



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regulación por inmunosupresores de la calcineurina de
Entamoeba histolytica y del absceso hepático en
hámsteres. Evidencias de la participación de la respuesta
inmune celular en la patología.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CESAR ANTONIO ORTIZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO CESAR CARRERO SANCHEZ



MEXICO, D. F.



2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: César Antonio
Ortiz Martínez

FECHA: 5- Noviembre - 2004

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la división de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Regulación por inmunosupresores de la calcineurina de *Entamoeba histolytica* y del absceso hepático en hámsteres. Evidencias de la participación de la respuesta inmune celular en la patología".

realizado por **Ortiz Martínez César Antonio**

con número de cuenta **9427569-6**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Julio César Carrero Sánchez

[Firma]

Propietario

Dr. Juan Pedro Laclette San Román

[Firma]

Propietario

M. en C. Marco Antonio Martínez Avila

[Firma]

Suplente

M. en C. Alfonso Olivos García

[Firma]

Suplente

Biol. Rodolfo Salas Lizana

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Dedicatoria

A mi mamá:

Con todo el amor y agradecimiento que te tengo, por darme la oportunidad de crecer a tu lado, por tus consejos y enseñanzas que me guiarán por siempre.

A Valeria:

Por ser mi principal fuente de motivación, por ser lo mejor que me ha pasado en la vida.

A Daniel:

Por arrancarme la risa, con todo el cariño y amor que te tengo,

A Claudia:

Gracias por estar a mi lado, por tu apoyo, comprensión y sobre todo por amarme.

A mi hermana:

Por la suerte de compartir a mamá, por la suerte de crecer a tu lado y sobre todo por el cariño que existe entre nosotros.

A mi tía:

Leonor por hacerme feliz al permitirme crecer junto a ti y a Alejandro.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma mater y por la excelente formación que me ha brindado a lo largo de mi carrera.

A la facultad de Ciencias por todo el conocimiento y experiencia que encontré en sus aulas.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de tesis.

Al Dr. Julio César Carrero por ser mi tutor en este proyecto, por su enseñanza y paciencia y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Juan Pedro Laclette por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Alfonso Olivos por sus consejos y enseñanzas.

Al Biol. Mario Nequiz por proporcionarme las amibas.

Al Dr. Gerardo Arrellin por su asesoramiento en el análisis de los cortes histológicos.

A los integrantes del laboratorio, Claudia, Abril, Paty, Fela, Dr. Pedro, Adrián, Miriam, Carlos y la Sra. Prima.

A todos mis profesores, sin excluir a ninguno que han sido la base de mi formación y por enseñarme a amar esta carrera.

A mis amigos por compartir las risas y todos los momentos juntos, Areli, Rocío, Saúl, Nayeli, Anhidia, Elba, Emilio, Ernesto, Aldo, Mario, Alfred, Ezequiel, Jorge, Rod y Goyo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Amibiasis y el parásito	1
1.2 Ciclo de vida	2
1.3 Epidemiología	4
1.4 Patología	5
1.5 Amibiasis intestinal	5
1.6 Absceso hepático amibiano (AHA)	6
2. Respuesta inmune en la amibiasis	7
2.1 Inmunidad celular	8
2.2 Inmunidad humoral	10
3. Efecto de ciclosporina A, Tacrolimus y PSC-833 sobre parásitos	11
3.1 Ciclosporina A	11
3.2 Tacrolimus	13
3.3 PSC-833	15
3.4 Efecto de la CsA y PSC-833 sobre <i>E. histolytica</i>	15
4. Vía mediada por la inhibición de la CN	16
4.1 Inmunofilinas	17
5. Calcineurina (CN)	18
II. JUSTIFICACIÓN	22
III. OBJETIVOS	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Cultivo axénico de <i>E. histolytica</i>	24
2. Preparación de la fracción citosólica de trofozoítos	24
3. Ensayos de fosfatasas	24
4. Búsqueda del gen de la subunidad catalítica (CnA)	25
5. Cinéticas de crecimiento	25
6. Tratamiento con las drogas inmunosupresoras	26
7. Ensayos de proliferación celular	26
8. Tratamiento de hámsteres con FK506	27
9. Inducción del AHA	27
10. Procesamiento del tejido hepático para el análisis histológico	27
V. RESULTADOS	29
1. Ensayos de fosfatasas	29
1.1 Inhibición de la actividad de CN por drogas inmunosupresoras	31
2. Secuencia codificadora de CnA de <i>E. histolytica</i>	32
3. Efecto de FK506 y Rapamicina sobre <i>E. histolytica</i>	35
4. Efecto de FK506 y Rapamicina sobre la proliferación de esplenocitos derivados de hámsteres y ratas Wistar	36
5. Efecto de FK506 sobre el desarrollo del AHA	37
VI. DISCUSIÓN	42
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. BIBLIOGRAFÍA	48
IX. ARTICULO PUBLICADO	55

RESUMEN

La ciclosporina A (CsA) inhibe la proliferación *in vitro* de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* por una vía independiente de las glicoproteínas P (Pgp). En este trabajo se exploró la vía de la calcineurina (CN), otra vía de acción descrita para esta droga en parásitos. La CsA suprime al sistema inmune inhibiendo la proliferación de los linfocitos T mediante la formación de complejos proteicos, CsA-Ciclofilina (CsA-CyP), los cuales afectan la actividad de la CN. La incapacidad de CN para defosforilar impide la acción de factores de transcripción como el “NF-AT” (Factor Nuclear de células T Activadas), que regula la expresión de genes involucrados en la replicación celular como el de IL-2. Con tal fin, se identificó actividad de fosfatasa total y de CN en extracto amibiano clarificado mediante el uso de dos ensayos colorimétricos que emplean diferentes sustratos. En el primero de ellos, se identificó actividad de fosfatasa total con el sustrato p-nitro-fenil-fosfato (pNPP). En el segundo ensayo, se determinó la actividad correspondiente a los diferentes tipos de fosfatasa mediante el uso de inhibidores (Ácido okadaico y EGTA) y estimuladores particulares de la CN (calmodulina y Ca^{2+}), empleando como sustrato el fosfo-péptido RII. La actividad de CN en amiba correspondió al 40 % de la actividad total liberando 0.99 nmol de fosfato. Esta actividad fue marcadamente inhibida por la CsA y FK506 (Tacrolimus) de una forma dosis-dependiente, mientras que el análogo de CsA, PSC-833 (no inmunosupresor) no mostró efecto alguno. Adicionalmente, se identificó en la base de datos del genoma de la amiba (*The Institute Genome Research; TIGR*) el gen de la subunidad catalítica A (CNA) de la CN por homología con la secuencia de CNA de *Schistosoma mansoni*. Estos resultados sugieren que la CsA inhibe la proliferación *in vitro* a través del bloqueo de su CN. Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo de investigación encontraron que la administración de CsA a hámsteres protege contra el desarrollo del absceso hepático amibiano (AHA). Sin embargo, se desconoce si esta protección se debe al efecto citotóxico del fármaco sobre los parásitos, a la inhibición de la respuesta inmune celular ó a ambos. Con la finalidad de evaluar la participación de la respuesta inmune celular en la patología, en el presente trabajo se analizó el efecto sobre el AHA de inmunosupresores que mostraron poca o ninguna citotoxicidad sobre la proliferación de los trofozoítos de *E. histolytica*. Aunque Rapamicina y FK506 cumplieron con esta condición, solo FK506 inmunosuprimió a los hámsteres. Este fármaco causó una disminución del 80 % del AHA en los animales tratados con una dosis diaria de 2mg/kg de peso. Los hígados de estos animales mostraron múltiples micro-abscesos en un solo lóbulo que bajo el microscopio reveló gran cantidad de trofozoítos concentrados en cúmulos, con escaso infiltrado inflamatorio y daño tisular. En contraste los hígados de los hámsteres no tratados presentaron

hepatomegalia con destrucción en prácticamente todo el hígado, pérdida de la estructura del tejido, lisis celular extensa e infiltrado inflamatorio, principalmente de polimorfonucleares y células mononucleares.

La disminución en la extensión y severidad del AHA en hámsteres por efecto de FK506, el cual no afecta la proliferación amibiana *in vitro*, sugiere que la respuesta inmune celular es responsable en gran medida, de la destrucción del tejido hepático en este modelo experimental.

I. INTRODUCCIÓN

El parasitismo es una asociación antagónica e inestable entre dos especies distintas, de las cuales el parásito, vive de modo temporal o permanente en otro ser, el huésped, alimentándose a sus expensas y causándole un daño de moderado a fatal. El parásito depende metabólicamente y evolutivamente del huésped, estableciendo contacto e intercambio macromolecular, con lo cual de forma potencial ocasiona acciones patógenas o modificaciones del equilibrio homeostático del huésped y de la respuesta de su sistema inmunológico.

Los parásitos presentan una historia de vida fascinante, teniendo en cuenta su tremenda variabilidad, su tamaño; desde organismos macroscópicos hasta microscópicos, su localización en el hospedero, el desarrollo en órganos diversos, las múltiples formas de reproducción y las variadas migraciones intra y extra-orgánicas a las que se ven sometidos con el único fin de mantener la especie. Esta variabilidad en sus ciclos de vida es el resultado de una adaptación genotípica y fenotípica.

1. Amibiasis y el parásito

La amibiasis se define como la infección del tracto gastrointestinal humano causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*, que algunas veces es capaz de invadir la mucosa intestinal y en algunos casos llegar a diseminarse a otros órganos, principalmente el hígado (OMS, 1997).

Existen algunas personas infectadas con *E. histolytica* que nunca desarrollan síntomas; esto fue interpretado por los investigadores de principios del siglo pasado como un indicio de que el parásito tenía una virulencia variable. En 1925 Emile Brumpt sugirió la existencia de dos especies *E. histolytica* y *Entamoeba dispar*; siendo la primera la única capaz de causar enfermedad. Sin embargo, esta hipótesis fue rechazada por otros investigadores. Durante la década de los 70' mediante estudios de zimodemos se generaron observaciones que dieron apoyo a la hipótesis de Brumpt. Después de este tiempo, se continuaron acumulando

evidencias bioquímicas, inmunológicas, y genéticas y no fue sino hasta 1993 que se publicó una redescrición formal de *E. histolytica* separándola de *E. dispar* (OPS, 1997).

E. histolytica puede causar la lesiones a nivel intestinal y extra intestinal, contrariamente a *E. dispar* que vive como comensal en el intestino. La confirmación de la existencia de estas dos especies es probablemente el mayor logro en el campo de la investigación de la amibiasis.

1.2 Ciclo de vida

E. histolytica presenta dos fases: 1) El quiste o fase infectiva, el cual es tetranucleado y mide 10-15 μm de diámetro rodeado de una pared de quitina (Fig.1), y 2) El trofozoíto o fase invasora, que es uninucleado y mide 8-40 μm (Fig.2).

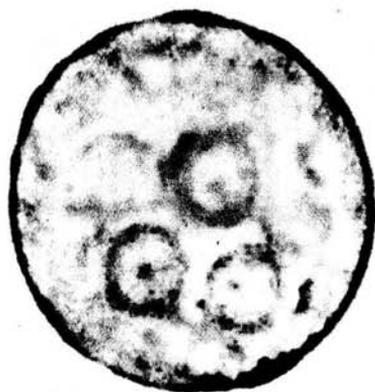


Fig.1 Quiste maduro de *E. histolytica* teñido con yodo. Se observan claramente los 4 núcleos.

