

Apoptosis en protozoarios y en la célula huésped inducida por protozoarios

Palabras clave: Apoptosis, muerte celular programada, protozoarios, célula huésped, muerte celular inducida por activación.

Key words: Apoptosis, programmed cellular death, protozoa, host cell, activation induced cell death.

Recibido: 14/I/2000
Aceptado: 21/I/2000

Ana María Fernández-Presas *

* Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia:

Ana María Fernández-Presas.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. Deleg. Álvaro Obregón, 04510 México, D.F. E-mail: presasam@yahoo.com

84

Resumen

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que ha sido descrita como un mecanismo esencial en la organogénesis normal y en el desarrollo tisular, así como en funciones celulares propias de sistemas de renovación celular en organismos adultos. La apoptosis preserva la homeostasis, manteniendo un estricto balance entre la proliferación y la muerte celular. Se considera un fenómeno biológico generalizado, encontrado tanto en organismos multicelulares como en unicelulares; los mecanismos de inducción de la apoptosis, los patrones morfológicos y los sistemas reguladores son básicamente los mismos en estos organismos. Los protozoarios, además de sufrirla, son capaces de inducir o prevenir la apoptosis en las células de sus huéspedes, dependiendo de lo que más les convenga. Es interesante que los mecanismos de regulación y la maquinaria de muerte celular se hayan conservado evolutivamente. Ésta es una revisión del fenómeno de apoptosis en protozoarios y de apoptosis inducida en células del huésped que aloja a estos parásitos.

Introducción

La apoptosis, o muerte celular programada (MCP), es un mecanismo de suicidio fisiológico que preserva la homeostasis, manteniendo un

Summary

Apoptosis is a form of programmed cellular death described as an essential mechanism in normal organogenesis and tissue development, as well as in functions of cell renovation system in adult organisms. Apoptosis preserves homeostasis, keeping a strict balance between cellular proliferation and death. It is described as a generalized biological phenomenon, found in multicellular and unicellular organisms. Induction mechanisms morphological patterns, and regulating systems of apoptosis are basically the same in these organisms. Protozoa are also affected by apoptosis, but they are able to induce or prevent it in host cells depending on their convenience. It is interesting that the regulation mechanisms and cellular death machinery have been preserved along evolution. This paper is a review on the phenomenon of apoptosis in protozoa and apoptosis induced by protozoa in host cells.

estricto balance entre la proliferación y la muerte celular. La muerte celular programada no se encuentra confinada sólo a las células de mamíferos sino que está ampliamente distribuida en la naturaleza. En organismos multicelulares la apoptosis

no está condicionada a mecanismos fisiológicos; las células de mamíferos pueden conducirse a la MCP en respuesta a daño, particularmente en el DNA.¹

La muerte celular programada está determinada genéticamente. Los genes que desempeñan un papel directo en la regulación de la muerte celular programada han sido identificados en el nematodo *Caenorhabditis elegans*,^{2,3} en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*^{4,5} y en células humanas.⁶ En *Caenorhabditis elegans*, se han detectado dos genes (ced-3 y ced-4) necesarios para la muerte celular; la pérdida de la función de uno o ambos genes da como resultado la supervivencia de las células normalmente programadas para morir.³ El gen ced-3 es homólogo a la enzima convertidora de interleucina 1 (ECI), que es una proteasa de cisteína de los mamíferos.⁶

En *Drosophila*, el gen *reaper* parece desempeñar un papel importante en la activación de la apoptosis; se ha encontrado que este gen tiene homología con los dominios génicos de Fas y TNFR I de muerte celular.⁴

Por otro lado, se ha descrito un gen que se requiere para la supervivencia de las células, denominado ced-9, y que muestra homología con el oncogene de mamíferos bcl-2.⁷

En protozoarios se ha observado apoptosis en *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcocystis muris* y *Tetrahymena*.⁸⁻¹¹ Más aún, muchas células de mamíferos pueden responder a una infección activando la apoptosis¹²⁻¹⁸ o previniéndola.¹³

Además, se ha señalado que la apoptosis participa en la inmunosupresión que se presenta en algunas enfermedades virales.¹⁶

Apoptosis en protozoarios

En protozoarios, el patrón de eventos de la muerte celular programada es similar al observado en células de metazoarios; se comparten eventos como la destrucción de la organización estructural normal del núcleo debida al colapso de la cromatina en masas

electrodensas y, en muchos casos, la ruptura del DNA nuclear en fragmentos oligonucleosomales.^{8,19-21}

