

Amibiasis: un problema ancestral aún vigente

Bertha Jiménez Delgadillo

Ignacio Vado Solís

Juan José Arias León

La amibiasis se define como la infección producida por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*, la cual se caracteriza en su fase invasiva por la destrucción de células y tejidos de los órganos infectados. Esta parasitosis es adquirida por la ruta fecal-oral, a través del consumo de alimentos o agua contaminados con los quistes de las amibas, es decir, con la forma resistente del parásito.

Esta parasitemia tiene una distribución mundial. En 1984 se estimó la existencia de aproximadamente 500 millones de individuos infectados en el mundo y alrededor de 100,000 muertes por año, la mayoría ocasionadas por complicaciones extraintestinales como el absceso hepático amibiano (Walsh, 1986). De acuerdo a estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud, es la cuarta causa de muerte debido a infecciones por protozoarios después de la malaria, enfermedad de Chagas

y Leshmaniasis (Bulletin WHO 1997). En México, la última (actualizar) Encuesta Seroepidemiológica Nacional realizada en 1998, mediante hemaglutinación indirecta con antígeno total amibiano, detectó un 87.41% de seropositividad (de 67,668 muestras) con títulos mayores a 1:160.

CICLO DE VIDA DE *ENTAMOEB* *HISTOLYTICA*

E. histolytica pasa en su ciclo de vida por tres estadios sucesivos: el trofozoíto, el prequiste y el quiste. Las formas de los tres estadios se pueden encontrar en las heces de personas infectadas. Sin embargo, la forma predominante depende de que el individuo sea portador, tenga disentería aguda, o heces semidiarréicas. Los trofozoítos predominan en sujetos con diarrea o disentería y los quistes están asociados a heces formadas. Después de la ingestión oral de quistes maduros por el hombre, éstos se

eclosionan en la parte baja del intestino delgado (íleon) dando lugar a cuatro amébulas nucleadas, las cuales se dividen formando ocho amibas uninucleadas. Estas últimas continúan hasta el intestino grueso y aumentan en número al dividirse por fisión binaria. Estos trofozoítos pueden vivir y multiplicarse indefinidamente

dentro de las criptas de la mucosa del intestino grueso, colonizando ciertas regiones del colon y formando quistes (amibiasis luminal) constituyendo un ciclo no invasivo (Figura 1A).

(Albach y Booden, 1978). Sin embargo, el 10% de la población mundial infectada con amibas desarrolla una enfermedad invasiva, los trofozoítos