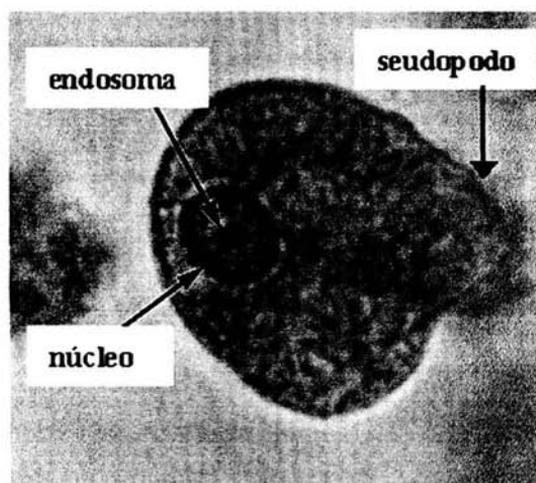


Fig.2 Trofozoíto de *E. histolytica* en contraste de fases.

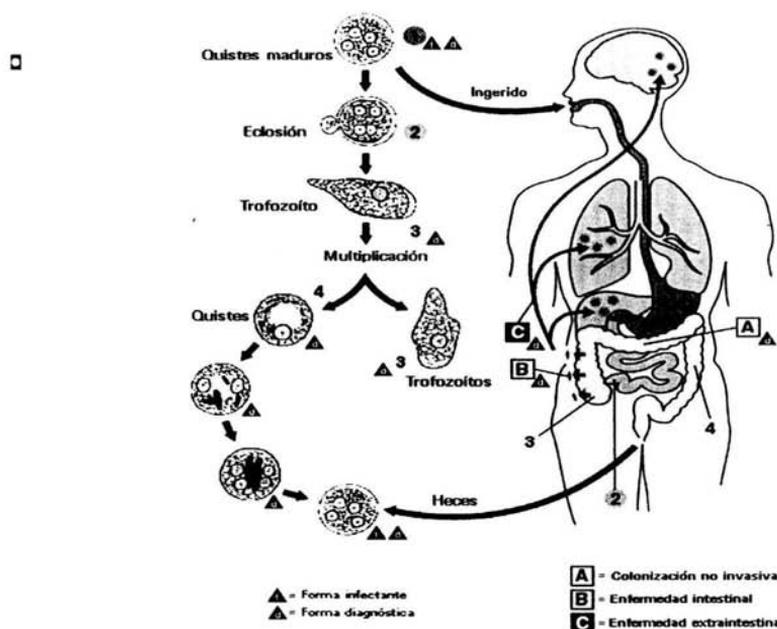


Fig. 3 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* tomado de la sección de Amibiasis del CDC, Atlanta 1999.

La infección comienza con la ingestión de agua o comida contaminada con quistes maduros provenientes de materia fecal de humano. Gracias a su cubierta de quitina, los quistes ingeridos son capaces de resistir el efecto de los jugos gástricos hasta alcanzar la parte baja del intestino delgado donde ocurre el desenquistamiento, liberando una ameba tetranucleada que duplica sus núcleos, seguida de divisiones citoplasmáticas que resultan en la formación de 8 pequeñas amebas llamadas amébulas metaquísticas. Estas amébulas migran al intestino grueso en donde se transforman en trofozoitos maduros que se adhieren a la mucosa intestinal y la colonizan. Allí, los trofozoitos se alimentan de bacterias y restos celulares, se reproducen por fisión binaria y a diferencia de *E. dispar* que vive como comensal, *E. histolytica* penetra la mucosa causando lesiones de diferente magnitud que en contadas ocasiones llevan a la migración de los trofozoitos a otros órganos, principalmente el hígado. En cualquier caso, los trofozoitos que alcanzan la parte baja del colon se enquistan, completando el ciclo de vida cuando éstos son excretados en la materia fecal al ambiente (OMS, 1997).

1.3 Epidemiología

La amibiasis es un enfermedad cosmopolita, considerada como uno de los “síndromes de la pobreza” ya que prevalece en áreas con condiciones higiénicas deficientes, donde el hacinamiento, la deposición inadecuada de excretas y la contaminación del agua favorece su transmisión (OMS, 1997). *E. histolytica* infecta a más de 500 millones de personas en todo el mundo y es responsable de 100 mil muertes por año (Walsh, 1986; Zambrano y cols., 2002). Estos datos epidemiológicos colocan a la amibiasis como la tercera causa de mortalidad por parásitos, sólo detrás de la malaria y la esquistosomiasis (Walsh, 1986).

La incidencia de la infección amibiana depende de hábitos culturales, edad, nivel de saneamiento, hacinamiento y condición socioeconómica (Ravdin, 1995). La amibiasis invasora puede presentar una incidencia tan alta como el 50 % en ciertas áreas de países en desarrollo; las tasas más altas ocurren en Asia, África y América. La determinación de anticuerpos anti-*E. histolytica* indica que en Asia, Indonesia presenta una incidencia del 34 % en áreas rurales. Mientras que en África, Tanzania presenta valores de 57 %, ambos detectados por hemaglutinación indirecta (IHA) (Krestchmer, 1990). En América, Nicaragua presenta una incidencia de 23 %, detectada también por IHA (Téllez y cols., 1997). En el caso particular de México, esta incidencia incremento de 5.9 % a 9 % entre 1974 y 1994, determinado por IHA (Gutiérrez y cols., 1976; Caballero y cols., 1994). Estos reportes indican un incremento en la incidencia de anticuerpos anti-amiba en los últimos años. Sin embargo, los estudios realizados sobre la incidencia del absceso hepático amibiano en México revelan el efecto contrario, ya esta incidencia en adultos mayores disminuyó de 2.0 % a 0.2 % entre 1975 y 1977; y en casos infantiles de 26.9 % a 1.1 % entre 1976 y 1985 (González y Gutierrez, 1986). En contraste, la Secretaría de Salud del estado de Guadalajara posteriormente reportó que la incidencia del absceso hepático amibiano incrementó de 0.2 % a 9.2 % entre 1993 y 2000 (SSA, 2000), lo que sugiere que la incidencia de la amibiasis extra-intestinal en México podría estar en aumento, al igual que a nivel mundial (Haffar y col., 1982).

México es uno de los países más afectados por la amibiasis a nivel mundial. Se estima que del 20 % de la población que está infectada, el 8 % ha sufrido al menos un episodio invasor, lo que resulta en la muerte de 10 a 30 mil personas anualmente (Conde-Bonfil y Dela

Mora-Zerpa, 1992), ubicando a la amibiasis entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad por parásitos en nuestro país.

1.4 Patología

En la amibiasis intestinal los cambios patológicos de la mucosa pueden ser inicialmente inespecíficos seguidos por la formación de úlceras. En casos severos, las úlceras pueden dar lugar al desarrollo de un megacolon tóxico. La infección intestinal se puede complicar por la diseminación de los trofozoítos al hígado a través de la vena porta, o por la perforación de la pared intestinal resultando en una peritonitis o la formación de una fístula (Joyce y cols, 1988).

E. histolytica debe su nombre a su efecto citolítico sobre los tejidos. Para esto es esencial que los trofozoítos se adhieran a las células epiteliales y a algunas células inflamatorias de la respuesta inmune mediante moléculas de superficie con función de adhesinas, como la lectina de 260 kDa con afinidad a galactosa (Gal-lectin) (Pettri y cols., 1989). La lisis de las células blanco puede producirse mediante una citólisis directa, que es dependiente del contacto y mediada por amibaporo, proteasas y fosfolipasas amibianas; o por otra indirecta en la que intervienen citocinas y productos proteolíticos resultantes de la lisis de leucocitos por las amibas. Así, los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) que constituyen la respuesta inicial del huésped a los trofozoítos de *E. histolytica*, pueden ser destruidos por ésta permitiendo a los productos de la lisis aumentar el daño a los tejidos (Said-Fernandez, 1990).

Las dos formas de amibiasis que han sido reconocidas por los médicos son: **a)** La amibiasis luminal o intestinal con ligero dolor abdominal y diarrea leve, y **b)** La amibiasis invasora en la cual los trofozoítos invaden la mucosa intestinal produciendo disentería, moco y sangre en la materia fecal, fiebre, tenesmo, dolor abdominal intenso y ameboma o apendicitis en adultos. Estos últimos son signos de invasión tisular por migración de los trofozoítos a través del torrente sanguíneo hacia órganos extra-intestinales como pulmón, cerebro e hígado (Martínez-Palomo, 1987).

1.5 Amibiasis intestinal

En la mayoría de los casos la infección con *E. histolytica* esta confinada al lumen intestinal; sin embargo, en aproximadamente el 10 % de los casos resulta en la invasión de la mucosa intestinal y sólo una parte de éstos se complica cuando los trofozoítos se diseminan por la perforación de las paredes intestinales a la cavidad peritoneal resultando en una peritonitis asociada a una fistula (Ravdin, 1988). Se estima que en 1 de cada 10 (1% de todos los infectados con *E. histolytica*) los trofozoítos migran al hígado vía el sistema porta, dando lugar a la formación de un absceso hepático.

La invasión de la mucosa por trofozoítos conlleva a disentería amibiana, que se caracteriza por la formación de úlceras, frecuentemente en forma de cuello de botella, acompañadas de hemorragias, fiebre y dolor abdominal agudo; estas úlceras pueden profundizarse y extenderse lateralmente bajo la mucosa aparentemente normal. Los trofozoítos se observan en la periferia de las áreas necróticas y muy pocas veces se ven neutrófilos o eosinófilos en estas lesiones. En los casos severos de amibiasis intestinal usualmente se observa una respuesta inflamatoria aguda, la cual podría estar asociada al daño del tejido (Ravdin, 1995)

1.6 Absceso Hepático Amibiano (AHA)

La infección hepática amibiana resulta de la migración de trofozoítos desde el intestino a través de la vena porta hasta el hígado. En el absceso, el parénquima hepático es completamente substituido por restos necróticos de hepatocitos con escasos trofozoítos y células inflamatorias (OMS,1997). En casos extremos, la formación de un AHA de grandes dimensiones puede llegar a perforar la cavidad peritoneal, pericárdica y pleural. Cuando se perfora el diafragma, la infección amibiana invade y da lugar a la formación de abscesos en pulmones, e incluso en algunos casos, esta diseminación puede llegar a lugares tan distantes como el cerebro (Ravdin, 1995).

Desde que *E. histolytica* fue reconocida como el agente causal de la amibiasis intestinal y del absceso hepático amibiano en humanos, se ha intentado reproducir la enfermedad en el laboratorio en diferentes modelos experimentales. Se han utilizado muchas especies de animales, pero no se ha logrado establecer la infección de una manera natural, como lo sería, la administración oral de quistes infectivos, ya que se desconocen los procesos de enquistamiento. El uso de cultivos de *E. histolytica* es la única posibilidad de infectar a los

animales de manera directa, mediante la inoculación intra-hepática o intra-portal de trofozoítos. En 1951, Reinerston y Thompson fueron los primeros en utilizar hámsteres como modelo experimental para reproducir la amibiasis hepática. En sus primeros experimentos utilizando cultivos monoxénicos demostraron que estos animales son altamente susceptibles al desarrollo del AHA. Más tarde, junto con el desarrollo de cultivos axénicos se realizaron estudios basados en la inoculación intra-peritoneal, intra-hepática e intra-orbital de amibas en hámsteres (Meerovitch y Chadee, 1988). Como en el caso de los cultivos monoxénicos, la inoculación intra-hepática resultó en el desarrollo de múltiples abscesos en el hígado; la inoculación intra-peritoneal dió origen a abscesos mesentéricos y la vía intra-órbital originó abscesos en cerebro y en hígado en algunos animales.