Se considera que la falta de regulación en la homeostasis del calcio conlleva a importantes eventos de muerte celular en los parásitos, ya que la mayoría muere en presencia de concentraciones altas de calcio más que en ausencia de este ion.²²

a) *Leishmania amazonensis*

Estudios realizados por Moreira²⁰ han mostrado que la muerte de promastigotes de *Leishmania amazonensis* se encuentra modulada por iones de calcio, ya que en promastigotes sometidos a choque térmico se induce un incremento de tres a cuatro veces de los niveles de calcio. Se ha encontrado, en cerca de 20 % de estos parásitos, un patrón de rompimiento de DNA internucleosomal típico y características morfológicas sugerentes de muerte celular programada. Las lesiones tipo apoptóticas observadas en leishmanias son claramente de origen nuclear, y escasamente se observan en los organelos citoplásmicos, incluyendo el mitocondrion.²⁰

El hecho de que en estos estudios y otros similares informados por el grupo de Gerschenson²³ no haya evidencia de cuerpos apoptóticos completamente formados, puede deberse a la presencia de microtúbulos subpeliculares, ya que la estructura del citoesqueleto en estos parásitos es extremadamente estable y permanece intacta aun después de remover la membrana con detergente, en contraste con la estructura de los microtúbulos en las células de mamíferos que fácilmente son despolimerizados.²⁴ Se ha observado también una separación extensa entre el cuerpo y la membrana flagelar, patrón distinto al observado en promastigotes que mueren por necrosis; también encontrado durante el choque térmico. Finalmente, se ha señalado que las endonucleasas dependientes de Ca^{2+} responsables de la apoptosis actúan exclusivamente en el núcleo, lo cual concuerda con el hallazgo de que el mitocondrion se en-

cuenta intacto cuando las alteraciones nucleares ya son detectadas.²⁰

b) *Trypanosoma cruzi*

Se ha observado recientemente que en condiciones de cultivo *Trypanosoma cruzi* posee autorregulación en la limitación de su crecimiento. Los epimastigotes proliferantes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo, sufren muerte apoptótica masiva durante la diferenciación de G₀/G₁, deteniendo a los parásitos en la fase de tripomastigotes (fase estacionaria de crecimiento). La muerte puede ser prevenida o acelerada mediante la modificación de las condiciones de cultivo, lo que sugiere que los tripanosomas utilizan señales extracelulares para regular su sobrevivencia y/o diferenciación.²⁵

El factor de elongación (EF-I), constituido por dos partes funcionalmente distintas (EF-Ia y EF-Ibgd), interviene en forma importante en la biosíntesis proteica de eucariotes.²⁶ EF-Ia ha sido implicado en diversos procesos como embriogénesis, mitosis celular, proliferación, envejecimiento y transformación oncogénica,²⁷ y es posible que también participe en la regulación de la transcripción.²⁸ Usando anticuerpos anti-TcEF-Ia (gen que codifica para el factor Ia de elongación) marcados con isotiocianato de fluoresceína, se ha observado que se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, dependiendo de la fase de crecimiento del epimastigote.²⁹ La localización nuclear parece ser un marcador en los parásitos que van a morir por apoptosis.³⁰ Estas observaciones apoyan que EF-Ia tiene funciones en el control genético de la muerte celular de estos organismos patógenos y en procesos nucleares como la transcripción.²⁹

La falta de renovación del medio de cultivo en parásitos crecidos en medio monofásico puede propiciar que una porción de epimastigotes se diferencie en tripomastigotes metacíclicos infectivos, mientras que un número significativo de epimastigotes muere. Los parásitos muertos aparecen como células esféricas con un largo flagelo y mues-

tran patrones citoplásmicos y nucleares que sugieren apoptosis, como la fragmentación del DNA en escalera.³⁰

Estudios de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-EF-a han revelado que la marca se observa en el núcleo de epimastigotes viejos (13 días o más de cultivo), que aparecen como células esféricas.²⁵ Este descubrimiento es apoyado por el marcaje en el núcleo encontrado en epimastigotes tratados con geneticina que induce apoptosis.

El gen EF-Ia se encuentra en el citoplasma de *Trypanosoma cruzi*, durante la fase exponencial de crecimiento y en el núcleo de parásitos que sufren apoptosis. Esto sugiere que TcEF-Ia participa solo o en combinación con otros factores celulares para coordinar el ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*.

c) *Sarcocystis muris*

Estudios de microscopia electrónica de células quísticas de sarcosporidia han revelado cambios nucleares particulares, que incluyen disgregación de protuberancias en gránulos separados en las células quísticas y algunas estructuras que sobresalen del nucleolo, presumiblemente constituidas por gránulos que contienen RNA y que van seguidos de la muerte celular programada. También se ha observado que la forma esférica original del quiste progresivamente es sustituida por formas irregulares lobuladas, lo que sugiere que existen cambios en el citoesqueleto. En contraste, los quistes normales tienen la cromatina nuclear filiforme y reticular con escasas protuberancias constituidas por gránulos y filamentos.⁹ Este patrón de segregación nucleolar en *Sarcocystis muris* es semejante a los señalados en los nucleolos de células de metazoarios.³¹