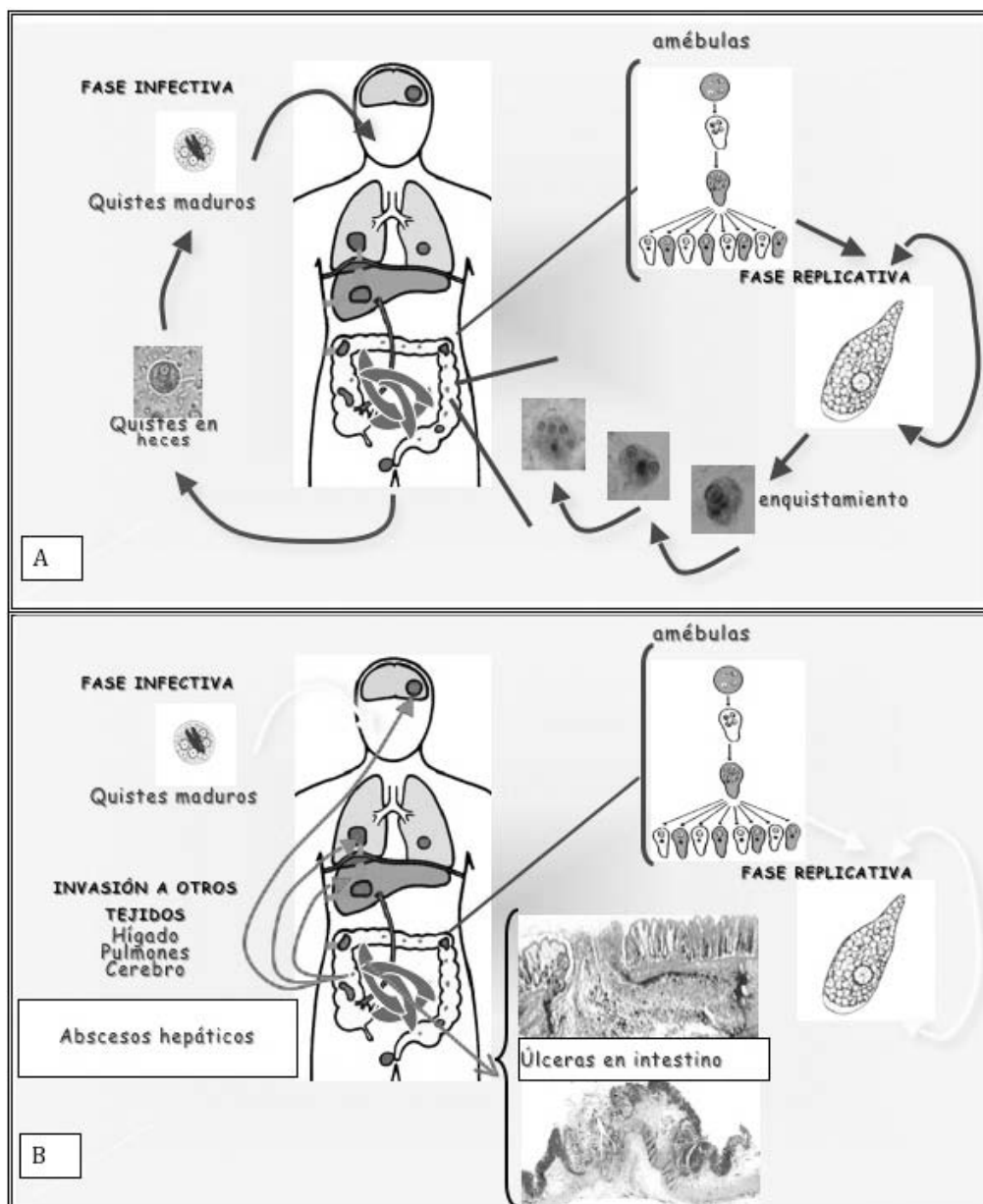


Figura 1
Ciclo de la vida de *Entamoeba histolytica*.
A. Fase no invasiva.
B. Fase invasiva.

pueden llegar a invadir el tejido al lisis las células de la mucosa intestinal y producir amibiasis tisular (Schmidt y Roberts, 1981). Cuando se produce la invasión, la lesión inicial ocurre en el epitelio del intestino grueso, donde pueden encontrarse desde úlceras pequeñas superficiales hasta necrosis confluyente de gran parte de la mucosa, en la colitis amibiana fulminante (Pérez-Tamayo and Brandt, 1975). (Figura 1B).

La amibiasis intestinal tiene diferentes formas de evolución, entre las que se encuentra la diseminación extraintestinal a través de los vasos sanguíneos. La localización más frecuente de amibiasis extraintestinal es la hepática en donde las lesiones producidas por las amibas en el hígado son llamadas abscesos: áreas bien definidas en las cuales el parénquima es reemplazado por material necrótico (Brandt and Pérez-Tamayo 1970; Prathap and Gilman 1970). La morfología microscópica raramente justifica el nombre de absceso para tales lesiones, compuestas principalmente de material necrótico granular y eosinófilo característico, con restos nucleares considerables y pocas o ninguna célula (Pérez-Tamayo, 1986). Los trofozoítos de *E. histolytica* se localizan generalmente en los bordes de las lesiones y la destrucción tisular está circunscrita a las zonas invadidas por las amibas (Brand and Pérez-Tamayo 1970; Prathap and Gilman 1970;

Griffin and Juniper 1971). Se sugiere que el efecto destructivo puede no ser exclusivamente debido a la acción del parásito, sino también deberse en parte a los mecanismos de defensa del hospedero, incluyendo la lisis de células inflamatorias (Tsutsumi, *et al.*, 1984, Tsutsumi and Martínez-Palomo, 1988).

