 Mecanismos de evasión inmune por *E. histolytica*

Aunque el huésped despliega la respuesta inmune frente a *E. histolytica*, el parásito ha desarrollado una serie de mecanismos para evadir estos ataques, a continuación se explican estos mecanismos.

a) Interrupción de las barreras físicas del hospedador

La interrupción de las barreras físicas del hospedador, que forman parte de la respuesta innata, se lleva a cabo por diferentes enzimas. Las glicosidasas son enzimas hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos para generar glúcidos menores. Estas enzimas son secretadas por los trofozoitos de *E. histolytica* y tienen actividades sobre diferentes azúcares: β -N-acetil-D-glucosaminidasa, α -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa,

β -L-fucosidasa y α -N-acetil-D-galactosaminidasa. Mediante estas enzimas el parásito degrada los carbohidratos de la barrera mucosa del colon para conseguir alcanzar las células epiteliales intestinales (1).

Una vez que las glucosidasas han degradado la mucina de la barrera colónica, actúan las cisteína proteasas (CPs). El 90% de la actividad proteolítica en cultivos de trofozoitos se debe a las 4 CPs más importantes: *EhCP-A1*, *EhCP-A2*, *EhCP-A5* y *EhCP-A7* (1). En concreto, la cisteína proteasa A5 de *E. histolytica* (*EhCP-A5*) es capaz de degradar las proteínas MUC2 de la mucina. La importancia de las cisteína proteasas se demostró mediante un modelo intestinal humano *ex vivo*, donde los parásitos con *EhCP-A5* silenciada no fueron capaces de penetrar en la lámina propia del colon (5). *EhCP-A5* también se une y activa a las integrinas, mejorando la formación del inflamosoma para llevar a cabo la respuesta inmunitaria.

Además, las CPs modulan la inmunidad celular mediante la activación de citocinas proinflamatorias, y la inmunidad humoral. La IgA humana anti lectina Gal/GalNAc se encarga de reducir la colonización del colon por los trofozoitos, pero la *EhCP-A5* es capaz de escindirlos, y por lo tanto, alterar la respuesta inmune. Además, las CPs también son capaces de degradar la IgG circulante, lo que podría prevenir la activación de la vía clásica del sistema del complemento. Esta destrucción de la IgG influye en la supervivencia y la propagación extraintestinal de forma beneficiosa para el parásito.

b) Inactivación del sistema del complemento

El sistema del complemento actúa para prevenir la diseminación de trofozoitos y enfermedades extraintestinales mediante la destrucción de los trofozoitos (5). Las CPs se encargan de escindir e inactivar las fracciones C5a y C3a de este sistema, por lo que se inhibe su actividad proinflamatoria, disminuye la liberación de histamina por los mastocitos, disminuye la liberación de enzimas lisosómicas de los leucocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias de macrófagos (2).

Además, la lectina Gal/GalNAc de las amebas presenta una secuencia similar y reactividad antigénica cruzada con la proteína CD59. Esta proteína inhibe la formación del complejo C5b-9 y por tanto inhibe la formación del complejo de ataque a membrana (MAC), el cual se encarga de la lisis de los parásitos (5).

Todo esto hace que las amebas en la sangre no sean detectadas y por tanto se reduzca la inflamación.

c) Interferencia con las funciones de los neutrófilos

Los neutrófilos para intentar destruir al parásito producen un estallido oxidativo intenso, y sus gránulos secretores contienen moléculas altamente citotóxicas, pero existen varios mecanismos por los cuales *E. histolytica* interfiere con las funciones de los neutrófilos (8):

- La ameba puede interrumpir las actividades de la NADPH oxidasa e inhibir el estallido respiratorio para evitar el estrés oxidativo.
- La superóxido dismutasa que contiene hierro y la NADPH flavina oxidoreductasa son enzimas de la ameba, que se encargan de desintoxicar al parásito de los radicales reactivos de oxígeno formando H_2O_2 .
- La peroxirredoxina, que es una proteína de superficie rica en cisteína de 29 kDa, tiene actividad antioxidante, por lo que protege a la ameba de las propiedades reactivas del oxígeno del neutrófilo (4).