Durante la primera fase de apoptosis, en estos protozoarios existen cambios ultraestructurales en el retículo endoplásmico rugoso, en el cual las membranas forman vacuolas. Durante la segunda fase los organelos apicales de las células quísticas,

como las rophthias, pierden su contraste, sugiriendo que su contenido proteico podría ser descargado en el citoplasma. Eventualmente, también desaparecen las membranas de las rophthias y los micronemas parecen romperse en canales constitutivos del retículo endoplásmico. En las células programadas para morir todo el citoplasma se llena de vacuolas de diferentes tamaños y configuraciones, patrón morfológico que presentan las células en apoptosis.³²

Apoptosis en células huésped inducida por protozoarios

Algunos protozoarios intracelulares inducen o previenen la apoptosis de la célula huésped que infectan, como es el caso de *Leishmania donovani* que impide la apoptosis del macrófago infectado y de esta manera garantiza su supervivencia;¹³ *Toxoplasma gondii* también evita la apoptosis de la célula huésped que parasita;³³ *Trypanosoma cruzi* produce inmunosupresión en ratones mediante la inducción de apoptosis de las células CD4⁺ del huésped infectado, evidenciada por fragmentación del DNA.^{17,34} Es evidente, entonces, que la MCP desempeña un papel importante en la relación huésped-parásito.¹⁴⁻¹⁵

a) Muerte celular programada de células T en enfermedad de Chagas experimental

Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas son similares a los descritos para padecimientos ocasionados por los virus Epstein-Barr³⁵ y de la inmunodeficiencia adquirida,^{36,37} como la supresión generalizada de la respuesta inmune a antígenos relacionados y no relacionados, y la depleción relativa de células T CD4⁺ comparada con la subpoblación de células T CD8⁺.¹⁴

Se sabe que la infección experimental murina por *Trypanosoma cruzi* conduce a trastornos del sistema inmune, como la activación linfocitaria policlonal y la producción de autoanticuerpos aso-

ciada con una carga parasitaria persistente, que producen daño tisular cardíaco del huésped.³⁸

La inmunosupresión de las células T durante la fase aguda de la infección es una característica de la enfermedad experimental y puede ser responsable de las consecuencias tardías de la infección. Se ha observado que las células esplénicas del huésped infectado por *Trypanosoma cruzi* no responden cuando son estimuladas *in vitro* con mitógenos de células T, como Con A, o por anticuerpos monoclonales anti-RCT-ab.³⁹

En el modelo experimental murino de enfermedad de Chagas se ha demostrado que se puede inducir apoptosis por la estimulación del complejo RCT:CD3 en CD4⁺ por anticuerpos RCT:anti-CD3, fenómeno que no se observa en las células CD8⁺. Las células que sobreviven a la estimulación de RCT:CD3 proliferan de manera normal o mejor y, además, expresan un mayor número de receptores para IL-2, lo que induce una respuesta celular hacia el parásito.³⁴

La apoptosis inducida por RCT:CD3 se correlaciona con una respuesta disminuida de células T, inducida por anti-CD3. Aunque las células T CD4⁺ son seleccionadas para apoptosis a través del complejo RCT:CD3,³⁶ las células T CD⁺ activadas, que expresan bajos niveles de bcl-2, pueden sufrir apoptosis espontánea durante la infección aguda. La susceptibilidad diferencial de las células T CD4⁺ para la muerte celular mediada por receptores de células T (RCT) *in vitro*, puede estar relacionada con la intensa apoptosis en células T CD4⁺ del bazo observada al décimo sexto día de infección: así como a las tasas reducidas de CD4⁺/CD4⁺ en ratones infectados.

También se ha demostrado apoptosis de células T *in vivo*, que se hace evidente por la fragmentación del DNA de las células de ratones infectados.^{17,34} Hay evidencias de que la muerte de CD4⁺ es debida a apoptosis, ya que en el sobrenadante de cultivos de CD4⁺ activadas se ha observado DNA libre y fragmentado en subunidades de tamaño de nucleosomas, típicos de apoptosis. En

microscopia electrónica las $CD4^+$ se muestran como típicas células apoptóticas, caracterizadas por la presencia de cromatina condensada, ruptura de membranas nucleares, pérdida de microvellosidades e hinchamiento del retículo endoplásmico.^{41,42}

Probablemente la muerte celular programada de $CD4^+$ que ocurre durante la fase crónica de la infección por *Trypanosoma cruzi*, sea una de las causas del daño observado en los tejidos del huésped. Es posible que fas y sus ligandos estén involucrados en la muerte celular programada, ya que se ha indicado que son necesarios para ciertas fases de la apoptosis *in vitro*.⁴³

