

Amibiásis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*

Alfonso Olivos-García^a, Emma Saavedra^b, Mario Nequiz Avendaño^a y Ruy Pérez-Tamayo^a

Resumen

La amibiásis es un padecimiento que afecta al 10% de la población mundial, y puede tener comportamiento muy diverso, tanto en el intestino como en diversos órganos (hígado, pulmones, cerebro, piel). Se conoce su ciclo biológico, los síntomas y signos de su penetración al organismo, así como su diagnóstico y tratamiento, pero aún hay controversias sobre los mecanismos moleculares de la patogenicidad de la *E. Histolítica*, para lo cual se ha utilizado en particular el absceso hepático experimental en Hamsters (AHAH).

Durante mucho tiempo se sostuvo que la patogenicidad de *E. Histolítica* se debía a su capacidad para destruir tejidos, pero encontramos que la *E. Histolítica* virulenta, *per se* es incapaz de causar daño al hígado del hámster leucopénico. Este estudio se dedicó a estudiar los mecanismos de virulencia de la amiba mediante la comparación funcional y molecular entre *E. Histolítica* virulenta y *E. Histolítica* no virulenta.

Encontramos que la virulencia de este parásito no se puede explicar solamente por la actividad de sus moléculas citotóxicas (adhesinas, fosfolipasas y ameboporos) o proteolíticas (proteasas), y los hallazgos sugieren que cuando las amibas

virulentas arriban al hígado del hámster y se encuentran una concentración tóxica de oxígeno, éste las sensibiliza a la lisis por el complemento, el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso. Las consecuencias de estos hallazgos pueden abrir nuevas perspectivas para el diseño de terapias alternativas para el tratamiento de este padecimiento.

Palabras clave: Entamoeba histolytica, amibiásis, estrés oxidativo, óxido nítrico, patogénesis.

Amebiasis: Molecular mechanisms of *Entamoeba histolytica* pathogenicity

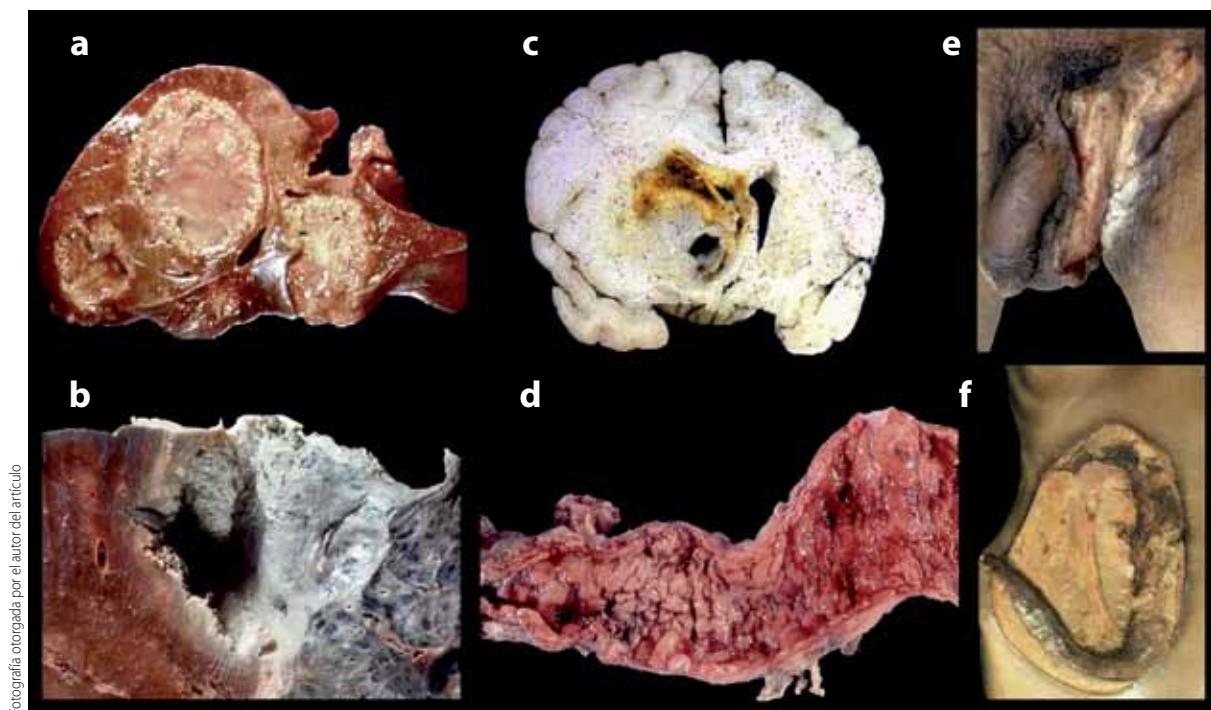
Abstract

Amoebiasis is a disease that affects 10 % of the world population, and it may have a different behavior when attacks bowels, liver, lungs, brain, etc.. Its biological cycle is well known, as well as its symptoms and signs of its penetration into those organs, its diagnosis and treatment, but it is still a controversy on the molecular mechanism of its pathogenesis; to study them it, the experimental hepatic abscess in hamsters has been employed.

For years it was considered that the pathogenicity of *E. Histolitica* was due to its capacity to destroy tissues, but we found that virulent *E. Histolitica* *per se* is unable to produce liver damage in leucopenic hamster; we therefore studied the mechanisms of virulence of the amoeba by functional and molecular comparison between virulent and non virulent *E. Histolitica*.

^aDepartamento de Medicina Experimental. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. México.

^bDepartamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. México DF. México.



Fotografía otorgada por el autor del artículo

Figura 1. Amibiasis invasiva en diferentes tejidos del ser humano. **a)** Absceso hepático amibiano (AHA) con múltiples lesiones. **b)** Ruptura de AHA e invasión a pulmón. **c)** Lesión amibiana en cerebro. **d)** Megacolon tóxico. **e)** Amibiasis inguinal. **f)** Invasión de la pared anterior del hemiabdomen derecho por un AHA. Las lesiones en piel son causadas por contigüidad al intestino o hígado infectados.

We found that the parasite virulence cannot be explained only by the activity of cytotoxic or proteolytic molecules (adhesines, phospholipases and amebopores, or proteases), and the findings suggest that when amoebas arrives to the hamster liver and find a toxic concentration of oxygen, this sensitizes them to lysis by complement, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. The consequences of those findings may open new perspectives for the design of new therapies for the treatment of this disease.

Key words: *Entamoeba histolytica, amebiasis, oxidative stress, nitric oxide, pathogenesis.*

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es el protozoario parásito responsable de la amibiasis en humanos. Esta enfermedad afecta al 10% de la población mundial, es frecuente en países subdesarrollados con clima tropical y es responsable de aproximadamente 100 mil muertes por año en el mundo.¹ La amibiasis también se presenta en urbes localizadas en grandes altitudes

como la Ciudad de México e inclusive dentro del círculo polar ártico, como en San Petersburgo, Rusia, ciudad en donde fue descubierto su agente etiológico.

Cuando el parásito invade el intestino grueso del ser humano se puede comportar como un comensal inofensivo o bien invadir la mucosa intestinal y causar destrucción tisular (**figura 1d**); dentro de estas alteraciones, la más habitual es la colitis amibiana ulcerativa. Con menor frecuencia, el parásito también puede invadir el hígado, los pulmones, el cerebro y la piel (**figura 1**).² Se ha sugerido que la microbiota intestinal, los factores de histocompatibilidad y la composición de los carbohidratos de la mucosa intestinal, los cuales tienen una gran variabilidad entre los individuos, pueden facilitar o limitar la invasividad amibiana, lo que podría explicar, al menos en parte, la diversidad de cuadros clínicos que presenta esta enfermedad.^{3,4}

A pesar de que *E. histolytica* fue descubierta hace más de 100 años, no fue sino hasta que se estableció su cultivo axénico (sin asociación con otros micro-

Fotografía otorgada por el autor del artículo

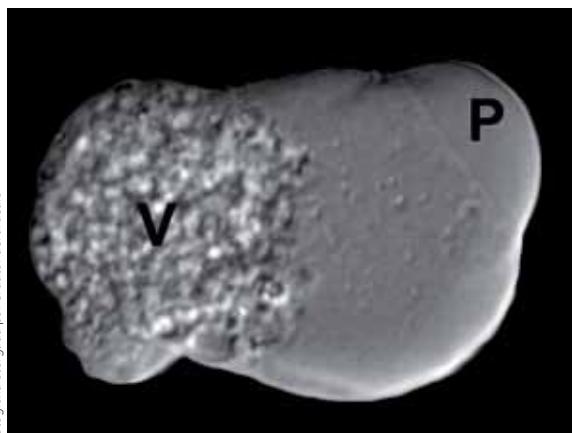


Figura 2. Trofozoíto de *E. histolytica* de la cepa HM-1:IMSS. Se observa una región con diversas vesículas (V) y una elongación llamada pseudópodo (P).

organismos) que se inició el estudio de su biología a nivel molecular.⁵ La cepa de *E. histolytica* inicialmente axenizada y actualmente más utilizada en los laboratorios de investigación de todo el mundo es la HM-1:IMSS (**figura 2**), denominada así por ser la primer amiba aislada en forma axénica del intestino de un paciente hospitalizado en el Centro Médico Nacional IMSS en 1967.

CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *E. histolytica* se inicia cuando el hombre ingiere agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, algunos de los cuales al llegar al intestino delgado inician una serie de transformaciones que los convierten en trofozoí-