Los neutrófilos pueden no resistir a *E. histolytica*. En estudios realizados “in vitro”, los neutrófilos son eliminados incluso por cepas de baja virulencia en una proporción 400:1 (neutrófilos:amebas), aunque muchos de estos parásitos no sobreviven en el proceso, sin embargo, las cepas de alta virulencia en una proporción 3.000:1 (neutrófilos:amebas) salen victoriosas. Además de no resistir a *E. histolytica*, pueden contribuir al daño tisular del huésped a través de su destrucción y liberación de gránulos citotóxicos, produciendo apoptosis de hepatocitos cerca del infiltrado inflamatorio o en áreas del parénquima hepático distantes de amebas (8).

d) Inhibición del estallido respiratorio de los macrófagos

Los macrófagos presentan la inmunidad suprimida durante la infección amebiana debido a la modulación inmune inducida por *E. histolytica*. Esta modulación consiste en la inhibición del estallido respiratorio por los trofozoitos, y por tanto la inhibición de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS: H_2O_2 , O_2^- y OH^-). La inhibición del estallido respiratorio en los macrófagos se produce mediante los mismos mecanismos mencionados en los neutrófilos.

Por otro lado, los trofozoitos también inhiben la producción de NO. Esto se debe a que cuando existe una infección por *E. histolytica* la enzima arginasa amebiana compite con la NOS por el sustrato L-arginina, convirtiéndola en L-ornitina y produciendo un

desacoplamiento de las isoformas de NOS, además de producir un agotamiento en el suministro de L-arginina para la producción de NO por los macrófagos (4).

e) Participación de PGE2 en la evasión del sistema inmune

La PGE2 es una molécula secretada por las amebas que desencadena una disminución en la producción de TNF- α y MIF por los macrófagos, junto con una disminución de la expresión de moléculas del MHC de clase II (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II). Además, la presencia de PGE2 va a inducir una respuesta inmune celular del tipo Th2 con producción de IL-4 e IL-10, lo que disminuye la capacidad citolítica de los macrófagos y aumenta la producción de IgG1, IgA e IgM. El papel de estos anticuerpos *in vivo* no es del todo claro, incluso podrían contribuir a la producción de fenómenos de inmunosupresión, hipersensibilidad y daño tisular por depósito de complejos inmunes (16).

La inhibición de la producción de PGE2 podría recuperar parcialmente la expresión de MHC II y la expresión de TNF- α en el macrófago inactivado, pero no se recuperaría la expresión de la enzima iNOS ni la actividad amebicida del parásito (1).

f) Muerte celular inducida por *E. histolytica*

Existen diferentes mecanismos por los cuales *E. histolytica* es capaz de inducir la muerte celular en el huésped:

f.1) Muerte celular apoptótica

La apoptosis inducida por *E. histolytica* es un proceso inmunológicamente silencioso, debido a que tras la muerte celular las amebas ingieren las células muertas, evitando así que se desencadenen respuestas proinflamatorias. Suele ser un proceso gradual estimulado por la adherencia de los trofozoitos a las células huésped, lo que conlleva un aumento de los niveles de calcio intracelular, producción de ROS, pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación del DNA, exposición de fosfatidilserina en la superficie celular y degradación de proteínas mediante la activación de la caspasa 3 (1).

La caspasa 3 es una enzima proteasa que cataliza la escisión específica de muchas proteínas importantes para el funcionamiento celular, y participa en el proceso de condensación de la cromatina apoptótica y fragmentación del ADN, por lo que es importante en los procesos asociados con la destrucción de las células y la formación de

cuerpos apoptóticos (17). Estudios demostraron que las caspasas 8 y 9 no participan en este mecanismo de muerte celular apoptótica inducido por *E. histolytica* (4).

Para demostrar la importancia de la apoptosis en el proceso de patogenicidad de las amebas se realizaron estudios de la vía de señalización de la leptina. La leptina además de ser una hormona que produce señales de saciedad, es capaz de regular la infección por el parásito mediante la prevención de la apoptosis celular y mediante la inducción de la respuesta inmune celular Th1. Alteraciones en el receptor de la leptina se asoció a una mayor susceptibilidad a la infección por *E. histolytica* (4).

f.2) Fagocitosis

Una vez que se ha producido la muerte celular apoptótica *E. histolytica* va a ingerir los restos celulares y los cuerpos apoptóticos. Este proceso es rápido, lo que evita que las células muertas liberen su contenido al exterior y se desencadene una respuesta proinflamatoria. Esta estrategia permite al parásito desarrollar una infección prolongada (4). La ingestión de las células muertas por las amebas se produce gracias al reconocimiento de la fosfatidilserina expresada en la superficie de las células apoptóticas. Además, se demostró que la calreticulina amebiana actúa como el receptor de superficie para las células del hospedador, por lo que es necesario en el proceso de fagocitosis (1).