Tanimoto y cols, (1971) demostraron que la inoculación intra-portal en hámsteres con trofozoítos axénicos produce lesiones caracterizadas por necrosis y reacción inflamatoria en el 80 % de la superficie del hígado, producto de la formación de abscesos amibianos. El análisis microscópico mostró un infiltrado celular agudo de PMNs alrededor de la amiba durante las primeras 12 horas post-inoculación; más tarde, los PMNs lisados se observaron alrededor de las lesiones con cambios necróticos y degenerativos en los hepatocitos cercanos a las lesiones. El contacto directo de los trofozoítos con los hepatocitos es poco común, por lo que se ha sugerido que la destrucción de los hepatocitos es ocasionada por los productos líticos de los polimorfonucleares y macrófagos lisados por los trofozoítos. En fases tardías, ocurre un incremento en la necrosis del tejido hepático, en donde los macrófagos y células epiteliales son sustituidas por trofozoítos (Tsutsumi y cols., 1984). La infección experimental en el hámster ha sido de invaluable ayuda en el estudio de la virulencia de diferentes aislados de amibas, la patogénesis, la inmunología y la biología de la amibiasis invasora.

2. Respuesta Inmune en la amibiasis.

La infección por el protozooario *E. histolytica* induce respuesta inmunológica celular y humoral; sin embargo, el papel de estas en el control de la infección no está bien definido (Salata y Ravdin, 1986).

Se ha demostrado que en individuos recuperados de un absceso hepático amibiano se produce cierto grado de inmunidad. En la ciudad de México durante un estudio de

seguimiento por 5 años, de 1021 individuos recuperados de AHA sólo se observó 5 recurrencias (DeLeon, 1970). En un área altamente endémica en la India, la presencia de anticuerpos secretores anti-amibianos estuvo asociada con una menor frecuencia de infección (Choudhuri y cols., 1991). Sin embargo, puede darse la recurrencia de una infección asintomática con *E. histolytica* o con *E. dispar* cuando el título de anticuerpos desaparece (Choudhuri y cols., 1991).

Entre los antígenos de la amiba altamente reconocidos durante el AHA se encuentran tres muy estudiados: la Gal-lectin, reconocida por el 95% de los individuos con amibiasis invasora (Ravdin y cols., 1990; Abd-Alla y col., 1992), una proteína de superficie rica en serinas de 25 kDa (Stanley y cols., 1991), y una proteína rica en cisteínas de 29 kDa (Flores y cols., 1993; Soong y cols., 1995); estas últimas proteínas fueron reconocidas por más del 80 % de los pacientes que sufrieron absceso hepático amibiano.

2.1 Inmunidad celular

Existen evidencias en modelos experimentales y estudios clínicos que indican que el mecanismo de la inmunidad celular es crucial para la defensa ante este protozooario extracelular. Estos estudios sugieren que la respuesta inmune celular puede limitar ó prevenir la formación del AHA, como resultado de la inmunización con proteínas totales y recombinantes de *E. histolytica* (Meerovitch y Chadee, 1988; Salata y Ravdin, 1988; Lotter y Stanley, 200). En un modelo experimental del AHA en cobayos se observó que, a fases tempranas, los trofozoítos son rodeados por leucocitos polimorfonucleares, y al parecer no sufren daño aparente; posteriormente el infiltrado cambia, con predominio de macrófagos y otras células mononucleares mientras que los trofozoítos comienzan a mostrar signos de daño y muerte (Canales-Treviño y cols., 1986). En otro experimento se demostró un incremento exacerbado en el desarrollo del AHA en animales inmunosuprimidos con diferentes tratamientos con esteroides, timentomía neonatal, esplenectomía, radiación, sílice y anticuerpos anti-macrófagos (Ghadirian y cols, 1980). Estos resultados sugieren que la supresión de la respuesta celular puede favorecer la diseminación de las lesiones ocasionadas por la amiba.

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que el interferón gama (IFN- γ) es una de las citocinas responsables de activar a macrófagos para matar o inhibir el crecimiento

intracelular de diferentes microorganismos patógenos, incluyendo los protozoarios parásitos *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani*, y *Trypanozoma cruzi* (McCabe y col, 1985; Murray y col, 1983, 1984; Wirth y col, 1985). Estudios *in vitro* realizados por Salata mostraron que el IFN- γ es suficiente para activar a los macrófagos y matar a trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (Salata y cols, 1987).

También se ha reportado que las células de individuos infectados presentan actividad amebicida. Guerrero y cols (1976) reportaron que linfocitos de pacientes recién recuperados de AHA presentaron actividad citotóxica *in vitro* ante trofozoítos amibianos. Esto sugiere que la lisis de las amibas ocurre a través de productos secretados por los linfocitos; de la misma manera los sobrenadantes obtenidos después de incubar linfocitos con proteínas amibianas fueron aparentemente amebicidas. En contraste, los linfocitos de pacientes sanos o de pacientes con amibiasis intestinal aguda fueron rápidamente fagocitados. Un estudio más reciente hecho por Salata y cols (1986) demostraron que linfocitos obtenidos de pacientes recién recuperados de AHA y activados con antígeno amibiano, fueron capaces de matar *in vitro* a trofozoítos virulentos de la cepa HMI-IMSS. Otro estudio demostró que la incubación de linfocitos T CD8+ con antígenos de la amiba induce su actividad citotóxica contra trofozoítos virulentos (Kelsall y col., 1993).

Estos resultados en conjunto, sugieren que la respuesta celular esta involucrada en la protección contra la amibiasis experimental. Macrófagos y linfocitos mostraron un efecto específicamente citotóxico contra trofozoítos de *E. histolytica*.

Sin embargo, existen evidencias en modelos experimentales que sugieren que la respuesta inmune celular podría participar en el desarrollo y establecimiento de la infección amibiana, estableciendo una controversia que aún no está resuelta.

Una vez que el trofozoíto invade la mucosa intestinal, ocurre una respuesta inmune convencional. Células inflamatorias, principalmente PMNs y macrófagos, acuden al sitio de la invasión donde ocurre el primer contacto con el antígeno amibiano (Tsutsumi y col, 1984). A pesar del gran número de macrófagos que intentan fagocitar a las amiba, algunas de está permanecen intactas (Sher y col, 1980). En modelos experimentales de absceso hepático se observa que *E. histolytica* comienza por destruir PMNs en las primeras horas de la infección, seguido de destrucción de eosinófilos, los cuales al contacto con la amiba degranulan, sin evidencia de destrucción del parásito (Tsutsumi y Martínez-Palomo, 1988).

Los macrófagos que se distribuyen en la periferia de la lesión, fagocitan restos celulares pero no son destruidos por las amibas sino hasta etapas más tardías. Se ha sugerido que la extensa destrucción del hígado se debe a la lisis de las células inflamatorias (Tsutsumi y col., 1984).

Los experimentos *in vitro* indican que los trofozoítos amibianos son capaces de destruir a leucocitos polimorfonucleares (Artigas y col., 1966; Guerrant y col., 1981), células mononucleares de sangre periférica, células de bazo y macrófagos peritoneales de animales inmunizados (Chadee y col., 1985) También se ha observado que *E. histolytica* es capaz de inhibir el estallido respiratorio de los polimorfonucleares (Arbo, 1990). Además durante la amibiasis invasora aguda, la respuesta de linfocitos T a los antígenos de la amiba se encuentra suprimida por un factor supresor sérico secretado por el parásito. Así mismo, se ha encontrado una disminución en el número de linfocitos T de ayuda (CD4), y un incremento en linfocitos T citotóxicos (CD8) (Salata y col., 1990).

En general, la mayoría de los estudios realizados en la amibiasis experimental consideran que la inmunidad celular participa en la destrucción del tejido, facilitando la diseminación del parásito y progresión de las lesiones. Sin embargo, la inmunosupresión en modelos animales y humanos aparentemente puede resultar en la diseminación o incremento de las lesiones ocasionadas por la amiba. En conjunto, ambos tipos de observaciones (protección e inducción) ponen en controversia el papel de la respuesta celular en la amibiasis invasora

2.2 Inmunidad humoral

Durante la amibiasis la inmunidad humoral se activa en respuesta a componentes estructurales y productos metabólicos de la amiba (Meerovitch y Chadee, 1989). La infección induce la aparición primaria de una respuesta local de anticuerpos IgA, aunque se desconoce el tiempo en que se desarrolla. Estos copro-anticuerpos se han detectado en 80 % de los pacientes con amibiasis intestinal (Sharman y col., 1978).

Una primera determinación de copro-anticuerpos por hemaglutinación indirecta (IHA) en niños con amibiasis intestinal mostró resultados similares (80%); sin embargo, tres semanas más tarde, sólo 55 % de los pacientes se mantenían positivos, mientras que los anticuerpos séricos detectados por el mismo método se incrementaron significativamente (Martínez-Cairo y col., 1979). La producción de anticuerpos específicos anti-amiba, secretores y

sistémicos, se observan durante el desarrollo de la amibiasis invasora (Salata, 1988). Se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgA secretores anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas intracecalmente (Acosta y cols., 1983), en secreciones de íleon, colon y materia fecal de pacientes con AHA (O'Shea-Alvarez y cols., 1985) así como en calostro y saliva humana (Choudhuri y cols., 1991; Carrero y cols., 1994).

En estudios seroepidemiológicos, entre el 80 y el 100 % de los pacientes con amibiasis invasora desarrollaron altos títulos de anticuerpos IgG anti-amiba en suero (Patterson y col., 1980) a partir del 7º día de la enfermedad y estos pueden persistir hasta por 10 años (Arellano y Ortíz-Ortíz, 1983; Ravdin y col., 1990).

Diversos experimentos han demostrado que los anticuerpos purificados ó suero inmune inactivado por el calor actúan sobre *E. histolytica* inhibiendo su crecimiento (de la Torre y col., 1973), su capacidad eritrofagocitaria (Shaffer y col., 1956) ó neutralizando su virulencia (Sepúlveda y col., 1974).

El sistema del complemento es otro factor humoral involucrado en el mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos. Reed y cols., (1983) observó que el suero de controles sanos y el de pacientes infectados (con altos títulos de anticuerpos anti-*E. histolytica*) lisaron a los trofozoítos a través de la activación de la vía clásica y alterna del complemento. Sin embargo, las cepas virulentas aisladas de pacientes con AHA o de lesiones colónicas fueron resistentes a este tipo de lisis (Reed y col., 1983 ; Braga y col., 1992). Por otro lado, existen evidencias de que la lectina de superficie de *E. histolytica* con afinidad a galactosa, involucrada en la adherencia a células epiteliales y mucosa colónica humana, inhibe la unión del complejo de ataque en la membrana (Braga y col., 1992). La amiba es capaz de redistribuir en su superficie anticuerpos, bacterias, lectinas y proteínas del complemento unidos a ella, en un fenómeno conocido como la formación de casquetes polares (capping); estos casquetes polares son desprendidos por la amiba sin causarle a está algún daño (Pinto da Silva y col., 1975; Calderon y col., 1980; Reed y Gigli, 1990).

3. Efecto de Ciclosporina A, Tacrolimus y PSC-833 sobre parásitos.

3.1 Ciclosporina A

La Ciclosporina A (CsA) es un péptido cíclico de 11 aminoácidos extraído del hongo *Tolypocladium inflatum*. Sus propiedades inmunosupresoras fueron descritas por primera vez en 1978 (Borel y col., 1989), y actualmente es utilizado en el tratamiento y control de

varias enfermedades autoinmunes, así como en la prevención del rechazo de transplantes de órganos y tejidos (Handschumacher y col., 1984).