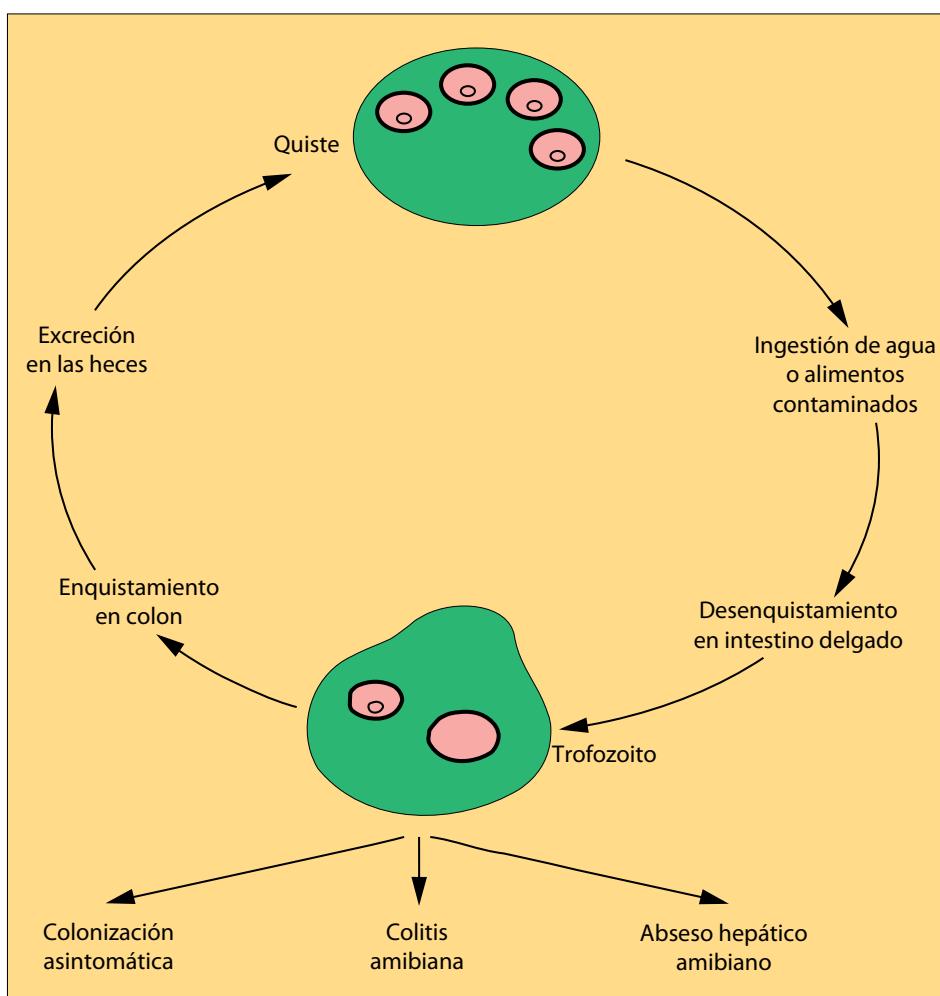


Figura 3. Ciclo biológico de *E. histolytica*. El ser humano es el hospedero definitivo; no hay intermediarios.

tos. Una vez en el intestino grueso, los trofozoítos proliferan y algunos se vuelven a enquistar. Finalmente, al salir junto con las heces, los quistes están listos para reiniciar su ciclo biológico (**figura 3**).⁶

Los mecanismos moleculares del proceso de enquistamiento y desenquistamiento del parásito se desconocen. Esto se debe principalmente a que: 1) no hay un modelo animal en el que se pueda reproducir el ciclo biológico del parásito y 2) hasta la fecha no se ha podido inducir de manera reproducible en condiciones *in vitro* el enquistamiento de los trofozoítos de *E. histolytica*. Además, se ha observado que a diferencia de varios aislados frescos, *E. histolytica* HM-1:IMSS virulenta (aquella capaz de producir lesiones en hígado de hámster) no sobrevive en cultivos con bacterias (medio de Robinson) y no expresa algunos de los genes que son indispensables para su enquistamiento.⁷ Esto sugiere que muy probablemente esta cepa de *E. histolytica* ha perdido la capacidad de enquistar debido al cultivo prolongado (más de 40 años) y a que las moléculas necesarias para su enquistamiento son diferentes de aquellas involucradas en su patogenicidad.

Por otra parte, se sabe que algunos primates no humanos en cautiverio, pueden ser infectados con quistes de *E. histolytica* y también desarrollan lesiones intestinales o hepáticas, el mono araña es el más susceptible.⁸⁻¹⁰ Mediante el uso del mono araña como modelo experimental y con la finalidad de estudiar los mecanismos moleculares de enquistamiento de *E. histolytica*, actualmente estamos tratando de establecer una nueva metodología que nos permita la recuperación de trofozoítos amibianos virulentos (provenientes de quistes infectivos) con capacidad de enquistamiento en condiciones axénicas. El conocimiento de los mecanismos moleculares de enquistamiento-desenquistamiento del parásito servirá para diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

PATOLOGÍA

Esta enfermedad se caracteriza por la destrucción tisular tanto en el intestino grueso como en otros tejidos (hígado, pulmón, cerebro y piel [**figura 1**]). A nivel microscópico estas lesiones se caracterizan por tener una zona central de necrosis con parásiti-

tos bien conservados en la periferia y rodeados por infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario y mononuclear, principalmente. En algunas ocasiones se pueden observar amibas sin infiltrado inflamatorio en contacto con células hospederas sin aparente daño celular.² Además, es probable que las lesiones en pulmón y piel sean ocasionadas por contigüidad al intestino o al hígado infectado ya que siempre se encuentran asociadas con ellos.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico tradicional se establece con el cuadro clínico, análisis de sangre e identificación del parásito en las heces. El primero se caracteriza por: 1) diarrea líquida, generalmente acompañada de moco y sangre, 2) fiebre, 3) sudoración excesiva, 4) cefalea, 5) cansancio, 6) pérdida del apetito y baja de peso, 7) náuseas y vómitos, 8) algunas ocasiones dolor en el tórax, 9) leucocitosis y 10) dolor intenso en el abdomen, sobre todo al presionarlo.¹¹ Otro estudio que ayuda al diagnóstico de la amibiasis intestinal es la colonoscopía la cual permite la observación directa de las ulceraciones intestinales causadas por la infección. Además, el estudio radiológico e identificación del parásito o sus moléculas en el aspirado del absceso hepático o pulmonar también están indicados para las infecciones amibianas en estos órganos. Por otro lado, el análisis de la sangre mediante las técnicas de ELISA o *western blot* buscan antígenos del parásito o anticuerpos contra éste en los casos de amibiasis intestinal o extraintestinal.