f.3) Trogocitosis

La trogocitosis es un proceso similar a la fagocitosis. Requiere condiciones de temperatura específicas, reajustes de la actina amebiana, la presencia de lectina Gal/GalNAc y de *EhC2PK* (proteína quinasa que contiene el dominio C2), y la señalización de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa), y además va acompañada de un aumento del calcio intracelular (4). La diferencia entre fagocitosis y trogocitosis reside en que la fagocitosis consiste en la ingestión de células previamente destruidas, y la trogocitosis en la ingestión de trozos de células vivas. Esto se demostró mediante la incubación de trofozoitos con una combinación de células hospedadoras vivas y células T Jurkat. Las células T Jurkat son una línea celular inmortalizada obtenidas de la sangre periférica de niños con leucemia linfocítica aguda. Tras esta incubación, las células vivas fueron ingeridas por trogocitosis y las células T Jurkat por fagocitosis (1).

Este mecanismo también se produce en organismos multicelulares, pero existen diferencias. En la trogocitosis por *E. histolytica* se produce la ingestión de elementos

citoplasmáticos y orgánulos de las células diana, mientras que en la trogocitosis en organismos multicelulares únicamente se produce un intercambio de fragmentos de la membrana celular (4).

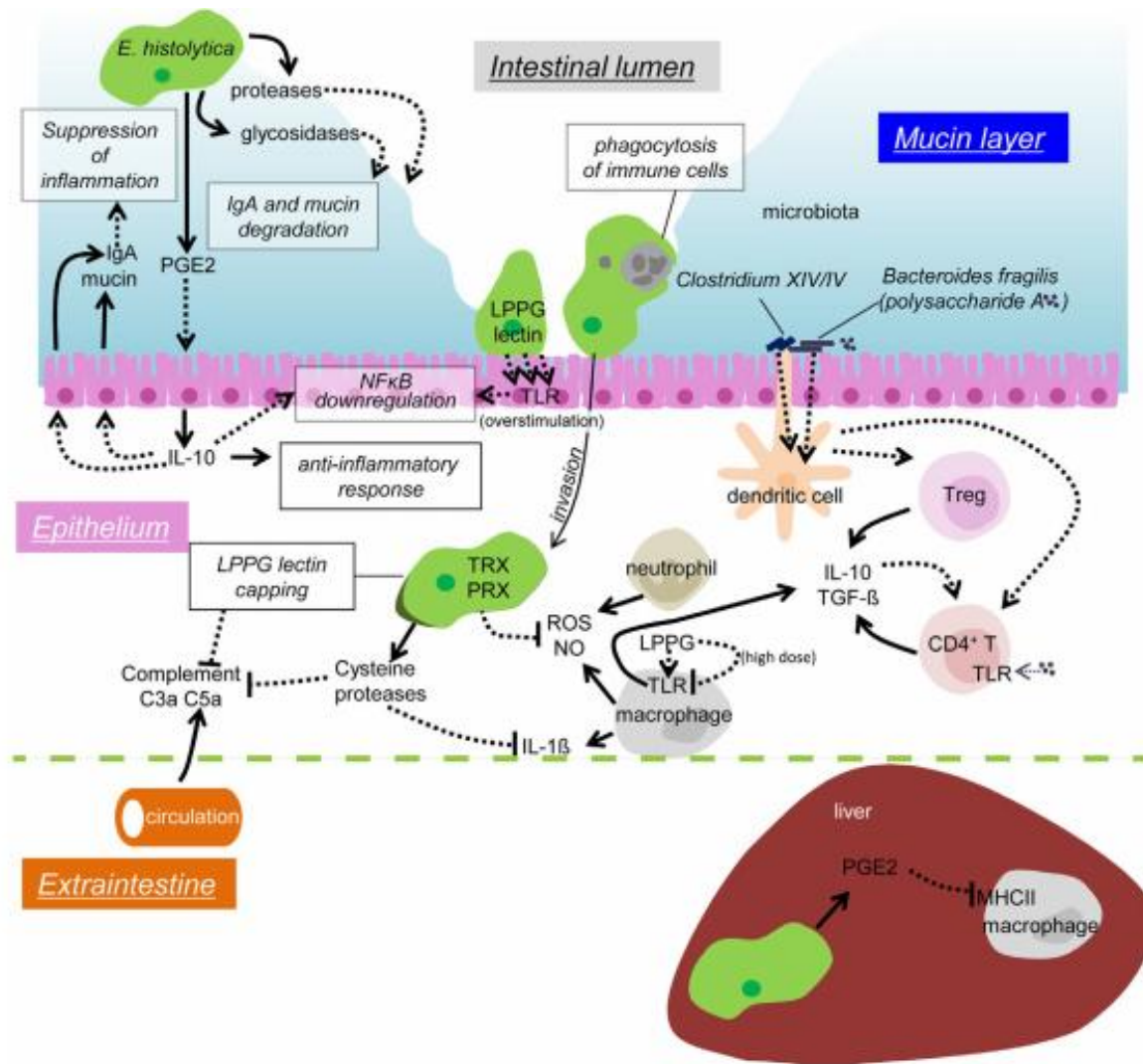


Figura 3: Posibles mecanismos de evasión inmunitaria durante la amebiasis.¹

6. CONCLUSIONES

A pesar de los mecanismos inmunitarios que presenta el hospedador cuando *E. histolytica* coloniza el intestino e invade otros tejidos, este parásito, mediante diferentes factores de virulencia, es capaz de evadir la respuesta inmunitaria y producir distintas patologías sobre el individuo. Como farmacéuticos, es de gran interés conocer cuáles son las estrategias de evasión inmune, así como las moléculas que intervienen en cada proceso para poder desarrollar una adecuada inmunoterapia que sea efectiva frente a este agente patógeno.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 12 de mayo de 2016
2. Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, et al. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation*. 1 de septiembre de 1992;90(3):1131-7
3. Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio JC. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio*. junio de 2009;13(2):100-10