Dado que solamente el 10% de la población mundial infectada con amibas desarrolla una enfermedad invasiva, durante algún tiempo fue controversial el considerar la existencia de una o dos especies diferentes del parásito. El primer caso implicaba que las amibas pudieran permanecer como comensales en el intestino sin producir daño aparente, y que por factores aun no bien conocidos pudieran interconvertirse a parásitos agresivos e invasivos. El segundo caso proponía la existencia de dos especies diferentes, una capaz de invadir los tejidos, y otra diferente no patógena que siempre permanecía como comensal. A este respecto, en una consulta de expertos convocada por la Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de Salud y la UNESCO llevada a cabo en 1997 en la Cd. De México y basados en datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos, se llegó a la conclusión y la aceptación de la existencia de dos especies indistinguibles morfológicamente, *E. histolytica* y *E. dispar* conocidas previamente como patógena



y no patógena respectivamente, y de ambas especies, *E. histolytica* es la única con capacidad de causar una infección invasiva.

El replanteamiento de la existencia de dos especies de amibas que infectan al hombre, y la aceptación de *E. dispar* como una especie de protozooario distinto pero estrechamente relacionado a *E. histolytica*, ha tenido implicaciones epidemiológicas profundas, ya que la mayoría de las infecciones asintomáticas encontradas en el mundo se atribuyen ahora a *E. dispar* es decir 450 millones de los individuos infectados lo están con *E. dispar* y solo 50 millones lo están con *E. histolytica* (Jackson, 1998). Dado que las dos especies son indistinguibles morfológicamente, ha sido necesario replantear la implementación de técnicas diagnósticas específicas que las distingan para el diagnóstico apropiado de individuos en riesgo y evitar quimioterapia inapropiada e innecesaria.

Basándose en las evidencias de la existencia de dos especies de amibas que parasitan al hombre, actualmente la Organización Mundial de la Salud ha establecido lineamientos de investigación con respecto a la amibiasis dentro de la que se encuentra la estimación de la distribución de *E. histolytica* y *E. dispar* en la población mundial.

<http://emedicine.medscape.com/article/996092-overview#showall>

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS*

E. histolytica lisa células y tejido conectivo del huésped durante la invasión. Aunque no se conoce completamente a todos los factores y mecanismos que participan en la invasión y destrucción de los tejidos del hospedero, se han propuesto una serie de eventos necesarios para que la amiba pueda manifestar su carácter invasivo: a) Adhesión; b) Activación de los mecanismos de daño tisular de la amiba; c) Fagocitosis.

En cada una de estas etapas se han identificado algunas proteínas asociadas con virulencia, incluyendo: 1) lectinas que median la adherencia de los trofozoítos a las células epiteliales; 2) un péptido formador de poros capaz de lisar las células epiteliales del intestino, hepatocitos y células de defensa del hospedero; 3) la secreción de cistein-proteasas que juegan un papel clave en la invasión de los tejidos y en la evasión de la respuesta inmune, y 4) la motilidad del parásito para invadir capas profundas del colon (Espinosa-Cantellano, 2000; Samuel *et al.*, 2001).

ADHESIÓN A CÉLULAS BLANCO

Las proteínas de superficie de los trofozoítos parecen tener un papel muy importante en la etapa inicial de reconocimiento de la amiba a su célula-blanco o a sustratos específicos. Esta

etapa inicial es de gran importancia, ya que es el paso limitante para que se inicien los mecanismos agresivos de las amibas.

En este primer evento se ha sugerido la participación de moléculas de superficie específicas. En trofozoítos de *E. histolytica* se han descrito y caracterizado lectinas específicas para diferentes carbohidratos (Kobiler and Mirelman, 1980; Ravdin *et al.*, 1985b; Arroyo and Orozco, 1987; Rosales-Encina *et al.*, 1987) que median los eventos de adhesión de las amibas a las células blanco.