Existen diversas especies de amibas que pueden vivir en el intestino del ser humano como son *E. histolytica*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli*, *Iodamoeba bütschlii*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana* y *Entamoeba dispar*. De todas ellas, sólo *E. histolytica* es capaz de causar lesiones en el intestino y en algunos otros órganos (**figura 1**). Debido a la gran experiencia que debe tener el laboratorista clínico para identificar entre todas a *E. histolytica*, y a la gran similitud morfológica que existe entre *E. histolytica* y *E. dispar*, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la única que evita confusión en la identificación de *E. Histolytica*.¹² Desafortunadamente, esta tecnología es costosa y actualmente no es accesible para los lugares en



Pedro J. Pérez

El diagnóstico tradicional se establece con el cuadro clínico, análisis de sangre e identificación del parásito en las heces. El primero se caracteriza por: 1) diarrea líquida, generalmente acompañada de moco y sangre, 2) fiebre, 3) sudoración excesiva, 4) cefalea, 5) cansancio, 6) pérdida del apetito y baja de peso, 7) náuseas y vómitos, 8) algunas ocasiones dolor en el tórax, 9) leucocitosis y 10) dolor intenso en el abdomen, sobre todo al presionarlo.

donde la enfermedad se presenta con mayor frecuencia. Por lo anterior, es necesario el desarrollo de pruebas diagnósticas de bajo costo que identifiquen al parásito de manera específica; para esto, la disponibilidad actual de la secuencia del genoma completo de *E. histolytica* será de gran ayuda.

TRATAMIENTO

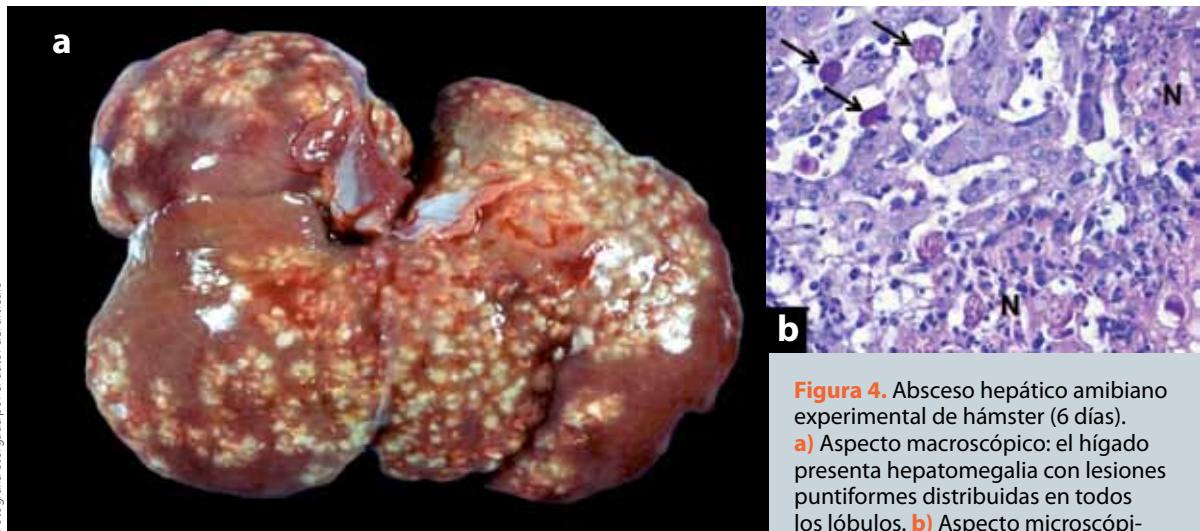
La cloroquina, emetina y metronidazol, que muestran buena absorción intestinal, están indicados para la amibiásis intestinal o extraintestinal, y el metronidazol es el fármaco de elección debido a sus mínimos efectos secundarios. Existen otros fármacos en el mercado para el tratamiento de la amibiásis, sin embargo los descritos anteriormente son los más utilizados en la práctica médica.

Mecanismo de acción del metronidazol

Este fármaco tiene buena biodisponibilidad y excelente distribución en todos los tejidos ya que penetra fácilmente en las membranas celulares (difusión pasiva) con la conveniencia de que se convierte en su forma activa solamente en microambientes con potencial reducción-oxidación (redox) negativo (baja tensión de oxígeno), como el que aloja a microorganismos anaerobios o microanaerobios.¹³

En el parásito, el grupo nitro reactivo del metronidazol se reduce de manera monovalente principalmente por: 1) la ferredoxina reducida, originada por la descarboxilación del piruvato catalizada por

Fotografía otorgada por el autor del artículo



Fotografía otorgada por el autor del artículo

la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) en la glucólisis,¹⁴ 2) la oxidasa EhNO1/2¹⁵ y 3) la tiorredoxina reductasa.¹⁶ Esta reducción origina el intermediario radical libre nitro que posteriormente es reducido a nitrosoimidazol. Este último compuesto es capaz de formar aductos con el ácido desoxirribonucleico (DNA) y los grupos sulfhidrilo de aminoácidos y proteínas, lo cual causa citotoxicidad.

La inocuidad del metronidazol en los tejidos del hospedero se debe a que el oxígeno lo mantiene en su forma inactiva (oxidada) además de que éste carece de las enzimas responsables de su reducción. Sin embargo, debido a que el intestino grueso mantiene un ambiente microanaeróbico ($O_2 = 0.1$ a 2.3%) en el que prevalece el crecimiento de organismos microaerófilos esenciales para la digestión, el fármaco puede mermar la microbiota y generar un desequilibrio en la función intestinal; motivo por el cual es necesario evitar su prescripción indiscriminada.