La activación policlonal de linfocitos inducida por la infección por *Trypanosoma cruzi*,⁴⁴⁻⁴⁶ es la que probablemente interviene en los trastornos inmunológicos inducidos por el parásito *in vivo*. Debido a la naturaleza de la activación policlonal, cualquier clase de célula *T* puede ser activada en el curso de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la activación linfocítica policlonal es un patrón común en muchas infecciones por protozoarios, y también podría ser crítica en la inducción de apoptosis de células *T* a través de receptor de células *T* (RCT). Por ello, es posible que la susceptibilidad a infecciones subsecuentes, así como la baja respuesta a antígenos relacionados o no con *Trypanosoma cruzi*, resulte de la muerte de células *T* previamente activadas.

Se cree que la muerte celular programada (MCP) en células *T* maduras infectadas con *Trypanosoma cruzi*, tiene una función reguladora que limita tanto la duración como la amplitud de la respuesta inmune, y que también está relacionada con la inmunopatogénesis de ciertas enfermedades infecciosas.³⁴

Sin embargo, aún no se han podido definir los factores involucrados en la inmunorregulación de la enfermedad de Chagas experimental, ni tampoco el mecanismo de apoptosis de las células $TCD4^+$ inducido por el parásito *in vitro*, posiblemente debido a que en la fase aguda las células *T* parásito-específicas, son desplazadas por células *T* activa-

das no relacionadas y policlionalmente expandidas durante la infección por *Trypanosoma cruzi*.⁴⁵

Para que exista una respuesta inmune efectiva después de que el parásito invade las células presentadoras de antígenos (CPA) del huésped, se requiere de una apropiada interacción de las células $T CD4^+$ y el antígeno. Durante este estadio crítico se produce eliminación de las células *T*, permitiendo que el parásito pueda persistir en forma viable dentro de las CPA.³⁴

Por otro lado, se ha demostrado en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, que las células $T CD8^+$ no se conducen a muerte mediada por RCT *in vitro* y que la adición de IL-2 o IL-4 previene su muerte.³⁴ La apoptosis de $CD8^+$ no mediada por RCT puede ser consecuencia de diferentes mecanismos regulatorios que actúan en el ciclo celular o por acción de citosinas citotóxicas.⁴⁰

Se cree que la reducción de receptores en la superficie de las células $CD8^+$ es importante para prevenir la apoptosis mediada por RCT *in vitro*. No obstante, la estimulación prolongada o mutagénica de células $T CD8^+$ marinas *in vitro*, con la presencia de IL-4 como coestimulador, induce una reducción en la expresión de correceptores de $CD8^+$. Estas células con pocos correceptores o $CD8^-$ pueden ser importantes en la susceptibilidad a la infección, ya que secretan linfocinas tipo Th2 y bloquean la función de células Th1.⁴⁷

La muerte celular espontánea en ratones infectados es más frecuente en células $T CD8^+$, pero también se observa en células $T CD4^+$. IL-2 participa en la muerte celular ya que induce a las células *T* maduras a apoptosis, dirigiéndolas a la fase S del ciclo celular, donde se vuelven susceptibles a la muerte inducida por el RCT. Estos efectos contrastantes de IL-2 indican que existen dos tipos de respuestas en las células *T* infectadas.⁴⁶

Existen diversos mecanismos involucrados en la inducción de apoptosis de las células $T CD8^+$ activadas, como la privación de factores de crecimiento o supresión de respuesta de muerte celular mediada por receptores.⁴⁸

En infecciones por *Trypanosoma cruzi*, tanto las células T $CD4^+$ como las $CD8^+$ incrementan la expresión de receptores de IL-2 durante la parasitemia pico, aunque las células T $CD8^+$ se vuelven más activas que las $CD4^+$. Debido a que la relación $CD4^+/CD8^+$ disminuye después de la parasitemia pico, se piensa que las células T $CD8^+$ pueden tener un mecanismo para evadir la muerte mediada por RCT. Existe una importante reducción en la expresión del correceptor $CD8$ en la mayoría de las células T $CD8^+CD3^+$ de donadores infectados, pero sin reducción del correceptor $CD4$. Este cambio puede resultar en señalización del RCT y, por lo tanto, en protección de las células T $CD8^+$ para la apoptosis mediada por RCT *in vivo* e *in vitro*. Es de esperarse que el estímulo de antígenos parasitarios también resulte en apoptosis mediada por RCT de células T $CD4^+$ parásito-específico.³⁴

b) Muerte celular inducida por activación en enfermedad de Chagas

Además de la apoptosis, existe otro tipo de muerte celular inducida (MCI) que regula a los linfocitos T activados en la enfermedad de Chagas.