El efecto inmunosupresor de la CsA sobre los linfocitos T atrajo la atención de los investigadores interesados en el papel que tenían las células T sobre el control de las infecciones por parásitos protozoarios. En 1981, Thommen-Scott reportó por primera vez su efecto anti-parasitario. En este experimento la administración oral de 25 mg/kg de CsA a ratones infectados con *Plasmodium berguei* y *P. chabaudi* redujo la parasitemia en lugar de aumentarla, contrario a lo que se esperaba, y prolongó significativamente el tiempo de vida de los ratones (Thommen-Scott y col., 1981). Esta propiedad anti-parasitaria fue confirmada en experimentos *in vivo* para *P. yoelii* y *P. falciparum* (Nickell y col., 1982; Cole y col., 1983; Somasundaram y col., 1989). Años más tarde, la actividad antiparasitaria de la CsA fue corroborada en experimentos *in vitro* para *P. yoelii*, *P. falciparum* y *P. vivax* (Bell y col., 1994; Kocken y col., 1996; Dobson y col., 1999).

La actividad anti-parasitaria de CsA también ha sido probada *in vivo* e *in vitro* en helmintos, céstodos y nemátodos; la administración intramuscular de 25 mg/kg de CsA a ratones infectados con *Schistosoma mansoni* redujo el número de parásitos e incrementó el tiempo de vida de los ratones (Bueding et al., 1981), mientras que *in vitro*, el efecto de CsA fue letal para el parásito (Pons y col., 1988). En un caso similar, el de *Hymenolepis microstata*, la administración subcutánea de CsA a ratones infectados inhibió el establecimiento del parásito (Chapell y col., 1989), mientras que la exposición *in vitro* a CsA causó severos daños en el tegumento e inhibió el crecimiento del parásito (Wastling y col., 1992). CsA también redujo drásticamente el número de filarias en ratones infectados con *Brugia pahangi* (Vickery y Nyar, 1987). A la fecha, el efecto antiparasitario de la CsA se ha documentado *in vitro* e *in vivo* contra casi todos los grupos taxonómicos ensayados (Tabla 1). Sin embargo y debido a su efecto supresor sobre las células T, en algunos grupos de parásitos la CsA exacerba la infección *in vivo*. Tal es el caso de las infecciones por *Tripanosoma* y *Giardia*, y en algunas ocasiones en *Toxoplasma* y *Leishmania*, en estos dos últimos con un efecto variable (Chappell y col., 1992). Los resultados de la administración de la droga *in vivo* varían dependiendo de factores como la sincronización del tratamiento con respecto a la infección, la ruta de administración del fármaco, la dosis y el número de tratamientos aplicados. En parasitología, la droga ha sido empleada exclusivamente en

experimentos de investigación, y aunque CsA presenta propiedades antiparasitarias, el uso clínico para el control de infecciones parasitarias en animales y humanos se descarta debido a sus efectos altamente tóxicos e inmunosupresores.

Tabla 1. Grupos taxonómicos ensayados con CsA (Chapell y cols., 1993)

Parásitos susceptibles a CsA	
<p>PROTOZOA</p> <p>Haemosporina <i>Plasmodium berghei</i> <i>P. yoelii</i> <i>P. chabaudi</i> <i>P. falciparum</i></p> <p>Trypanosomatina <i>Trypanosoma brucei brucei</i> <i>Leishmania major</i> <i>L. tropica</i></p> <p>Eimeriina <i>Eimeria tenella</i> <i>E. vermiformis</i> <i>E. mitis</i> <i>Toxoplasma gondii</i></p>	<p>HELMINTOS</p> <p>Nematoda <i>Trichinella spirallis</i> <i>Litomosoides carini</i> <i>Acanthocheilonema vitae</i></p> <p>Trematoda <i>Paragonimus miyazakii</i> <i>Fasciola hepática</i> <i>Schistosoma mansoni</i></p> <p>Cestoda <i>Hymenolepis microstata</i></p>

3.2 Tacrolimus

Tacrolimus (FK506 ó Prograf) es un macrólido insoluble en agua con efectos inmunosupresores, producido por *Streptomyces tsukubaensis* (Kino y col., 1987). Actualmente se produce para administración oral e intravenosa en la profilaxis del rechazo de órganos, en pacientes que reciben un riñón alogénico o en trasplantes de hígado. También se produce un aceite de uso tópico, a partir de las cápsulas o de la solución intravenosa, para tratamiento de enfermedades cutáneas (Zabawski y col., 2000).

FK506 ejerce su efecto inmunosupresor inhibiendo la activación de los linfocitos T, de forma similar a la ciclosporina A, aunque los dos fármacos son estructuralmente diferentes (Manez y col., 1995; Thomson y col., 1995; Peters y col., 1993). FK506 se une a un tipo de inmunofilinas en el citoplasma de los linfocitos, llamadas proteínas de unión a FK506

(FKBP), de las cuales, FKBP-12 es el blanco más importante para la actividad inmunosupresora (Morris y col., 1996).

La transcripción de genes de interleucina-2 (IL-2) para la activación de los linfocitos T y otras citocinas promotoras del crecimiento se inhiben cuando el complejo inmunofilina-fármaco se une a calcineurina, interrumpiendo de esta forma, las vías de transducción de señales (Peters y col., 1993; Morris y col., 1996). Se ha reportado que FK506 es 10 a 100 veces más potente que CsA para inhibir la transcripción de genes como el de IL-2, el del factor de necrosis tumoral (TNF) y de otras citocinas (Spencer y col., 1997). Estas citocinas, que son factores importantes de la inmunidad celular asociada con linfocitos Th1, se suprimen en mayor grado por FK506 que citocinas como IL-4, la cual se asocia con los linfocitos Th2 y con la inmunidad humoral (Nagai y cols., 1997).

Se ha reportado que FK506 también ejerce su efecto inmunosupresor en otro tipo de células. En macrófagos, FK506 bloquea la activación transcripcional de genes de diferentes citocinas, como TNF- α e IL-6, y en células cebadas bloquea la degranulación así como la transcripción de genes de citocinas como IL-3 e IL-5 (Stuart y cols., 1992). En células aisladas de tejido humano, FK506 redujo la secreción de histamina de mastocitos de una forma dependiente de la concentración. También se ha demostrado un descenso de la migración de neutrófilos y de la producción de radicales libres en tejidos isquémicos de animales tratados con FK506 (Zabawski y cols., 2000).

Por otro lado, diversos experimentos *in vitro* han demostrado que FK506 presenta actividad antiparasitaria. En *P. falciparum* inhibió su crecimiento *in vitro* (Bell y col., 1994), en *Trypanosoma cruzi* redujo de manera importante su infectividad *in vitro* (Moro y col., 1995), mientras que la actividad de rotamasa de las inmunofilinas FKBP de *T. cruzi* y *Brugia malayi* fueron inhibidas a concentraciones nanomolares de FK506, entre 1500 y 1750 nM respectivamente (Moro y col., 1995; Ma D, 1999). El mismo efecto inhibitorio se ha reportado sobre actividad de CN de *Leishmania donovani* (Banerjee y col., 1999). Por el contrario, experimentos realizados por Khattab y col (1999) mostraron que FK506 no ejerce efecto inhibitorio sobre la actividad de CN de *Schistosoma mansoni*, sugiriendo que los niveles de expresión de FKBP son escasos en este parásito ó que el complejo FK506-FKBP no inhibe su actividad de CN.

3.3 PSC-833

Es un análogo de CsA ([3'-keto-Bmt1]-Val2]-cyclosporin), no inmunosupresor ni nefrotóxico, también conocido como Valspodar o Amdray. PSC-833 se une con alta afinidad a las glicoproteínas P (Pgp) y es un inhibidor no competitivo pobremente transportado por esta bomba de eflujo (Archinal-Mattheis y col., 1995; Sikic, 1997). Se ha reportado que es 10 a 30 veces mas potente que CsA en la inhibición de la expulsión de drogas citotóxicas en células resistentes, incrementando así, la acumulación de drogas en el interior celular (Bell y cols., 1994). PSC-833 es capaz de revertir el fenotipo de Resistencia a Múltiples Drogas (MDR) que generalmente desarrollan las células cancerígenas al tratamiento farmacológico debido a la sobre expresión de Pgp's actuando como efectivos quimio-sensibilizadores (Foxwell y col., 1989). PSC-833 se produce para la co-administración oral o intravenosa con drogas anti-cancerígenas, y actualmente se encuentra en fase de experimentación avanzada en el tratamiento de diferentes enfermedades cancerígenas como el carcinoma de ovario (Fracasso y col., 2001) y leucemia aguda (Gruber y col., 2003), entre otras.

En el caso de parásitos, PSC-833 mostró un efecto anti-malarial 10 veces más potente que el de la CsA (Bell y col.,1994) e inhibió la actividad de las Pgp's de *Cryptosporidium parvum* y *T. gondii*, bloqueando la eliminación de sustancias tóxicas producto del metabolismo así como la incorporación de nutrientes críticos, lo que resultó en la muerte de los parásitos (Perkins et al., 1998; Silverman et al.,1997). Este efecto lo han atribuido en ambos casos a un posible bloqueo de las Pgp's de los parásitos, ya que ha diferencia de la CsA, PSC-833 no se une a las ciclofilinas y por lo tanto no tiene capacidad inmunosupresora (Archinal-Mattheis y cols., 1995).

Además de PSC-833 se han reportado otros análogos con actividad antiparasitaria como: SDZ 033-243, SDZ 215-918, SDZ 216-070 y SDZ 217-383.

3.4. Efecto de la CsA y PSC-833 sobre *E. histolytica*.

Recientemente nuestro grupo de investigación describió la primera ciclofilina (CyP) de *E. histolytica* (Ostoa-Saloma y col., 200). En este contexto la importancia de esta proteína recae en el hecho de que en algunos grupos de parásitos donde la CsA ejerce un efecto, se demostró que la CyP es el blanco intracelular de la droga inmunosupresora (Bell y col.,

1994; Clipstone y col., 1994; Dobson y col., 1999; Khattab y col., 1999). Sin embargo, no se conocía el efecto de la CsA sobre la amiba, por lo que nuestro grupo se avocó a determinarlo.

El tratamiento de cultivos de trofozoítos (5×10^4 /ml) de la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica* con concentraciones de CsA entre 0.001 y 50 $\mu\text{g/ml}$ mostró una inhibición en la proliferación dosis-dependiente a las 72 h de exposición al fármaco. Los resultados mostraron un 50% de Inhibición (IC_{50}) de la proliferación con una dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ y un efecto letal a dosis $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ (Carrero y cols., 2000).

En otra serie de experimentos se evaluó si CsA afectaba la proliferación de las amibas por efecto sobre sus Pgp's. Se llevaron a cabo ensayos de proliferación de la cepa HM1:IMSS y de una clona resistente al antibiótico emetina denominada C2 (MDR por sobre-expresión de Pgp) en presencia del análogo no-inmunosupresor de CsA PSC-833, que como se indicó anteriormente inhibe a las Pgp's pero no afecta la vía de la CN. A diferencia de CsA, PSC-833 no mostró efecto sobre trofozoítos de la cepa HM1:IMSS. En cuanto a la clona C2, CsA inhibió su proliferación en presencia y ausencia de emetina, mientras que PSC-833 sólo afectó su proliferación y viabilidad cuando los trofozoítos fueron crecidos en presencia de 40 μM de emetina, sugiriendo una interferencia de la actividad Pgp. Esta sugerencia fue confirmada en experimentos de eflujo de rodamina a partir de trofozoítos tratados, que se sabe es dependiente de la actividad de sus Pgp's. PSC-833, así como la CsA, inhibieron el eflujo de rodamina indicando que ambas drogas interactúan con Pgp, afectando su actividad de bombeo (Carrero y cols., 2004).

Estos resultados mostraron que la actividad anti-amibiana de la CsA podría estar involucrada con un mecanismo de acción que no necesariamente implica a las Pgp. Así que, parecería que este efecto anti-amibiano está asociado a la capacidad inmunosupresora de la CsA y por lo tanto a través de la vía por la cual actúa en los linfocitos T, la de la CN. Esta vía es precisamente la que se evaluó en este trabajo de tesis.