4. Begum S, Quach J, Chadee K. Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 15 de diciembre de 2015
5. Moonah SN, Jiang NM, Petri WA. Host Immune Response to Intestinal Amebiasis. Knoll LJ, editor. *PLoS Pathogens*. 22 de agosto de 2013;9(8):e1003489
6. Wong-Baeza I, Alcántara-Hernández M, Mancilla-Herrera I, Ramírez-Saldívar I, Arriaga-Pizano L, Ferat-Osorio E, et al. The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2010:1-12
7. Dey I, Chadee K. Prostaglandin E2 Produced by *Entamoeba histolytica* Binds to EP4 Receptors and Stimulates Interleukin-8 Production in Human Colonic Cells. *Infection and Immunity*. 1 de noviembre de 2008;76(11):5158-63
8. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 de abril de 2000;13(2):318-31
9. Ávila EE, Salaiza N, Pulido J, Rodríguez MC, Díaz-Godínez C, Laclette JP, et al. *Entamoeba histolytica* Trophozoites and Lipopeptidophosphoglycan Trigger Human Neutrophil Extracellular Traps. Palaniyar N, editor. *PLOS ONE*. 14 de julio de 2016;11(7):e0158979
10. Figueroa-Vega N, Majano P, Larrañaga E, Miguel Bravo J, Rodríguez-Ramos R, González-Amaro R, et al. Expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en

las enfermedades tiroideas autoinmunitarias. *Endocrinología y Nutrición*. octubre de 2008;55(8):340-5

11. Pacheco-Yepe J, Jarillo-Luna RA, Gutierrez-Meza M, Abarca-Rojano E, Larsen BA, Campos-Rodriguez R. Peroxynitrite and Peroxiredoxin in the Pathogenesis of Experimental Amebic Liver Abscess. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-17

12. Moonah SN, Abhyankar MM, Haque R, Petri WA. The Macrophage Migration Inhibitory Factor Homolog of *Entamoeba histolytica* Binds to and Immunomodulates Host Macrophages. Appleton JA, editor. *Infection and Immunity*. septiembre de 2014;82(9):3523-30

13. Pertuz-Belloso SB, Flores-Romo L. Mini-revisión: Papel de la respuesta inmune celular en la resolución a la amibiasis. . p. (3):9

14. Serrano Hernández A. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*. abril de 2009;5:1-5.

15. Cruz B. CA, Laclette JP, Sarrazola S. M. Análisis de la Población de Células T Reguladoras Foxp3 en el Modelo Murino de Amibiasis Intestinal. *Nova*. 15 de junio de 2010;8(13):20

16. Sánchez-Ramírez B, Talamás-Rohana P. Importancia de las prostaglandinas en la amibiasis hepática. *Salud Pública de México [Internet]*. junio de 2002

17. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. febrero de 1999;6(2):99-104