Se ha encontrado en el sobrenadante de células T activadas con antígenos mitogénicos de *Trypanosoma cruzi*, la presencia de citosinas que restringen el crecimiento intracelular del parásito en cultivo de macrófagos.⁴⁹

El interferón- γ posee un papel central en la activación microbicida de los macrófagos contra las formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* *in vitro*, y también durante la fase inicial de la infección *in vivo*.⁵⁰⁻⁵³ Dependiendo de la cepa del parásito y de la susceptibilidad del huésped en diferentes modelos, las células T $CD4^+$ pueden secretar grandes cantidades de interferón- γ o TNF- α , y poca o ninguna cantidad de IL-4. Sin embargo, la activación a través del receptor de células T (RCT) resulta en la disminución de las respuestas de células T , de tal forma que puede ayudar al parásito a escapar de la destruc-

ción completa, y persistir en el huésped. Se han descrito diversos mecanismos de supresión de células T $CD4^+$ *in vitro*.^{54,55} Por ejemplo, la infección con una forma altamente virulenta de tripomastigotes sanguíneos suprime la respuesta de células T $CD4^+$ a través de la producción de interferón- γ y la secreción de metabolitos del óxido nítrico por macrófagos activados.⁵⁴ Los tripomastigotes metacíclicos generan una forma de supresión independiente de los productos de los macrófagos, generando la muerte celular inducida por activación (MCIA), que es una respuesta regulatoria de las células T $CD4^+$ activadas que compromete a los receptores RCT:CD3.^{42,56} La susceptibilidad de las células T $CD4^+$ a MCIA *in vitro* y la apoptosis de células T $CD4$ *in vivo*, se han descrito en el curso de la enfermedad de Chagas experimental inducida por tripomastigotes metacíclicos.⁴⁶

MCIA ha sido considerado un mecanismo útil para la eliminación de células T activadas, reduciendo el daño a los tejidos del huésped.^{42,56} Se ha sugerido que MCIA en infecciones por *Trypanosoma cruzi* tiene un efecto dañino para el huésped, matando células T activadas y restringiendo la efectividad de la respuesta efectora antiparasitaria.¹⁷ También MCIA está involucrada en la modulación de células T por los parásitos crecidos en macrófagos infectados con *Trypanosoma cruzi*, demostrando que éstas son las responsables del incremento en la carga parasitaria.⁴⁹

Se ha visto que existe muerte de células T $CD4^+$ mediada por fas, que reduce la producción de interferón- γ en una forma desproporcionada. Estos resultados implican que las células fas susceptibles contribuyen a la producción de interferón- γ en células T $CD4^+$ de ratones infectados por *Trypanosoma cruzi*. Estos resultados sugieren que las células T $CD4^+$ pueden poseer un papel dual en la protección del huésped contra dicho microorganismo, pudiendo controlar o aumentar la carga parasitaria en tejidos dependiendo de si MCIA es inducida antes o después del encuentro con los macrófagos.⁴⁹

Por otro lado, la inducción de muerte celular programada en las células parasitadas *in vitro* interviene en el ciclo del mamífero infectado con *Trypanosoma cruzi*, y probablemente de otros protozoarios parásitos. Las parasitemias fluctuantes características de la infección por protozoarios en el torrente circulatorio de los mamíferos, podrían reflejar los esfuerzos del sistema inmune y la regulación de la población de parásitos por ellos mismos.

La inducción de la apoptosis *in vivo* durante la infección por *Trypanosoma cruzi*, podría ser un importante mecanismo regulatorio asociado a la inmunosupresión y a la evasión de la respuesta inmune de este parásito. En la enfermedad de Chagas experimental las células T CD8 se tornan más propensas a morir espontáneamente en cultivo. En algunos sistemas, la susceptibilidad a la muerte se correlaciona con baja expresión de bcl-2, que es un supresor de la apoptosis. Su expresión puede ser aumentada agregando IL-2 a los cultivos y protegiendo a las células de muerte.⁴⁹

c) *Plasmodium falciparum*

Se han indicado porcentajes elevados de muerte celular programada en linfocitos *in vitro* de individuos infectados con *Plasmodium falciparum* durante la fase aguda de la enfermedad, y se ha relacionado que la apoptosis está asociada a niveles altos de sIL-2R. La infección por *Plasmodium falciparum* muy probablemente provoca un incremento significativo en los niveles de apoptosis espontánea, que podría participar en la resolución de la inflamación aguda inducida por el parásito.¹⁸ La apoptosis es esencial en el mantenimiento del balance normal, en el número y en la densidad de la población celular en renovación, así como en la regulación de la activación policlonal observada en malaria.¹⁸

Se han aislado los genes de las topoisomerasas I y II del genoma de *Plasmodium falciparum*^{57,58} y se ha probado que el parásito es sensible a drogas que inhiben las topoisomerasas,⁵⁹ y que inducen apoptosis y fragmentación de DNA en células

eucarióticas;⁶⁰ por estas observaciones se cree que la apoptosis podría estar involucrada en la regulación del crecimiento de *Plasmodium falciparum*.