4. Vía mediada por la inhibición de la CN.

Debido a que se postula que la CN de *E. histolytica* podría estar regulada por inmunosupresores, se describirán sus respectivos receptores.

4.1 Inmunofilinas.

Las inmunofilinas son una familia de proteínas altamente conservadas definidas como receptores de drogas inmunosupresoras como la CsA, FK506 y Rapamicina. Los receptores de CsA son conocidos como ciclofilinas (CyP's) mientras que las proteínas de unión a FK506 y Rapamicina reciben el nombre de FKBP's. Ambos grupos de proteínas pertenecen a la familia de las inmunofilinas con actividad de peptidil prolil *cis-trans* isomerasa (rotamasa) participado en varios procesos celulares incluyendo el plegamiento de proteínas (He y col., 2004), el tráfico y maduración de proteínas (Shield y col., 1989; Ferreira y col., 1996), apoptosis (Lin y Lechleiter, 2002), señalización de receptores (Brazin y col., 2002), y procesamiento de RNA (Krzywicka y col., 2002). Las inmunofilinas se han identificado en varios compartimentos celulares como el retículo endoplásmico, núcleo, mitocondrias y citoplasma; así mismo, se han encontrado en una gran variedad de organismos incluyendo mamíferos, bacterias, hongos, plantas (He y col., 2004) y en algunos parásitos como *T. gondii*, *P. falciparum*, *S. mansoni*, *L. major*, *L. donovani*, *T. cruzi* y *B. Malayi*, entre otros. La función específica que desempeñan en estos organismos no se conoce completamente.

La primera ciclofilina se describió en timocitos de ternera; es una proteína citoplasmática de 18 kDa con un punto isoelectrico alcalino mayor a 9 (Handschumacher y col., 1984). Posteriormente se encontró su equivalente en humanos con un alto grado de identidad (Harding y col., 1986). Poco tiempo después, se descubrió una proteína de unión a FK506 (FKBP) en timocitos de ternera así como en células de bazo y células T de humanos. La inmunofilina FKBP de humano tiene una masa de 12 kDa y un punto isoelectrico de 8.9 (Harding y cols., 1989). Como se mencionó anteriormente, FKBP al igual que la ciclofilina presentan actividad de rotamasa, la cual es fuertemente inhibida por sus respectivos ligandos inmunosupresores. FK506 inhibe la actividad de rotamasa de FKBP, pero no de ciclofilina, así como, CsA no inhibe la actividad de rotamasa de FKBP (Schreiber, 1991). El estudio de las inmunofilinas como blanco de la CsA y FK506 ha tomado gran importancia en algunos parásitos debido principalmente al hallazgo antes mencionado sobre

la actividad antiparasitaria de ambas drogas inmunosupresoras (Tomen-Scott y col., 1981; Bell y cols., 1994) y a estudios subsecuentes en otros parásitos tanto protozoarios como helmintos (Carrero y col., 2000; Chappel y col.,1994) . Recientemente nuestro grupo de investigación reportó el primer gen identificado en *E. histolytica* que codifica para una proteína tipo ciclofilina (EhCyP) con una identidad del 68-72% con otras CyP's ya reportadas, una masa molecular de 18 kDa y un punto isoelectrico de 8.8 pH (Ostoa y col., 2000). La identificación de este gen en *E. histolytica* cobra importancia por su probable relación con el efecto anti-amibiano de la CsA, ya que podría ser uno de los blancos intracelulares a través del cual CsA pudiera estar ejerciendo su efecto anti-amibiano.

5. Calcineurina (CN).

Calcineurina (CN) es una proteína fosfatasa serina/treonina dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, compuesta de una subunidad catalítica (CnA) de 58 kDa, la cual contiene el sitio activo, un dominio de unión a la subunidad B (CnB), el dominio de unión a calmodulina (CaM) y un domino auto-inhibitorio (AI) (Fig. 4), y una sub unidad regulatoria (CnB) de 19 kDa, la cual presenta cuatro dominios de unión a Ca^{2+} (Rusnak y Mertz, 2000). CN participa en vías de transducción de señales dependientes de Ca^{2+} , involucradas en funciones críticas particularmente en neuronas, células del músculo esquelético y cardiaco, así como en linfocitos T (Feske y col., 2003), la cual es la mejor función caracterizada hasta el momento. La activación de linfocitos T resulta en un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la activación de proteínas que responden a calcio, entre ellas la calmodulina. Una vez que la calmodulina es activada, se une y activa la función defosforilante de CN, lo que resulta en la subsecuente defosforilación del NFAT. La defosforilación del NFAT es necesaria para permitir su translocación nuclear, promoviendo así la transcripción del gen de IL-2 implicado en la proliferación celular. Además CN/NFAT regulan la transcripción de genes que codifican para una gran variedad de citocinas como IL-4, IFN- γ , GMCSF, IL-3, IL-13 y TNF- α (Baksh y Burakoff, 2000); sin embargo existen otros eventos biológicos que involucran a CN directamente (Tabla. 2).



Fig. 4 Estructura de los dominios de la sub unidad catalítica de CN (CnA). CNB, dominio de unión a la subunidad reguladora CnB; CaM, dominio de unión a calmodulina; AI, dominio autoinhibitorio (Saitoh y cols., 1991).

Tabla 2. Distribución y función de calcineurina en diferentes tejidos de mamíferos (Rusnak y cols., 2003)

Órgano o sistema	Función
Hueso	Reabsorción de hueso osteoclasto
Cerebro	Formación del péptido- β amiloide Defosforilación de DARPP-32 Defosforilación de la oxido nitro sintasa Regulación de genes Control hormonal Isquemia Regulación de canales iónicos
Corazón	Hipertrofia cardiaca
Sistema hematopoyetico	Selección tímica
Riñón	Regulación de <i>c-myb</i> dependiente de eritropoyetina Hipertensión inducida por inmunosupresores Estimulación de la actividad ATPasa-Na ⁺ -K ⁺ en tubulos renales Señalización de receptores adrenérgicos, dopamanérgicos y angiotensina Señalización de glucocorticoides y mineralocorticoides
Hígado	Fosforilación de proteínas
Linfocitos	Activación de linfocitos T y señalización de citocinas Quimiocinas de neutrófilos Degranulación de linfocitos Apoptosis y transcripción del gen FasL Función efectora de macrófagos
Pancreas	Secresión de amilasa en células acinar Secresión de insulina en células β
Pituitaria	Regulación de adenilil ciclasa Secresión de hormonas
Placenta	Defosforilación del receptor del factor de crecimiento epidermal
Músculo esquelético	Hipertrofia del músculo esquelético
Músculo liso	Inhibición de los canales de Ca ²⁺ tipo L
Otras funciones	Motilidad espermática Reciclamiento de integrinas, interacción Integrina/fibronectina Defosforilación de Elk-1

CN fue identificada por primera vez en tejido neuronal bovino (Wang y Desai, 1976; Watterson y Vanaman, 1976), de donde se origino su nombre; sin embargo se ha demostrado su presencia en una amplia variedad de tejidos y en múltiples organismos, incluyendo hongos, levaduras, bacterias, plantas y en parásitos (Rusnak y Mertz, 2000).

Recientemente la actividad de CN fue identificada en extracto crudo de *S. mansoni*. En este reporte, la actividad de fosfatasa de CN fue inhibida por CsA *in vitro*, con una IC₅₀ de 0.3 nM (Khattab y cols.,1999). El mismo efecto se observó en el caso de la actividad de CN detectada en extracto crudo *P. falciparum* (Dobson y cols.,1999). En contraste, la actividad de CN detectada en *L. major* y *L. donovani* no fue inhibida por CsA a concentraciones tan altas como 5.2 nM (Rascher y cols., 1989; Banerjee y cols.,1999). Un fenómeno similar fue reportado en *H. microstata* e *H. diminuta*, ya que la CN detectada en ambos parásitos tampoco fue inhibida por la CsA (Roberts y cols., 1997). Esto sugiere, un posible mecanismo por el cual estos organismos son resistentes a CsA. Una hipótesis que podría explicar este fenómeno es que las ciclofilinas de los parásitos son estructuralmente diferentes de las ciclofilinas de los humanos, ya que los residuos de las ciclofilinas que rodean los sitios de unión a CsA y que interactúan con la calcineurina, no son conservados en las ciclofilinas de los parásitos (Rusnak y Mertz, 2000).

La CN pertenece a la familia de las fosfoserinas fosfatasas P (PPP) que incluyen a PP1, PP2A, y PP2C; estas fosfatasas son esenciales en una gran variedad de vías de señalización dependientes de Ca²⁺ en células eucariontes (Cohen y cols., 1989). PP1 y PP2A son inhibidas por una toxina llamada ácido okadaico derivada de una esponja marina, CN (PP2B) es específicamente inhibida por las drogas inmunosupresoras CsA y FK506 en presencia de sus receptores CYP y FKBP respectivamente (Fig. 5), mientras que PP2C es dependiente de Mg²⁺ y particularmente resistente a estos inhibidores (Rusnak y Mertz, 2000).

La CN es fosforilada por protein cinasa C (PKC), casein cinasa I (CKI) y casein cinasa II (CKII) *in vitro* (Rusnak y Mertz, 2000). Las propiedades cinéticas de la forma fosforilada y la no fosforilada son similares (Hashimoto y Soderling, 1989), calmodulina se une sólo a la CN fosforilada induciendo su actividad de fosfatasa *in vitro*. Esto sugiere, que la fosforilación podría representar un medio de regulación de la actividad de fosfatasa de la CN *in vivo* (Rusnak y Mertz, 2000).

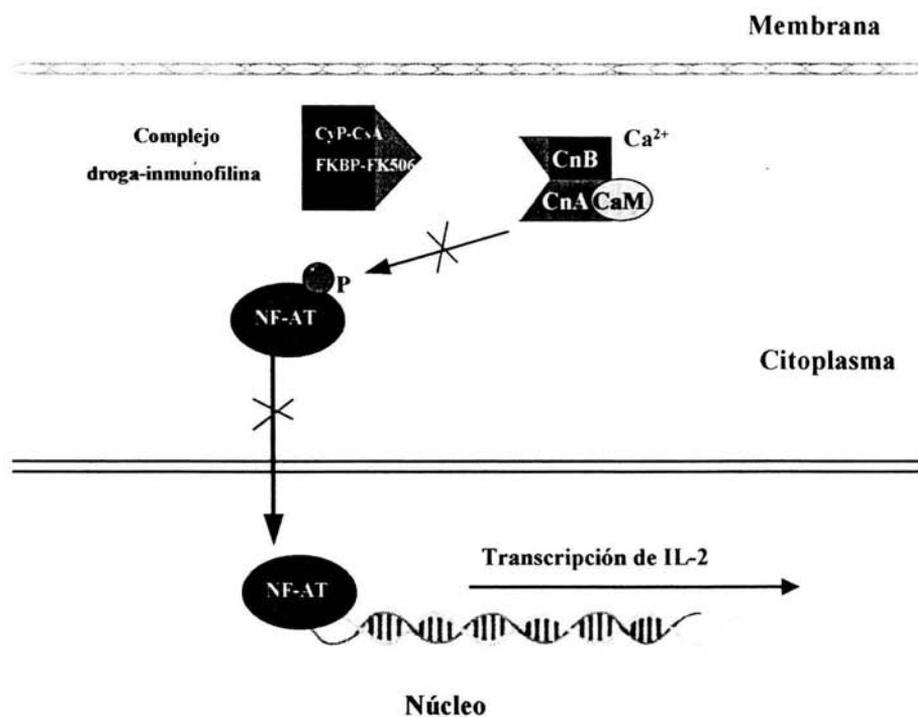


Fig. 5 Vía de la CN. El complejo droga-immunofilina (CsA-CyP o FKBP-FK506) bloquea a CN afectando la transcripción de genes involucrados en la replicación de células T.