Por otro lado, una de las razones por la que la amibiásis 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. Sin embargo, debe reconocerse que desde la aparición del metronidazol, hace 45 años,¹⁷ las muertes causadas por *E. histolytica* han disminuido en forma considerable.

Figura 4. Absceso hepático amibiano experimental de hámster (6 días). **a)** Aspecto macroscópico: el hígado presenta hepatomegalia con lesiones puntiformes distribuidas en todos los lóbulos. **b)** Aspecto microscópico: diversos trofozoitos (flechas) se encuentran fuera del área de necrosis (N) en contacto con hepatocitos sin aparente daño celular y sin células inflamatorias. Tinción PAS.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA PATOGENICIDAD DE *E. HISTOLYTICA*

Debido a la falta de un modelo animal que reproduzca tanto el ciclo biológico completo del parásito como las manifestaciones clínicas de la enfermedad, el absceso hepático amibiano experimental en hamsters (AHAH) es el modelo más utilizado para estudiar los mecanismos moleculares de patogenicidad de *E. histolytica* (**figura 4**). Este modelo consiste en la inyección intraportal o intrahepática de trofozoitos axénicos virulentos de la cepa HM-1:IMSS. Las lesiones tisulares son evidentes a las 24 h (**figura 5d**) y se extienden a casi todo el hígado en aproximadamente 7 días (**figura 4**), lo que ocasiona la muerte del animal.

A nivel microscópico, a las 6 h las amibas se rodean de abundantes leucocitos polimorfonucleares (PMN) (**figura 5c**) los cuales, después de 48 h, de forma paulatina son sustituidos por infiltrado leucocitario de tipo mononuclear y linfocitario.^{18,19} Además, al igual de lo que sucede en otros modelos experimentales de enfermedad, es probable que la

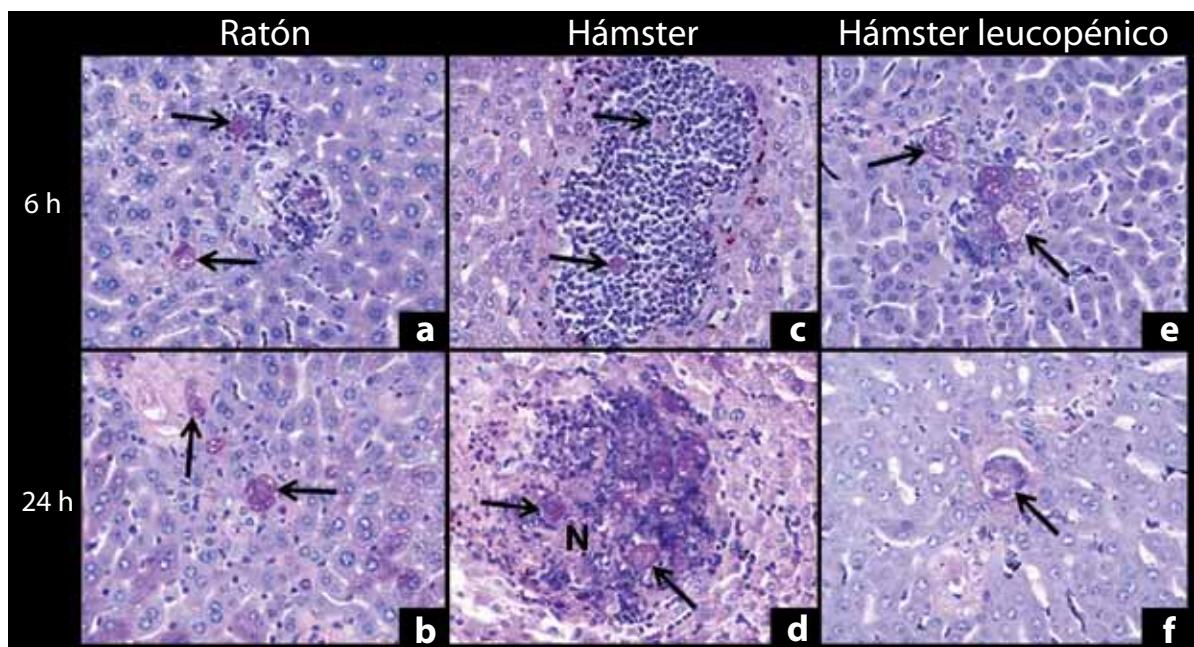


Figura 5. Aspecto microscópico de la infección hepática amibiana experimental en ratón y hámster. En el hámster normal (**c**), la amiba induce una fuerte reacción inflamatoria que da lugar a necrosis (N) en 24h (**d**). Contrario a esto, tanto en el ratón (**a, b**) como en el hámster leucopénico (**e, f**) se observa un aspecto similar; amibas bien conservadas en ausencia de infiltrado inflamatorio y sin destrucción tisular; en estas condiciones, las amibas desaparecen después de 24 h.

anexina 1 o las lipoxinas generadas por las ciclooxygenas^{20,21} desempeñen un papel importante en la inhibición de la migración de los PMN.

Durante el desarrollo del AHAH se observa una destrucción masiva de las amibas (~70%), solamente durante las etapas iniciales (12 h),²² ocasionada muy probablemente por el oxígeno tisular y por algunas moléculas generadas por el sistema inmune innato (complemento, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y óxido nítrico [NO]). Es posible que, igual a lo que sucede en condiciones *in vitro*, las amibas sobrevivientes induzcan degranulación e inhiban el estallido oxidativo de los PMN.²³ Después de este periodo y a pesar de una buena respuesta humoral, la carga parasitaria aumenta de forma continua y termina con la muerte del animal.