Una de las principales lectinas que participan en el proceso de adhesión y la mejor caracterizada es la lectina específica para galactosa/N-acetil galactosamina (Ravdin *et al.*, 1985b; Petri *et al.*, 1987). Esta lectina es una glicoproteína de 170 kDa asociada a membrana, la cual está unida a una o más subunidades de 35 kDa o 31 kDa por un puente disulfuro (Petri *et al.*, 1989; Vines *et al.*, 1998). La subunidad de 170 kDa inmunodominante es la que contiene el dominio de unión a carbohidrato y una cola citoplásmica corta que podría estar involucrada en procesos de señalización de la molécula (Vines *et al.*, 1998). Esta lectina media la adherencia a la mucosa del colon humano y a las células epiteliales, y su unión con galactosa evita la citólisis mediada por contacto. El papel fisiológico de esta lectina en los

procesos de adhesión, fue confirmado recientemente con el uso de mutantes de células CHO que carecen de actividad N-acetyl glycosaminyl transferasa I, por lo que carecen de galactosa-NH₂-terminal o de N-acetil galactosamina. Estas mutantes son resistentes a la adhesión y citotoxicidad mediada por *E. histolytica* (Li *et al.*, 1989).

ACTIVACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DAÑO

The trophozoites of *E. histolytica* lyse the target cells by using lectin to bind to the target cells' membranes and using the parasite's ionophore-like protein to induce a leak of ions (ie, Na⁺, K⁺, Ca⁺) from the target cell cytoplasm. Numerous hemolysins, encoded by plasmid (ribosomal DNA [rDNA]) and cytotoxic to the intestinal mucosal cells, have been described in *E. histolytica*. An extracellular cysteine kinase causes proteolytic destruction of the tissue, producing flask-shaped ulcers (see following image). Phorbol esters and protein kinase C activators augment the cytolytic activity of the parasite.



Después del reconocimiento celular o del sustrato específico en MEC, los trofozoítos son capaces de producir y/o liberar enzimas hidrolíticas y citolíticas, incluyendo una expresión abundante de cistein-proteasas, (Reed *et al.*, 1989; Keene *et al.*, 1996) y un péptido formador de poros (amebapor) involucrado en la lisis celular (Lynch *et al.*, 1982; Rosenberg *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1982; Young and Cohn 1985, Leippe *et al.*, 1991). La interacción es seguida por un efecto citolítico (Ravdin and Guerrant 1981, 1982; Ravdin, 1986; Martínez-Palomo *et al.*, ?? 1985), o por la degradación de componentes de MEC (Keene *et al.*, 1986; Schulte *et al.*, 1987; Talamás-Rohana and Meza, 1988; Schulte and Scholze 1989).

CITÓLISIS MEDIADA POR CONTACTO

La adhesión de *E. histolytica* a la mucosa del colon del hospedero se considera esencial para la colonización del intestino grueso y para la invasión de los tejidos (Ravdin, 1986). Estudios de microscopía electrónica indican que los trofozoítos (forma móvil del parásito) de *E. histolytica* se adhieren a la mucosa del colon antes de la invasión (Takeuchi and Phillips, 1975; Chadee and Meerovitch, 1985, Ravdin *et al.*, 1985^a). Por otro lado, se tiene evidencia de que la amiba requiere de contacto directo con su célula blanco para producir un efecto

citólítico (Eaton *et al.*, 1970; Knight *et al.*, 1974, 1975; Martínez-Palomo, 1982; Ravdin, 1986; Petri and Ravdin, 1987), por lo que, la adhesión de las amibas a células blanco parece ser el primer evento en la destrucción de tejidos (Gitler *et al.*, 1984).

Las amibas de cepas virulentas, son capaces de matar virtualmente a cualquier célula mamífera con extraordinaria eficiencia *in vitro*. Aunque las cepas provenientes de aislados no patógenos también tienen esta capacidad, lo hacen con menos eficiencia que las cepas virulentas.

A pesar de que la capacidad citolítica de *E. histolytica* ha sido reconocida por décadas, es solo recientemente que se han elucidado los mecanismos moleculares implicados. Al contacto con células blanco CHO, existe una pérdida rápida (30 min de contacto) de la integridad de la membrana, una reducción en la motilidad, pérdida de gránulos citoplasmáticos y estructuras (en minutos de contacto) y la eventual desaparición del núcleo en neutrófilos (Berninghouse and Leippe, 1997).