II. JUSTIFICACIÓN

La CsA inhibe la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* a través de un mecanismo independiente de glicoproteínas P (Pgp). Con la finalidad de discernir el mecanismo de acción de CsA, en el presente trabajo de tesis se exploró la otra posible vía de acción descrita para esta droga, la cual suprime al sistema inmune, inhibiendo la proliferación de los linfocitos T. En algunos casos, se ha demostrado que esta es la vía por la cual CsA ejerce su potente efecto anti-parasitario.

Por otro lado, basados en el efecto protector de CsA sobre el desarrollo de AHA previamente observado, en este trabajo de tesis se trató de determinar la participación de la respuesta inmune celular en su establecimiento y desarrollo.

III. OBJETIVO

Determinar si el efecto inhibitorio de CsA sobre la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* es mediado a través de la inhibición de una calcineurina en este parásito y si la protección contra el AHA en hámsteres es debido a la inmunosupresión.

Objetivos específicos.

- Identificar y cuantificar actividad de fosfatasas totales, así como de calcineurina (CN) en extracto amibiano.
- Evaluar el efecto de los inmunosupresores CsA y FK506, así como de PSC-833 (análogo de CsA no inmunosupresor), sobre la actividad de CN de *E. histolytica*.
- Identificar y caracterizar el gen de la subunidad catalítica de CN (CnA) de *E. histolytica*.
- Determinar el efecto *in vitro* de FK506 y Rapamicina sobre la proliferación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM-1:IMSS.
- Evaluar el efecto inmunosupresor de FK506 y Rapamicina sobre hámsteres..
- Evaluar el efecto del fármaco inmunosupresor sin actividad amebicida sobre el establecimiento del AHA en hámsteres.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo axénico de *E. histolytica*

Trofozoitos axénicos de *E. histolytica* (7×10^5) de la cepa HM-1: IMSS se cultivaron en 50 ml de medio TYI-S-33 estéril suplementado con 15% de suero bovino adulto, 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond, a 37° C por 72 h. Una vez transcurrido este tiempo los trofozoitos se cosecharon por enfriamiento en hielo durante 5 min y centrifugación a 2200 rpm durante 5 min. La pastilla se lavó dos veces en amortiguador de fosfatos PBS (15 mM Na_2PO_4 pH 7.2, 0.15 M NaCl) por centrifugación a 2200 rpm durante 5 min a 4°C.

2. Preparación de la fracción citosólica de trofozoítos.

Trofozoitos axénicos se cosecharon a las 72 h de cultivo por enfriamiento y centrifugación a 150 x g durante 7 min a 4°C. Las amibas se lavaron tres veces con amortiguador salino de tris TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.2) , se resuspendieron en TBS con 20 mM de Iodacetamida y 5mM de EDTA como inhibidores de proteasas y se lisaron por congelación/descongelación en nitrógeno líquido. Un sobrenadante de alta velocidad se obtuvo por centrifugación a 100,000 x g durante 45 min a 4°C. Se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford. Ambos extractos se guardaron a -20° C hasta su uso.

3. Ensayos de fosfatasas

Para la determinación de la actividad de fosfatasas de *E. histolytica* se utilizó un par de ensayos colorimétricos dependiendo del sustrato de la reacción. La determinación de la actividad de fosfatasas totales se realizó bajo las siguientes condiciones: 20 µg del extracto amibiano se agregaron a una mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 2mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 5mM MnCl_2 5mM, NiSO_4 , 1mM DTT y 0.1mg/ml BSA. La mezcla se pre-incubó a 37°C por 10 min y la reacción se inició al agregar 5 mM del sustrato para-nitro-fenil-fosfato (pNPP) en un volumen final de 100 µl; la reacción se continuó a 37°C durante 32 min y fue detenida en diferentes tubos a tiempos de 2, 4, 8, 16 y 32 min al agregar K_2HPO_4 al 65%. Finalmente la actividad enzimática se

determinó a una absorbancia de 405 nm en un espectrofotometro (Bio-tek instruments) . Todos los ensayos se repitieron tres veces cada uno por duplicado.

La actividad de fosfatasa de calcineurina (PP2B), de las otras fosfatasas (PP1, PP2A y PP2C), así como el efecto de las drogas inmunosupresoras CsA y FK506 sobre dicha actividad, se determinó con el “Calcineurin Cellular Activity Assay kit” siguiendo las instrucciones del fabricante (Calbiochem, Cat.No. 207007). La actividad correspondiente a los diferentes tipos de fosfatasas se determinó mediante el uso de inhibidores (Ácido okadaico y EGTA) y estimuladores particulares de la CN (calmodulina y Ca^{2+}). El ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones: el Buffer de reacción para las diferentes fosfatasas junto con el fosfopéptido RII se pre-incubó a 30°C por 10 min y la reacción se inició al agregar 5 µg del extracto citosólico en un volumen final de 50 µl; la reacción se continuó a 30°C por 30 min y fue detenida al agregar 100 µl de verde de malaquita el cual detecta el fosfato liberado. Finalmente, la actividad enzimática se determinó a una absorbancia de 605 nm en un espectrofotometro (Bio-tek instruments). Este kit ofrece la ventaja de ser un método colorimétrico (no emplea radioactividad) altamente sensible para detectar actividad de fosfatasas.

4. Búsqueda del gen de la subunidad catalítica (CnA)

Se realizó la búsqueda del gen de la sub unidad catalítica A (CnA) en la base de datos del genoma de la amiba en la pagina del “The Institute Genome Research (TIGR)” a través de un análisis de homología con la secuencia de CnA de *S. mansoni*.

5. Cinéticas de Crecimiento

Para registrar las curvas de proliferación, se cultivaron 1.5×10^4 trofozoítos /ml en medio de cultivo TYI-S-33 a 37°C en tubos de vidrio, en presencia de FK506 y Rapamicina. Ambas drogas se agregaron a partir de un stock concentrado; FK506 (Laboratorios Silag), fue preparada en PBS, mientras que Rapamicina (Novartis) en metanol. Las concentraciones finales de FK506 usadas fueron las siguientes: 0.1, 1, 10 y 100 µg/ml. Para Rapamicina fueron de 1, 10, 100 y 200 µg/ml. Las cinéticas de crecimiento se determinaron evaluando el número de trofozoitos viables cada 24 h hasta las 72 h con la

ayuda de una cámara de Neubauer y azul de tripano (tinción vital). Los ensayos se repitieron tres veces, cada uno por duplicado.

6. Tratamiento con las drogas Inmunosupresoras.

Hámsteres

Se determinó si FK506 y Rapamicina son capaces de inducir inmunosupresión sobre el hámster mediante ensayos de proliferación celular. Ambas drogas se administraron vía intra-peritoneal por separado a grupos de hámsteres hembras de 4-6 semanas de edad y de aproximadamente 60-80 g de peso, en dosis diarias de 2.5 mg/kg de FK506 en 300 μ l de solución salina y 2mg/kg de Rapamicina en 200 μ l. En ambos casos, el tratamiento fue de 9 días al cabo del cual los animales fueron sacrificados.

Ratas Wistar

Se administró 2mg/kg por día de Rapamicina vía intra-peritoneal a grupos de ratas Wistar machos de 6-8 semanas de edad y de aproximadamente 250 g de peso, durante 9 días al cabo del cual los animales fueron sacrificados.

7. Ensayos de proliferación celular

El día del sacrificio (día 9 post-tratamiento), se extrajo el bazo de los animales tratados así como de los controles bajo condiciones de esterilidad; se colocaron en medio RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal y los esplenocitos se obtuvieron por perfusión. Las células se concentraron por centrifugación, se resuspendieron en solución hemolizante durante 5 min a 4°C y se lavaron con medio RPMI. Los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI suplementado se contaron y se ajustaron para colocar 5×10^5 células/pozo en placas de 96 pozos. Los ensayos se realizaron por triplicado con un grupo de pozos a los cuales no se les añadió nada y un grupo que se estimularon con 1 μ g/pozo de Concanavalina A. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Al cabo de este tiempo, las células se pulsaron con timidina tritiada (1 μ Ci/pozo), se continuaron incubando durante 18 h y finalmente se cosecharon mediante un cosechador automático. La incorporación de timidina tritiada se determinó en un contador β de centelleo y los resultados de la proliferación celular se expresaron como cuentas por minuto (c.p.m.)

8. Tratamiento de hámsteres con FK506

FK506 se administró a grupos de 8 hámsteres hembras de 4-6 semanas y de aproximadamente 60-80 g de peso, vía intra-peritoneal en dosis diarias de 2.5 mg/kg de peso en 300 µl de solución salina. La administración de la droga se hizo dos días previos a la inoculación intra-portal de trofozoitos y se mantuvo siete días más. Transcurrido ese tiempo los animales fueron sacrificados y se extrajo el hígado, el cual fue revisado macroscópicamente y comparado con los órganos de animales control no infectados, animales no infectados pero tratados con la droga y animales infectados pero no tratados. Posteriormente, los hígados se fijaron en una solución de formaldehído al 10 % en PBS y se procesaron para la obtención de cortes histológicos. Los ensayos se repitieron 3 veces por separado.

9. Inducción del AHA

La inducción del absceso hepático amibiano en el modelo de hámster dorado *Mesocricetus auratus* se realizó mediante una laparotomía en hembras de 4-6 semanas de edad y de aproximadamente 60-80 g de peso.

Los animales fueron sedados con Anestésico (pentobarbital sódico) a dosis de 63 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, se rasuraron ventralmente, se hizo asepsia con alcohol y se realizó una incisión con la ayuda de un bisturí, primero sobre la piel y después sobre el tejido muscular. Una vez expuesto el hígado, se inyectaron directamente en la vena porta 5×10^5 trofozoitos axénicos de la cepa HM-1: IMSS resuspendidos en 200 µl de PBS estéril. Inmediatamente después y para evitar una hemorragia, se cubrió el sitio de la inyección con trocitos de Gelfoam, una esponja sintética y estéril que es absorbida por los tejidos del cuerpo. Finalmente, los tejidos se suturaron en dos planos con hilo de seda 4-0 (Vicryl) y el área se limpió con peróxido de hidrógeno al 0.5 % (Tustsumi y col., 1984)

10. Procesamiento del tejido hepático para el análisis histológico.

El tejido hepático fijado en formaldehído se procesa de la siguiente manera: se embebió en parafina, se realizaron cortes transversales de 5 µm con un microtomo y se elaboraron laminillas que se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE), una coloración mixta (ácido-base) mediante la cual las estructuras nucleares se tiñen de azul o púrpura oscuro y

prácticamente todas las estructuras citoplásmicas, las sustancias intercelulares y el tejido consecutivo, de rosa (Leeson y col., 1990). Las laminillas fueron analizadas bajo el microscopio óptico para determinar el grado de daño causado por los abscesos amibianos y el efecto de las drogas inmunosupresoras sobre el mismo. Por último, se tomaron fotografías de las áreas representativas de cada corte histológico.

V. RESULTADOS

1. Ensayos de fosfatasa

En este trabajo de tesis lo primero que se hizo fue determinar la actividad de fosfatasa en extracto amibiano. La actividad de fosfatasa total (PP1, PP2A, PP2B y PP2C) se detectó en el sobrenadante de alta velocidad de un extracto crudo de trofozoitos mediante un ensayo colorimétrico que utiliza como sustrato al pNPP. La actividad comenzó a detectarse a partir de los 8 min, incrementando ligeramente a los 16 min y marcadamente a los 32 min (Fig.6). Al agregar 1U de calmodulina a la mezcla de reacción la actividad total incrementó aproximadamente un 30% a los 32 min, comenzando a detectarse más temprano alrededor de los 4 min. Se intentó evaluar el efecto de las drogas sobre CN utilizando este método. Sin embargo, los resultados no fueron reproducibles e incluso la actividad incrementaba en lugar de inhibirla (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con reportes previos que indican que el sustrato pNPP no es el ideal para evaluar el efecto de drogas inmunosupresoras como FK506 y CsA sobre la actividad de CN (Guerini, 1997).