Durante mucho tiempo se sostuvo que la patogenicidad del parásito se debía a su capacidad de destruir tejidos (histolítica) ya que numerosos experimentos *in vitro* demostraron que *E. histolytica* produce moléculas que causan citólisis (fosfolipasas y ameboporos) o apoptosis (adhesinas)

en células blanco, así como proteólisis de algunos componentes de la matriz extracelular (proteasas de cisteína).²⁴

Sin embargo, contrario a esta propuesta, nuestro grupo ha demostrado que *E. histolytica* virulenta *per se* es incapaz de causar daño al hígado del hámster leucopénico (**figuras 5e y 5f**) y que la inflamación, además de ser la principal responsable de la destrucción tisular, es una condición necesaria para la supervivencia del parásito. Con la isquemia que produce la inflamación, se crea un microambiente favorable para la supervivencia del parásito al reducirse el acceso de moléculas potencialmente tóxicas como son el complemento, los anticuerpos y el oxígeno junto con sus especies reactivas (ROS) tales como superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.²⁵

Por otra parte, se sabe que en condiciones *in vitro* los macrófagos ejercen su actividad amebicida mediante la generación de NO y ROS, generados por la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) y la nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido (NA-

DPH) oxidasa, respectivamente.²⁶ Sin embargo, ante la pregunta de ¿por qué esta actividad amebicida no sucede durante el desarrollo del AHAH?, la hipótesis resultante fue que los macrófagos que están en vecindad con las amibas podrían reducir su producción de ROS por estar en condiciones hipóxicas, además de que no expresan la iNOS (Olivos-García et al., artículo en preparación).

Entonces surge la pregunta de por qué estos macrófagos no expresan la iNOS. La respuesta se vuelve más complicada y puede tener diferentes explicaciones:

- La sobreproducción de IL-10 en macrófagos y linfocitos, ambos estimulados por la prostaglandina E2 (PGE2), que puede ser producida por el parásito²⁷ o de forma local por células del hospedero²⁸ y que se ha demostrado que inhibe la expresión de la iNOS.
- Inhibición por moléculas del parásito diferentes de PGE2 como el factor inhibidor de la locomoción de monocitos (MLIF).²⁹
- Inhibición por 15D-PGJ2 que es producto de la prostaglandina PGD2, el cual a su vez inhibe la transducción de señales a través de las MAP cinasas, NF-κB o IkB.²⁸
- Estimulación de la producción de IL-10 (que inhibe iNOS) en macrófagos por la anexina 1.³⁰
- La activación de los genes regulados por la hipoxia, que tiene como consecuencia la inhibición de la expresión de iNOS.³¹
- La combinación de todas las anteriores.

Debido a que el NO producido por la iNOS es una de las principales moléculas amebicidas producidas por el hospedero, este grupo de investigación actualmente estudia los mecanismos moleculares de la falta de expresión de la iNOS en los macrófagos que rodean a la amiba durante la formación del absceso en el hígado del hámster; es posible que al igual de lo que sucede con algunos tumores y en otras infecciones parasitarias, la inducción local de iNOS durante la amibirosis invasiva constituya una nueva alternativa terapéutica.

Como ya se ha mencionado, en el AHAH se observan algunas amibas en contacto con hepato-

citós sin aparente daño tisular y sin células inflamatorias (**figura 4b**). Además, el NO, que es un potente amebicida y relajante vascular, se encuentra elevado en circulación.²⁹

A pesar de que la amiba es considerada como una de las células con mayor capacidad citotóxica en la naturaleza, hasta la fecha no hay explicación para su falta de citotoxicidad en estas condiciones. Además, la ausencia de infiltrado inflamatorio se ha atribuido en parte a la liberación del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (MLIF) por parte de la amiba.³²

Resulta interesante que la amiba se encuentre bien conservada fuera del área de necrosis, en donde hipotéticamente estaría en contacto con concentraciones tóxicas de oxígeno y NO. Nosotros sugerimos que esto puede deberse a un problema vascular, ya que resultados previos de nuestro grupo indican que en el AHAH las células de la pared sinusoidal producen grandes cantidades de superóxido.

Se sabe que este radical, al neutralizar al NO genera vasoconstricción e hipertensión local, lo cual disminuye el riego sanguíneo.³³ Esto podría favorecer la sobrevivencia y diseminación de la amiba al disminuir las concentraciones tóxicas de oxígeno, NO y nitritos (que generan NO).

Actualmente, estamos diseñando estrategias para inhibir la producción de superóxido en el espacio sinusoidal hepático durante el AHAH, lo cual podría tener repercusiones terapéuticas.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA VIRULENCIA DE *E. HISTOLYTICA*

Uno de los factores del parásito que puede explicar la diversidad de los cuadros clínicos que se observan en la amibirosis humana es la variabilidad del grado de virulencia que presentan las diferentes cepas de *E. histolytica* (avirulenta, intermedia o altamente virulenta).³⁴

Debido a que la virulencia de este parásito no ha podido explicarse solamente por la actividad de sus moléculas citotóxicas (adhesinas, fosfolipasas y ameboporos) o proteolíticas (proteasas de cisteína),²⁴ este grupo se ha enfocado en estudiar los mecanismos de virulencia de *E. histolytica* mediante la comparación funcional y molecular entre *E. histolytica*

A pesar de que *E. histolytica* fue descubierta hace más de 100 años, la amibiasis continúa siendo un grave problema de salud para los países pobres. La solución al problema consiste en elevar el nivel educativo y dotar de agua limpia y servicios sanitarios a la población. Sin embargo, como esto no es factible en el corto y mediano plazo, una alternativa para erradicar a esta enfermedad es producir conocimiento sobre los mecanismos moleculares del ciclo biológico del parásito y los de la patogenicidad de la enfermedad.

virulenta (por causar lesiones en hígado de hámster) y *E. histolytica* no virulenta (por la incapacidad de causar lesiones en hígado de hámster debido al cultivo prolongado).