De igual forma, se han realizado estudios para determinar la acción de la cloroquina en una cepa sensible de *Plasmodium falciparum*, encontrando fragmentación oligonucleosomal de DNA, que no se observa en cepas resistentes a cloroquina. Esto sugiere que la apoptosis podría ser el resultado de la actividad de la cloroquina en el parásito de la malaria y que hay una diferencia significativa en esta respuesta entre una cepa sensible y otra resistente a *Plasmodium falciparum*.

d) *Leishmania donovani*

Se ha señalado que la infección por *Leishmania donovani* previene la apoptosis en macrófagos derivados de médula ósea,¹³ y que probablemente este efecto es inducido por un lipofosfoglicano, que es la molécula principal de superficie de *Leishmania donovani*.⁶¹

Se sabe que los macrófagos derivados de médula ósea expresan genes de citosinas, que facilitan la prevención de la apoptosis y podrían participar en otros aspectos del proceso infeccioso. El aumento en la viabilidad de células del huésped podría facilitar la diseminación de la infección mediante el incremento del número de células disponibles para ser parasitadas por *Leishmania donovani*, aumentando el número infectado de macrófagos circulantes que pueden ser tomados por el mosquito transmisor.¹³

e) *Toxoplasma gondii*

Resiste a la apoptosis iniciada por múltiples inductores, como citotoxicidad mediada por LTC (linfocitos T citotóxicos) dependientes o independientes de FAS, irradiación γ o ultravioleta, por privación de factores de crecimiento, toxinas y ionóforos de calcio (beuvericina). Cada uno de éstos utiliza vías de señalización diferentes dando como resultado

la activación secuencial de una familia de proteasas que se unen a enzimas reparadoras, a proteínas del citoesqueleto y a proteínas nucleares estructurales.

Sin embargo, el mecanismo por medio del cual la infección por *Toxoplasma gondii* protege a las células de la apoptosis aún se desconoce, pero se sabe que es un proceso activo que requiere de parásitos vivos que lleven a cabo síntesis proteica. De acuerdo con modelos de inducción de apoptosis, se cree que este protozoario inhibe la activación de la apoptosis y bloquea la función de 3 proteasas Cpp-32,⁶²⁻⁶⁴ ICE-LAP3,^{3,65} y Mch-2.⁶⁶ Se ha llegado a esta conclusión por las observaciones de que la infección por *Toxoplasma gondii* bloquea la apoptosis inducida por granzima B, la cual muy probablemente activa directamente a estas 3 proteasas.⁶⁷

El hecho de que exista inhibición de la apoptosis por esta amplia gama de inductores sugiere que hay un mecanismo común involucrado en la mayoría o en todas las vías apoptóticas.⁶⁸

Conclusiones

Podemos concluir que la muerte celular programada o apoptosis es un fenómeno biológico generalizado mediado por señales extra o intracelulares y regulado por expresión génica. Se ha encontrado tanto en organismos multicelulares como unicelulares. Aunque los organismos unicelulares comparten algunos mecanismos efectores y reguladores de la muerte celular programada con los organismos multicelulares, han desarrollado vías divergentes, que podrían ser utilizadas como blanco de estrategias terapéuticas en las que se active selectivamente la muerte celular programada del parásito.

Los protozoarios son capaces de inducir o prevenir la apoptosis en las células de sus huéspedes. La inhibición de este proceso fisiológico durante la infección por parásitos intracelulares es un camino importante de diseminación que garantiza al parásito la supervivencia.

Varios aspectos de la interacción entre huésped y parásito, incluyendo la evasión del parásito, la supresión inmune, la distribución no balanceada de subpoblaciones de linfocitos T, y aun el daño tisular no linfóide, pueden estar potencialmente influidos por la muerte celular programada. No es sorprendente que la muerte celular programada de células T resulte ser un mecanismo extremadamente importante de la inmunopatología inducida por la infección de protozoarios.

La apoptosis en la célula huésped puede conducir a importantes modificaciones en las interacciones huésped-parásito durante las infecciones crónicas.

Que los mecanismos de regulación de la apoptosis estén muy conservados en la naturaleza, sugiere un significado evolutivo muy importante, el cual seguramente se podrá entender conforme se obtenga información en otros organismos.