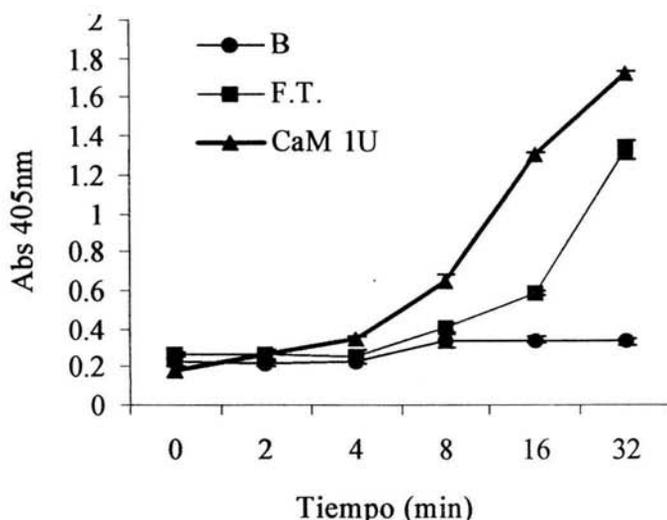


Fig 6. Actividad de fosfatasa total en extracto crudo amibiano utilizando pNPP como sustrato. Se observa el incremento de la actividad enzimática con 1U de calmodulina. B: fondo; F.T.: fosfatasa total; CaM: 1U de calmodulina

Por lo anterior, la actividad específica de CN (PP2B) y de las otras tres fosfatasa, así como el efecto de las drogas sobre la actividad de CN, se determinó utilizando el péptido fosforilado RII suplementado por un kit comercial conocido como “Kit Calcineurin Cellular Activity Assay”. La actividad de fosfatasa totales (PP1, PP2A, PP2B y PP2C) se determinó por la cantidad de fosfato liberado, en presencia de Ca^{2+} y CaM que fue de 2.53 nmol a los 32 min. Como se mencionó anteriormente, CN es la única fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y al ser removido por la adición de 0.5mM de EGTA la cantidad de fosfato liberado disminuyó a 1.54 nmol. Por lo tanto, la actividad de CN se estimó en 0.99 nmol, equivalente a aproximadamente el 39 % de la actividad total. Cuando 0.01 mM de ácido okadaico (A.O.), un potente inhibidor de las fosfatasa PP1 y PP2A, fue agregado a la mezcla de reacción, la cantidad de fosfato liberado fue de 1.35 nmol correspondiente a las fosfatasa PP2B y PP2C que se sabe son resistentes a esta toxina. Cuando ambos inhibidores, EGTA y A.O, fueron agregados al ensayo, la actividad de las fosfatasa PP1, PP2A y PP2B fue totalmente inhibida; la actividad restante liberó sólo 0.1 nmol de PO_4 correspondiente a la fosfatasa PP2C, la cual es dependiente de Mg^{2+} y particularmente resistente a estos inhibidores. La cantidad de fosfato liberado de 1.25 nmol cuantificado en el extracto amibiano en presencia de Ca^{2+} y A.O. es atribuido a la actividad de PP2B y PP2C (Fig. 7).

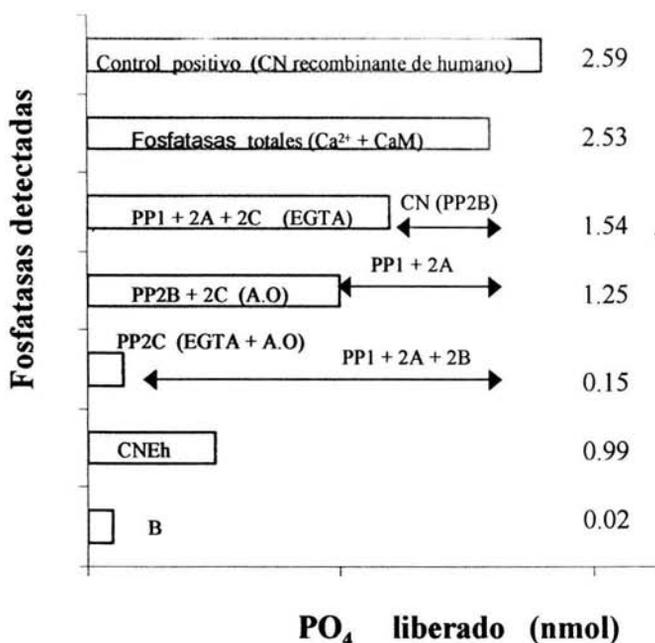


Fig. 7. Detección de la actividad de fosfatasa total y particularmente de calcineurina (CN) utilizando el péptido fosforilado RII en extracto amibiano obtenido por alta centrifugación. B, blanco; C, CN recombinante de humano (control positivo); F.T., fosfatasa total; A.O., Ácido okadaico; EGTA, quelante de Ca²⁺.

1.1 Inhibición de la actividad de CN por drogas inmunosupresoras.

CN es el blanco de acción de drogas inmunosupresoras como CsA y FK 506 (Guerini, 1997). Para probar la sugerencia de que la actividad de fosfatasa detectada previamente corresponde a CN, se evaluó el efecto de ambas drogas así como del no inmunosupresor PSC-833 sobre esta actividad. Cuando 1 nM de CsA y FK506 fue agregado a la mezcla de reacción, se observó una inhibición en la actividad en un 52 y 49 % correspondiente a 0.6 y 0.63 nmol de fosfato liberado respectivamente, mientras que la concentración de 100 nM presentó un efecto inhibitorio del 89 y 80 % correspondiente a 0.14 y 0.25 nmol de PO₄ liberado, respectivamente, con respecto al control (Fig 8). En contraste, PSC-833, por ser un análogo no inmunosupresor de CsA y por lo tanto no se une a CN, no mostró efecto alguno a ninguna de las concentraciones. Al analizar el efecto de ambas drogas inmunosupresoras sobre la actividad de CN se observó que el efecto inhibitorio de CsA fue ligeramente mayor que el de FK506 para ambas concentraciones (Fig 8), al menos en las

condiciones de los experimentos ensayados *in vitro*. Estos resultados en conjunto revelaron que la amiba posee una típica actividad de CN, sensible a drogas inmunosupresoras.

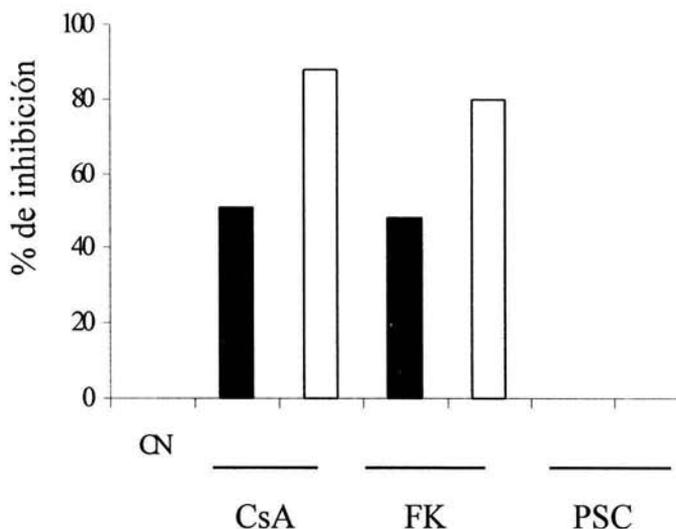


Fig. 8 Efecto de los inmunosupresores y del análogo no inmunosupresor, PSC-833, sobre la actividad de fosfatasa de CN, utilizando el fosfopeptido RII. El 0% de inhibición corresponde a la actividad de CN amibiana deducida en presencia de EGTA. □ : 1 nM; ■ : 100 nM

2. Secuencia codificadora de CnA de *E. histolytica*.

Se identificó el gen que codifica para una proteína tipo calcineurina A o subunidad catalítica de CN (EhCNA) en la base de datos de la amiba (The Institute of Genomic Research) a través de homología con la secuencia de CnA de *S. mansoni* (No. de acceso AJ276884). El análisis de la secuencia mostró un marco de lectura abierto de 1449 pares de bases codificante para una proteína de 483 amino ácidos (a.a), en la cual se identificó dominios característicos de otras CN's ya reportadas; un dominio catalítico (a.a. 55 al 309), un dominio de unión a la subunidad reguladora CnB (a.a. 314 al 357), un dominio de unión a calmodulina (a.a. 383 al 415) y dominio auto inhibitorio (a.a. 448 al 463) (Fig 9). El alineamiento (Fig 10) con otras CNA's reportadas mostró una identidad del 40 a 45 % y una similitud de a nivel de a.a.. La identidad que presenta la CN amibiana es igual a la que se observa en otras CN's, su secuencia es de 483 a.a. y el dominio auto inhibitorio es de 15

a.a. El análisis computacional de la secuencia predice una proteína con una masa molecular de 55,563 Da y un punto isoeléctrico de 6.87.

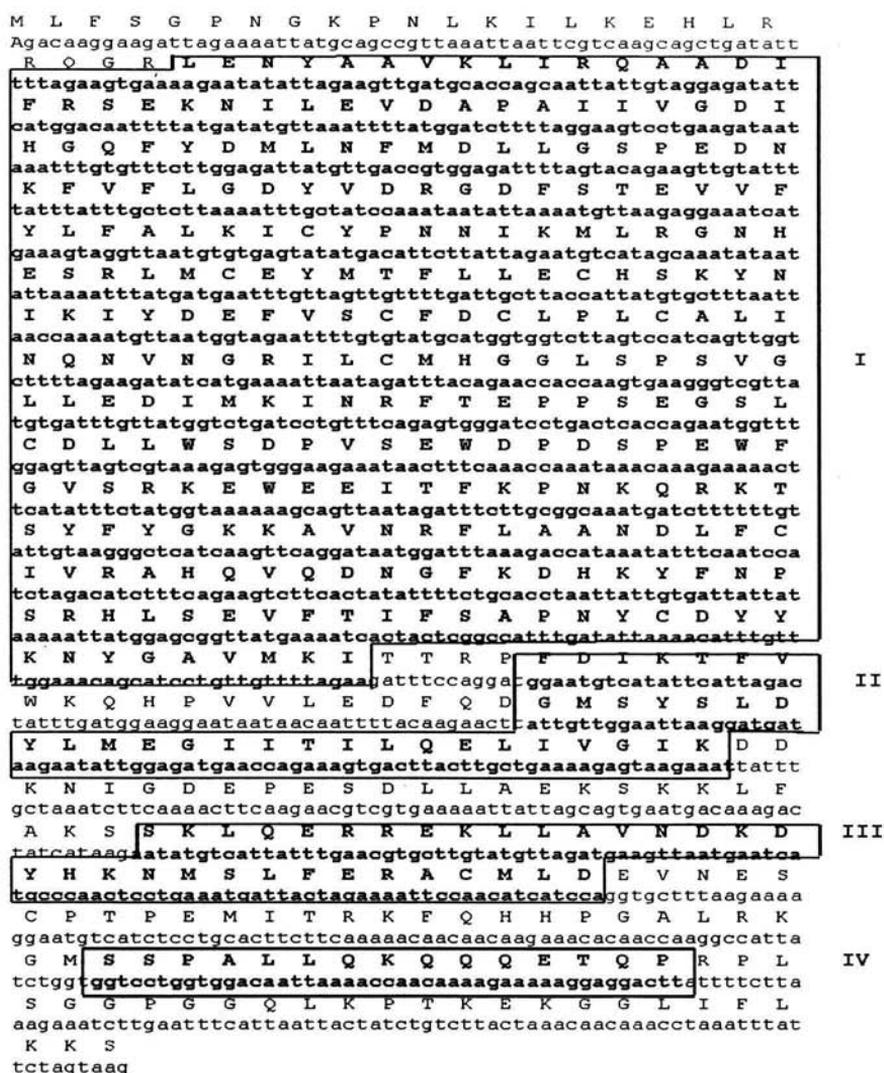


Fig. 9 Secuencia de amino ácidos y nucleótidos deducida de la subunidad catalítica de la calcineurina de *E. histolytica* (EhCNA). I, dominio catalítico; II, dominio de unión a CnB; III, dominio de unión a calmodulina y IV, dominio auto inhibitorio.

dominio catalítico con otras CN's; **I**, dominio catalítico; **II**, dominio de unión a CnB; **III**, dominio de unión a calmodulina y **IV**, dominio auto inhibitorio.