Se ha propuesto a la familia de proteínas llamadas AMEBAPOROS, como parte de las moléculas efectoras que la amiba posee para producir su efecto citolítico, (Lynch *et al.*, 1982; Rosenberg *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1982; Young and Cohn, 1985; Leippe *et al.*, 1991). La familia de amebaporos

está constituida por tres péptidos de 77 aa caracterizados por una estructura de cuatro alfa hélices y 6 residuos de Cys. La conformación helicoidal y tres de los enlaces disulfuros de sus cisteínas, en ausencia de agentes reductores, le dan a la molécula una estructura rígida, altamente compacta y resistente al calor (100°C) (Leippe, 1992; Leippe and Muller-Eberhard, 1994). Los amebaporos son péptidos activos que pueden funcionar internamente como agentes antimicrobianos pero que también confieren actividad citolítica en el parásito (Leippe *et al.*, 1994). Las moléculas se localizan en gránulos citoplasmáticos de los trofozoítos, y se propone que sean excitados a la membrana de la célula blanco con la que se hizo contacto (Berninghause and Leippe, 1997). Esta actividad también está presente en trofozoítos de *E. dispar*, sin embargo, tiene una actividad específica de formación de poros 60% más baja que la actividad de *E. histolytica* a pesar que las secuencias de cDNA indica una identidad del 95% en la estructura primaria de los amebaporos de ambas especies (Leippe *et al.*, 1993).

Otro mecanismo recientemente propuesto es la inducción de las células epiteliales de colon a entrar a la vía de apoptosis al contacto con los trofozoítos (Ragly *et al.*, 1994). En hepatocitos, *E. histolytica* también es capaz de producir apoptosis en un

modelo animal de abscesos hepáticos amebianos (Seydel and Stanley, 1998) y es posible que los amebaporos puedan jugar un papel importante tanto en la lisis como en la apoptosis ya que cantidades sub-líticas de proteínas formadoras de poros pueden producir apoptosis en las células blanco. (Berninghause and Leippe, 1997).

Otro mecanismo no menos importante en el proceso de citólisis y degradación de componentes de MEC del hospedero, es debida a la producción y liberación de enzimas tanto citolíticas como hidrolíticas, principalmente de CISTEÍN-PROTEASAS (CP) que representan un 80% de la actividad total de proteasas del trofozoíto.

Las CP liberadas por trofozoítos de *E. histolytica* juegan un papel clave en la invasión del intestino y en la inflamación producida. Ocho genes que codifican para CPs habían sido identificados en *E. histolytica*, dos de los cuales estaban ausentes en la especie estrechamente relacionada *E. dispar* (Que and Reed, 2000). Sin embargo, recientemente se realizó un análisis de la base de datos de la secuencia del genoma de *E. histolytica* que a la fecha contiene el 99% del total de la secuencia y se encontraron 20 genes completos de CP, incluyendo los ocho ya descritos (Bruchhaus *et al.*, 2003). *E. histolytica* secreta niveles de CP de 10 a 1,000 mayores que los secretados por la especie no invasiva

E. dispar (Reed *et al.*, 1989). Aunque son veinte los genes de CP descritos, la mayoría de las actividades detectadas en lisados de *E. histolytica* se atribuyen a cuatro CP amibianas (Reed *et al.*, 1999; Bruchhaus *et al.*, 1996).

Entre los efectos que se atribuyen a las CP se encuentran: a) El efecto enterotóxico en las asas intestinales de rata y el efecto citopático en monocapas celulares, producido por lisados de trofozoítos (Feingold *et al.*, 1985; Shulte *et al.* 1987; Keene *et al.*, 1996). Este último puede ser bloqueado mediante inhibidores específicos de CP; b) Degradación de componentes de MEC incluyendo colágena, fibronectina (Fn), laminina (Lm) y elastina (Keene *et al.*, 1996); c) Capacidad invasiva del trofozoíto y participación indirecta en la exacerbación de la inflamación producida en el intestino (Zhang *et al.*, 2000); d) Dentro del parásito, digestión de bacterias y células rojas ingeridas, y activación de otras enzimas que tienen incidencia directa en su virulencia (Ankri *et al.*, 1998, 1999b).