Referencias

1. Clarke AR. Thymocyte apoptosis induced by P53 dependent and independent pathways. *Nature* 1993;36:2849-2852.
2. Ellis HM, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell-death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663-698.
3. Duan G, Chinnaiyan LP, Hudson JP, Wing WW, Dixit VM. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death, protein ced-3 is activated during Fas and tumor necrosis factor induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:1621.
4. White K, Grether M, Abrams J, Young L, Farrell K, Steller H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 1994;264:677-683.
5. Abrahams JM, White K, Fessler LI, Steller H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1993;117:663-698.
6. Yuan AL, Cole S, Cooke CA, Neelnon WG, Earnshaw WC. Nuclear events of apoptosis *in vitro* in cell free mitotic extracts: A model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 1993;123:7-22.
7. Goistein P, Marguet D, Depraetere V. Homology between reaper and the cell death domains of Fas TNFR1. *Cell* 1995;81:185-186.
8. Davis MC, Ward JG, Herrick, Allis D. Programmed nuclear death like degradation of specific nuclei conjugating *Tetrahymena*. *Development Biology* 1992;154:419-432.
9. Radchenko AI, Bien TU. An electron microscopic study of the natural death of cyst cells in Sarcosporidia. II Ultrastructural changes in the nuclei of cyst cells of *Sarcocystis muris*. *Can Res* 1995;57:2446-2451.
10. Welbum SC, Barcinski, Williams GT. Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitol Today* 1997;13:22-26.
11. Picot SJ, Burnod VB, Bracchi B, Clumpitazi FF, Ambroise PT. Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human mala-

- ria parasite *Plasmodium falciparum*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1997;91:590-591.
12. Zychlinsky A, Prevost MC, Samsonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992;358:167-169.
13. Kathryn JM, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 1994;293:2937.
14. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994;76:777-779.
15. Evan G. Old cells never die, they just apoptose. *Trends Cell Biol* 1994;4:191-192.
16. Shen Y, Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:105-111.
17. Dosreis GA, Fonseca MEF, Lopes MF. Programmed cell death in experimental Chagas' disease. *Parasitol Today* 1995;11:390.
18. Aissatou TB, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, Roussilhon C. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun* 1996;64:744-750.
19. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67-77.
20. Moreira CM, Del Portillo AH, Milder RV, Balanco JM, Barcinski M. Heat shock of the unicellular organism *Leishmania amazonensis*. *J Cell Physiol* 1995;167:305-313.
21. Mpoke S, Wolfe J. DNA digestion and chromatin condensation during nuclear death in *Tetrahymena*. *Exp Cell Res* 1996;225:357-365.
22. Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995;9:219-228.
23. Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J* 1992;6:2450-2455.
24. Seebeck T, Hemphill A, Lawson D. The cytoskeleton of trypanosomes. *Parasitol Today* 1990;6:49-56.
25. Ameisen JC, Idziorek T, Billaut Mulot O, Loyens U Tissier JP, Potemtier A, Ouissi. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation, and survival. *Cell Death and Differentiation* 1995;2: 285-300.
26. Moazed D, Noller HT. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* 1989;342:142-148.
27. Janssen GMC, Van Damme HTF, Kriek J, Amons R, Moller W. Induction of crisis forms in cultured *Plasmodium falciparum* with human immune serum from Sudan. *J Biol Chem* 1994;269:1-8.
28. Blumenthal T, Landers T, Landers TA, Webwr K. Bacteriophage Q β replicase contains the protein biosynthesis elongation factor EF Tu and EF Tc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:3113-3117.
29. Billaut-Mulot O, Fernández-Gómez R, Loyens M, Ali Ouassii. *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1a: nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene* 1996;174:19-26.
30. Billaut-Mulot O, Schoneck R, Fernández-Gómez R, Taibi A, Capron A, Pommier V, Plumas-Marty B, Loyens M, Ouissi A. Molecular an immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation I gamma. *Biol Cell* 1994;82:39-44.
31. McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters* 1998;157:168.
32. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 555-556.
33. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996;85:781.
34. Lopes FM, Dosreis GA. Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 1995;28:913-918.
35. Uehara T, Miyawaki T, Ohta K, Tamaru Y, Yokoy T, Nakamura S, Taniguchi N. Apoptotic cell death of primed CD45RO⁺ T lymphocytes in Epstein Barr virus induced infectious mononucleosis. *Blood* 1992;80:452-458.
36. Groux HG, Torpier D, Monte, Capron, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992;175:331.
37. Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrle R, Hrigwood N, Sekaly RP, Finkel TH. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp 120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 1992;176:1099-1106.
38. Petry K, Eisen H. Chagas' disease: A model for study of autoimmune diseases. *Parasitol Today* 1989;5:111.
39. Kierszenbaum F. On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response: lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology* 1981;44:641.
40. Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, Gambert W, Bofill M, Shamsadeen N. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections: The role of apoptosis in T cell memory. *J Exp Med* 1993;178:427-438.
41. Smith CA, Williams RK, Jekinson, Owen JJT. Antibodies to CD3/TCR complex induce death by apoptosis in immature T cell in thymic culture. *Nature* 1989;337:181-183.
42. Lenerdo MJ. Interleukin-2 programs mouse ab T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858-861.
43. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Tough TW, Alderson MR, Lynch DH. gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* 1994;28:928-933.
44. Ramos CE, Lamoyi E, Feoli M, Rodrigues M, Perez M, Ortiz-Ortiz L. *Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed response to different antigens in the infected mice. *Exp Parasitol* 1978;45:189-199.
45. Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: The predominance of parasite nonspecific response and the activation of TCR it cells. *Immunol Rev* 1989;112:184-206.
46. Lopes FM, Da Veiga FV, Santos FA, Evangelina NT, Dosreis GA. Activation-induced death by apoptosis in Experimental Chagas' disease. *J Immunol* 1995;744-752.
47. Erard F, Wild MT, Garcia-Sanz JA, LeGros GL. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4 cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 1993;260:1802-1805.
48. Clement MV, Stamenkovic I. Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: Similarities and distinctions. *J Exp Med* 1994;180:557.
49. Nunes PM, Andrade RM, Lopes M, Dosreis GA. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages co-cultures with CD4⁺ lymphocytes from infected hosts. *J Immunol* 1998;161:1324.
50. Reed SG. In vivo administration of recombinant g-interferon induces macrophage activation and prevent acute disease, immunosuppression and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1987;140:4342.
51. Torrico FH, Heremans MT, Rivera E, Van March A, Billau, Carlier Y. Endogenous IFN-g is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 1991;146:626.
52. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieney SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-g-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor-b. *Eur J Immunol* 1992;22:2501.