Durante este análisis hemos encontrado que a pesar de que ambas amibas son de la cepa HM-1:IMSS y realizan de igual forma algunas funciones *in vitro* asociadas con su virulencia (eritrofagocitosis, resistencia a complemento, actividad citotóxica y proteolítica),³⁵ sólo *E. histolytica* no virulenta es eliminada del hígado de hámster en menos de 24 h después de la inoculación. Además, el fármaco antiinflamatorio metilprednisolona (el cual tiene un efecto negativo en la generación de ROS y NO) inhibe dicha eliminación.¹⁹

Lo anterior sugiere que el sistema inmune adaptativo no está involucrado en este fenómeno y que igual a lo que sucede en condiciones *in vitro*, el oxígeno y moléculas derivadas del sistema inmune innato como complemento, ácido hipocloroso, ROS y NO pueden ser los responsables de la eliminación temprana de las amibas no virulentas. Además, mediante experimentos *in vitro* sabemos que de todas las moléculas mencionadas, solamente la resistencia a oxígeno, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso se correlacionan con la virulencia del parásito.^{35,36}

Está documentado que la amiba es un organismo microaerófilo que no tolera más del 5% de oxígeno; resulta interesante que la exposición subletal a este gas incremente su susceptibilidad a complemento, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso (Olivos-García et al., artículo en preparación).



Zsuzsanna Kilián

Por lo ya mencionado, se puede sugerir que cuando las amibas virulentas arriban al hígado del hámster a través de la circulación, se encuentran con una concentración tóxica de oxígeno (6-13%) que las sensibiliza (~70% de la población) a la lisis por el complemento, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso. Posteriormente, las amibas que sobreviven continúan su crecimiento debido a:

1. La sobreexpresión de moléculas antioxidantes³⁷ y de reparación de los centros de hierro-azufre (Fe-S) de sus proteínas.³⁵
2. Que los macrófagos del hígado tienen inhibida su capacidad para producir ROS.³⁸
3. Que los PMN y macrófagos, que rodean a las amibas durante el desarrollo del AHAH, no expresan la enzima iNOS (responsable de la síntesis de NO).

Además, está documentado que la expresión de adhesinas, ameboporos y proteasas de cisteína, los cuales participan en la evasión inmune y metabolismo, son esenciales para la supervivencia del parásito.³⁹ Por otra parte, debido a que se ha observado un incremento gradual de nitritos en plasma durante el desarrollo del AHAH,²⁹ la capacidad de *E. histolytica* de producir NO, mediante la reducción de nitritos (Olivos-García et al, artículo en preparación) podría favorecer aún más su sobrevida al utilizarlo como antioxidante o como parte de su poderoso repertorio citotóxico.

RESISTENCIA NATURAL A LA AMIBIASIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL

Como ya se ha mencionado, sólo el hombre y algunos primates son susceptibles a la infección por *E. histolytica*, ya sea intestinal o extra-intestinal. Por otro lado, se sabe que la respuesta inmune a un determinado estímulo presenta variaciones intra e interespecie.

A nivel experimental, el hámster y el gerbo son animales susceptibles a la infección amibiana hepática, mientras que la rata y el ratón son resistentes.⁴⁰ Debido a que estos últimos eliminan al parásito en diferentes tiempos (~6 y 24 h, respectivamente) se puede inferir que sus mecanismos de resistencia son distintos.

Nuestro grupo ha demostrado que a diferencia del hámster, gerbo y ratón, en la rata el complemento es responsable de la eliminación temprana del parásito. En cambio en la rata y en el ratón, contrario a lo que sucede en el hígado de hámster, la falta de infiltrado inflamatorio (quimiotaxis de PMN) favorece la muerte del parásito (**figuras 5a y 5b**), probablemente por la alta concentración de oxígeno.

Además, es posible que la activación temprana de PMN y macrófagos a través de la activación de la nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa y expresión de la iNOS, participen en la eliminación de *E. histolytica*. El conocimiento detallado de los mecanismos por los cuales estos modelos animales impiden de manera eficiente la infección amibiana puede contribuir al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

PERSPECTIVAS

Por todo lo anterior, resulta claro que el diseño de las terapias alternativas para tratar la amibiasis invasiva deberá considerar la inactivación de las moléculas del parásito que le permiten sobrevivir en un microambiente hipóxico y aquellas que estimulan localmente a los leucocitos para producir peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y NO, ya que son las principales moléculas del hospedero con actividad amebicida.

En cambio, las estrategias profilácticas, como las vacunas, podrían incluir aquellas dirigidas contra

moléculas del parásito que le son indispensables para inducir la quimiotaxis de PMN y para adaptarse al microambiente oxigenado (adhesión, evasión de complemento y oxígeno e inhibición y neutralización de ROS).

Finalmente, a pesar de que *E. histolytica* fue descubierta hace más de 100 años, la amibiasis continúa siendo un grave problema de salud para los países pobres. Sabemos que la solución a este problema consiste en elevar el nivel educativo y dotar de agua limpia y servicios sanitarios a toda la población.