La participación de las CP como moléculas efectoras en la patogenicidad de los trofozoítos de *E. histolytica* ha sido confirmada mediante la expresión episomal de un mensajero anti-sentido del gene *ehcp5* (Ankri *et al.*, 1998, 1999a, 1999b). La reducción casi total de la actividad de CP mediante este procedimiento disminuyó

marcadamente la virulencia de los trofozoítos medida por los siguientes efectos: a) Disminución en la capacidad de los trofozoítos en la producción de abscesos hepáticos (Ankri, 1999b) y en infecciones producidas de xenoinjertos de intestino humano (Zhang *et al.*, 2000); b) Menor inducción de inflamación del intestino (niveles reducidos de IL-1 y IL-3 y disminución del influjo de neutrófilos), con la consecuente disminución del daño en el tejido; c) Incapacidad del trofozoíto de degradar componentes de matriz extracelular y una deficiencia en su capacidad fagocitaria (Akari *et al.*, 1998).

La colagenasa es otra de las varias enzimas producidas por el parásito. A diferencia de otras proteasa descritas, existe una correlación directa entre la actividad colagenolítica producida *in vitro* por los trofozoítos, y la virulencia de la cepa, —medida en modelos animales de experimentación—, como la capacidad de producir abscesos hepáticos mas grandes y en mayor número de animales (Gadasi and Kessler, 1983; Muñoz *et al.*, 1984; Tsutsumi *et al.*, 1992).

Al interaccionar *E. histolytica* con colágena *in vitro*, los trofozoítos secretan gránulos electrón-densos (GEDs) en los que se han detectado varias actividades entre las que se encuentra la de degradación de colágena (Muñoz *et al.*, 1990).

FAGOCITOSIS

Finalmente la fagocitosis del material y de las células dañadas (restos celulares o matriz extracelular degradada) parece ser la etapa final de este complejo mecanismo.


PROTEÍNAS AMIBIANAS DE LA FAMILIA DE LAS PEROXIREDOXINAS

La clonación y caracterización de un gene que codifica para una proteína rica en Cys de 29-30 kDa, ha sido reportada por tres diferentes grupos de investigación en forma independiente (Torian *et al.*, 1990; Tachibana *et al.*, 1990, 1991; Reed *et al.*, 1992; Bruchhaus and Tannich, 1993). Estos antígenos tienen la característica de ser detectados por anticuerpos mono y/o policlonales en trofozoítos de *E. histolytica* pero no en *E. dispar*, a pesar de que ambas especies tienen el gene (Tachibana and Cheng, 2000).

Esta proteína de 29-30 kDa es altamente inmunogénica y se ha utilizado como herramienta para la detección específica de amibiasis invasiva en pacientes con absceso hepático amibiano (Flores *et al.*, 1993; Soong *et al.*, 1995).

El análisis de la secuencia nucleotídica tiene un grado substancial de similitud a una nueva familia de proteínas antioxidantes identificadas en varios organismos eucarióticos y procarióticos denominadas peroxiredoxinas (Bruchhaus *et al.*, 1997; McGonigle *et al.*, 1998).

Las peroxiredoxinas descritas en otros organismos patógenos se han vinculado a dos funciones principales: 1) Una interna constitutiva contra radicales altamente reactivos producidos por su propio metabolismo y 2) Como mecanismo de defensa contra estos radicales altamente reactivos producidos por las células inmunes del hospedero como un mecanismo de evasión de respuesta inmune. (McGonigle *et al.*, 1998).

Tanto de *E. dispar* como de *E. histolytica*, la clonación y expresión de péptidos recombinantes de este gene ha confirmado que hay actividad de peroxidoxina en ambas especies (Tachibana and Cheng, 2000; Choi *et al.*, 2003). Sin embargo, la cantidad de esta molécula por trofozoíto es significativamente mayor tanto en aislados clínicos como en cultivo axénico de *E. histolytica*, comparado con la cantidad encontrada en *E. dispar* (Choi *et al.*, 2003). Por otro lado, los trofozoítos de *E. dispar* son más susceptibles al ataque de peróxidos in vitro que *E. histolytica* (40.6% trofozoítos muertos en una hora por 5mM de H₂O₂ vs 10.6% de *E. histolytica* (Choi *et al.*, 2003). Sin embargo el papel de estas moléculas en la patogenicidad de *E. histolytica* aún no ha sido demostrado. 

REFERENCIA

Pérez-Tamayo R. 1986. Pathology of amebiasis. En: Human Parasitic Disease (Vol. II). Elsevier Science Publishers, Amsterdam pp 45-94.