53. Muñoz-Fenández MA, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ treated macrophage against *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1992;22:301.
54. Abrahamsen IA, Coffman RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1995;155:3955.
55. Lopes FM, Dosreis GA. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: blockade of co-stimulatory T cell responses in infected hosts due to defective T-cell receptor-CD3 functioning. *Infect Immunol* 1994;62:1484-1488.
56. Van Parijs L, Abbas AK. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 1996;8:355.
57. Cheesman S, McAleese S, Goman M, Johnson D, Horrocks P, Ridley RG, Kilbey BJ. The gene encoding topoisomerase II from the *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2547-2551.
58. Tosh K, Kilbey B. The gene encoding topoisomerase I from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Gene* 1995;163:151-154.
59. Lee S, Inselburg J. *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to drugs that bind DNA or inhibits its synthesis. *J Parasitol* 1993;79:780-782.
60. Onoshi Y, Azama Y, Sato Y, Mizuno Y, Tadakuma T, Kiazaki H. Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes. *Biochemical Biophysical Acta* 1993;1175:147-154.
61. Reiner NEW, McMaster RW. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 1987;138:1926.
62. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Cpp32, novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin converting enzyme. *Biol Chem* 1994;269:30761.
63. Nicholson DW, Ali A, Thornberry JP, Vaillancourt CK, Ding M, Gallant T, Gareau PR, Griffin M, Labelle M, Lazebnik YA, Munday N, Raju SM, Smulson ME, Yamin TTM, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/Ced3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376-378.
64. Tewari M, Quan K, O'Rourke, Desnoyers Z, Zeng DR, Beidler GG, Poirer GS, Salvesen, Dixit VM. Yama/Cpp32b a mammalian homology of Ced-3 is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADN-ribose) polymerase. *Cell* 1995; (81):801.
65. Fernández-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang Z, Yu, Croce CM, Salveson G. Mch3 a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res* 1995;55:6045.
66. Fernández-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Mch2, a new member of the apoptotic ced-3/ICE cysteine gene family. *Cancer Res* 1995;55:2737.
67. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease Cpp-32 by cytotoxic T cell derived granzyme R. *Nature* 1995;377:446.
68. Nash PB, Purner MB, Leon PR, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* 1998;160-1824-830.

XV CONGRESO INTERNACIONAL DE MEDICINA TROPICAL Y MALARIA

Cartagena, Colombia
20 a 25 de agosto de 2000

Informes: Dr. Santiago Nicholls
Secretario General del
XV Congreso Internacional de Medicina Tropical y Malaria
Instituto Nacional de Salud
Laboratorio de Parasitología
Bogota, Colombia
Tel: (57) 1-222 0577 Exts. 422 y 423
Fax: (57) 1-3157312
E-mail: rnicholls@hemagogus.ins.gov.co
<http://www.prof.uniandes.edu.co/xvifm/cartagena.htm>