Sin embargo, como esto no es factible en el corto y mediano plazo, una alternativa racional para erradicar a esta enfermedad es producir conocimiento sobre los mecanismos moleculares del ciclo biológico del parásito y los de la patogenicidad de la enfermedad. De esta manera se generarán nuevas estrategias terapéuticas que bien podrían incluir una vacuna eficiente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (IN 204310) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (59175). También agradecemos a Marco E. Gudiño por la digitalización de las imágenes. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Amoebiasis. Weekly Epidemiologic Record. 1997;72:97-100.
2. Brandt H, Pérez-Tamayo R. Pathology of human amebiasis. HumPathol. 1970;1:351-85.
3. Variyam EP. Luminal host-defense mechanisms against invasive amebiasis. Trends Parasitol. 2007;23(3):108-11.
4. Arellano J, Isibasi A, Miranda R, et al. HLA antigens associated to amoebic abscess of the liver in Mexican mestizos. Parasite Immunol. 1987;9(6):757-60.
5. Diamond LS, Harlow, DR, Cunnick, CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72:431-32.
6. Martínez-Palomo A. Amibiasis. México: Editorial Médica Panamericana; 1989. 204 pp.
7. Ehrenkaufer GM, Haque R, Hackney JA, et al. Eichinger DJ, Singh U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. Cell Microbiol. 2007;9(6):1426-44.

8. Amyx HL, Asher DM, Nash TE, et al. Hepatic amebiasis in spider monkeys. *Am J Trop Med Hyg*. 1978;27(5):888-91.
9. Márquez-Monter H, Fuentes-Orozco R, Correa-Lemus I, et al. Invasive amebiasis in a spider monkey (*Ateles geoffroyi*). Case report and a short review of the literature of amebiasis in non-human primates. *Arch Invest Med (Mex)*. 1991;22(1):75-8.
10. Verweij JJ, Vermeer J, Brienen EA, et al. *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. *Parasitol Res*. 2003; 90(2):100-3.
11. Murguía D. Diagnóstico clínico de la amebiasis. En: Romero Cabello R (Comp). Amebiasis en el siglo XXI. México: Sociedad Mexicana de Parasitología e Instituto para el Desarrollo Integral de la Salud; 2008.
12. Candil A. Diagnóstico parasitológico de la amebiasis. En: Romero Cabello R (Comp). Amebiasis en el siglo XXI. México: Sociedad Mexicana de Parasitología e Instituto para el Desarrollo Integral de la Salud; 2008.
13. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*. 2010;50 (Supl 1):S16-23.
14. Müller M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem Pharmacol*. 1986;35(1):37-41.
15. Jeelani G, Husain A, Sato D, et al. Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoebahistolytica*. *J Biol Chem*. 2010; 285(35):26889-99.
16. Leitsch D, Kolarich D, Wilson IB, et al. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biol*. 2007;5(8):e211.
17. Powell SJ, MacLeod I, Wilmot AJ, et al. Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. *Lancet*. 1966;2(7477):1329-31.
18. Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, et al. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol*. 1984;117(1):81-91.
19. Olivos A, Ramos E, Nequiz M, et al. *Entamoeba histolytica*: mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Exp Parasitol*. 2005; 110(3):309-12.
20. Perretti M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmacol*. 1998;31(4):545-52.
21. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):787-95.
22. Rigothier MC, Khun H, Tavares P, et al. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun*. 2002;70(6):3208-15.
23. Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, et al. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis*. 1981;143(1):83-93.
24. Olivos-García A, Saavedra E, Ramos-Martínez E, et al. Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*. *Infect Genet Evol*. 2009;9(6):1033-7.
25. Olivos-García A, Nequiz-Avendaño M, Tello E, Martínez R, et al. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Pathol*. 2004; 77(1):66-71.
26. Lin JY, Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. 1992;148(12):3999-4005.
27. Belley A, Chadee K. Production of prostaglandin E(2) by *Entamoeba histolytica* via a novel cyclooxygenase. *Arch Med Res*. 2000;31(4 Supl):S74-5.
28. Harris SG, Padilla J, Koumas L, et al. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*. 2002;23(3):144-50.
29. Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Shibayama M, et al. *Entamoeba histolytica*: production of nitric oxide and in situ activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. *Parasitol Res*. 2001;87(1):49-56.
30. Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(10-11):1363-9.
31. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol*. 2005; 175(10):6257-63.
32. Rico G, Leandro E, Rojas S, et al. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res*. 2003; 90(4):264-7.
33. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Villarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*. 2008;47(4):1248-56.
34. Mirelman D, Bracha R, Sargeaunt PG. *Entamoeba histolytica*: virulence enhancement of isoenzyme-stable parasites. *Exp Parasitol*. 1984;57(2):172-7.
35. Ramos-Martínez E, Olivos-García A, Saavedra E, et al. *Entamoeba histolytica*: oxygen resistance and virulence. *Int J Parasitol*. 2009;39(6):693-702.
36. Ghadirian E, Somerfield SD, Kongshavn PA. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants. *Infect Immun*. 1986;51(1):263-7.
37. Akbar MA, Chatterjee NS, Sen P, et al. Genes induced by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;133(2):187-96.
38. Denis M, Chadee K. *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun*. 1988;56(12):3126-31.
39. Mirelman D, Anbar M, Bracha R. Trophozoites of *Entamoeba histolytica* epigenetically silenced in several genes are virulence-attenuated. *Parasite*. 2008;15(3):266-74.
40. Tsutsumi V, Shibayama M. Experimental amebiasis: a selected review of some *in vivo* models. *Arch Med Res*. 2006; 37(2):210-20.