3. Efecto de FK 506 y Rapamicina sobre *E. histolytica*

Se determinó el efecto de FK506 y Rapamicina sobre la proliferación de trofozoitos de *E. histolytica* a concentraciones entre 0.1 y 100 $\mu\text{g/ml}$, para ambas drogas. Se monitoreó la cinética de crecimiento de los cultivos cada 24 h y hasta las 72 h. A diferencia de la CsA, FK506 sólo afectó ligeramente la proliferación de una manera dosis-dependiente pero no significativa estadísticamente (Fig 11). Por su parte, Rapamicina no mostró efecto inhibitorio sobre la proliferación de los trofozoitos a ninguna concentración ni ningún tiempo ensayado (Fig 12) con respecto a la curva de crecimiento de los cultivos no tratados.

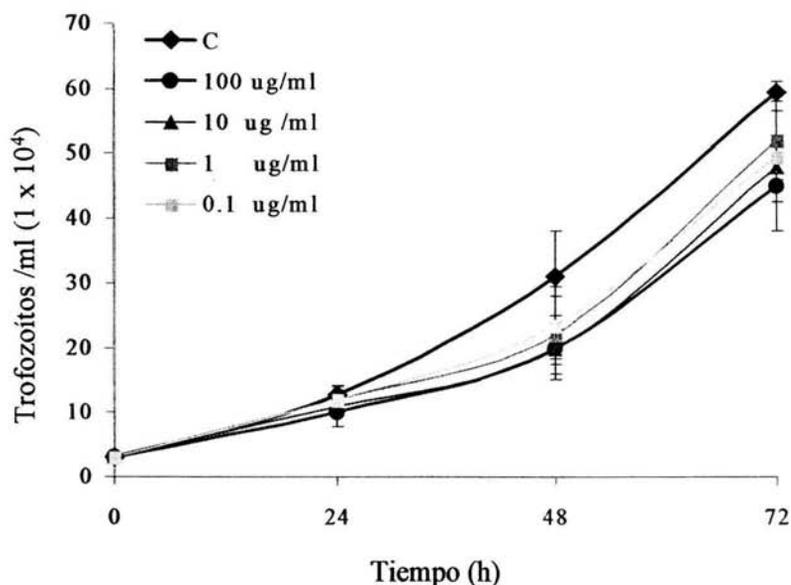


Fig 11. Cinética del efecto de FK506 (0.1 a 100 $\mu\text{g/ml}$) sobre la proliferación de trofozoitos de *E. histolytica*

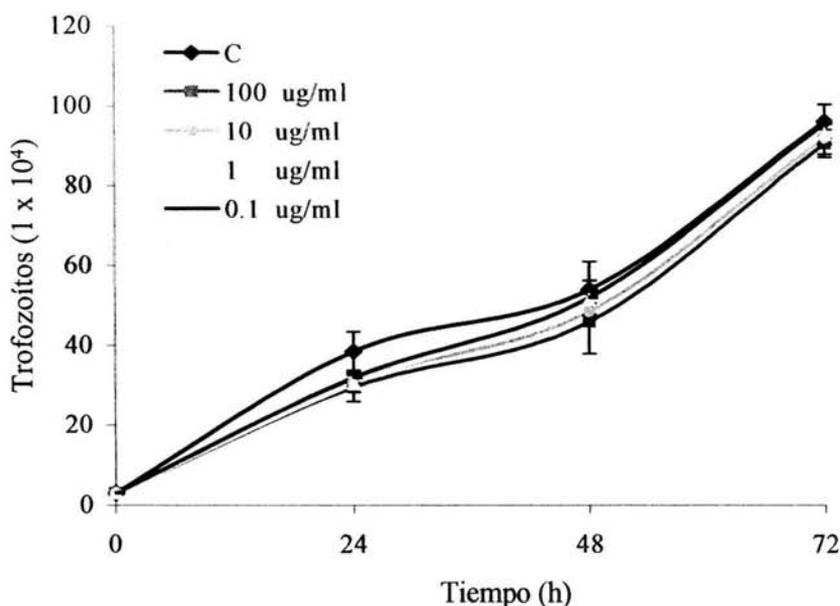


Fig.12 Cinética del efecto de Rapamicina (0.1-100 μ g/ml) sobre la proliferación de trofozoitos de *E. histolytica*

4. Efecto de FK 506 y Rapamicina sobre la proliferación de esplenocitos derivados de hámsteres y ratas Wistar.

Una vez sacrificados los animales post-tratamiento con FK506 o Rapamicina, se extrajeron los bazo de manera individual, se procesaron y se realizaron los ensayos de proliferación de esplenocitos ante el estímulo de ConA, un mitógeno específico de células T. Los resultados mostraron que los esplenocitos de los hámsteres tratados con 2.5 mg/kg de FK506, a diferencia de los controles no tratados (solución salina), mostraron una ausencia del 99 % en la proliferación de esplenocitos (Fig 13A). Interesantemente, los esplenocitos de los hámsteres tratados con 2 mg/kg de Rapamicina presentaron un promedio de proliferación 26.5×10^4 c.p.m, similar al de los animales no tratados que fue de 29×10^4 c.p.m. (Fig 13B), sugiriendo que Rapamicina no afectó la proliferación de esplenocitos derivados de hámsteres tratados con esta droga. En contraste, los esplenocitos de ratas Wistar tratadas con la misma concentración de Rapamicina (2 mg/kg) mostraron bajos niveles de proliferación, con un promedio de 4.5×10^4 c.p.m., a diferencia de los animales no tratados que presentaron un promedio de 20×10^4 c.p.m. (Fig 13C), indicando que la

ausencia del efecto de Rapamicina sobre la proliferación de esplenocitos de hámsteres, no es debido a inactividad de la droga, si no a un defecto en la respuesta de esplenocitos de hámsteres a la droga.

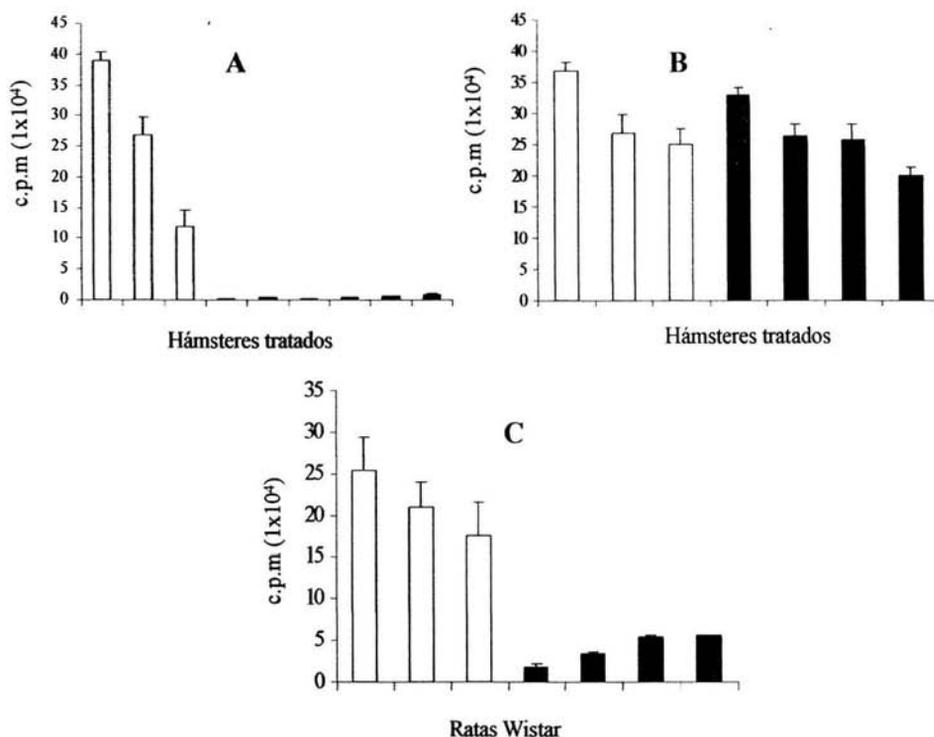


Fig 13 Efecto de la administración de FK506 y Rapamicina sobre la proliferación de esplenocitos derivados de hámsteres (A y B, respectivamente) y de Rapamicina sobre ratas Wistar (C), ante el estímulo de concanavalina A. □, animales no tratados.

5. Efecto de FK 506 sobre el desarrollo del AHA.

El análisis macroscópico de los hígados de los hámsteres en términos generales mostró que hubo reducción significativa del 80 % contra el desarrollo del AHA, determinada por la extensión de las lesiones hepáticas. Se tomaron en cuenta características macroscópicas de los hígados como: extensión del daño y peso. Los hígados de los animales no tratados e infectados desarrollaron hepatomegalia y lesión distribuida en todo el hígado. En contraste,

los hígados de los animales tratados con dosis diarias de 2.5 mg/kg de peso de FK506 e infectados con *E. histolytica*, mostraron una reducción en el número y tamaño de las lesiones, con ligera hepatomegalia comparada con los animales normales (sin amibas) (Tabla 3).

Tabla. 3 Resultado representativo de tres experimentos independientes. Características macroscópicas de los hígados de hámsteres tratados con FK506 e infectados con *E. histolytica*. +++, gran necrosis extensiva a todo el hígado; ++, necrosis moderada localizada en un lóbulo y -, sin daño

Grupos	n	Peso del hígado		Daño
		(g)	X \pm SD	
No tratados No infectados	1	2.7		-
	2	3.9		-
	3	4.1	3.7 \pm 0.61	-
	4	4.2		-
	5	4		-
No tratados Infectados	1	11.3		+++
	2	9.6		+++
	3	6.8		++
	4	8.9	8.5 \pm 1.4	+++
	5	7.6		+++
	6	8		+++
	7	9.2		+++
	8	7.3		+++
Infectados y tratados con 2.5mg/kg FK506	1	5.3		++
	2	5.7		++
	3	4.5		-
	4	5.6		++
	5	4.4	4.8 \pm 0.75	++
	6	5.4		++
	7	4		-
	8	3.8		-

Para analizar el nivel del daño se realizaron cortes histológicos de los hígados de hámsteres tratados y sin tratamiento. En la figura 14 se muestra un corte histológico del hígado de un hámster control tratado con FK 506 y no infectado con *E. histolytica*. Por comparación con cortes de hígado de hámsteres no tratados, se observa que el tejido no sufrió ninguna alteración por efecto de la administración diaria de FK 506. En el corte se distinguen los núcleos de los hepatocitos teñidos en púrpura y el resto de las estructuras celulares en rosa.

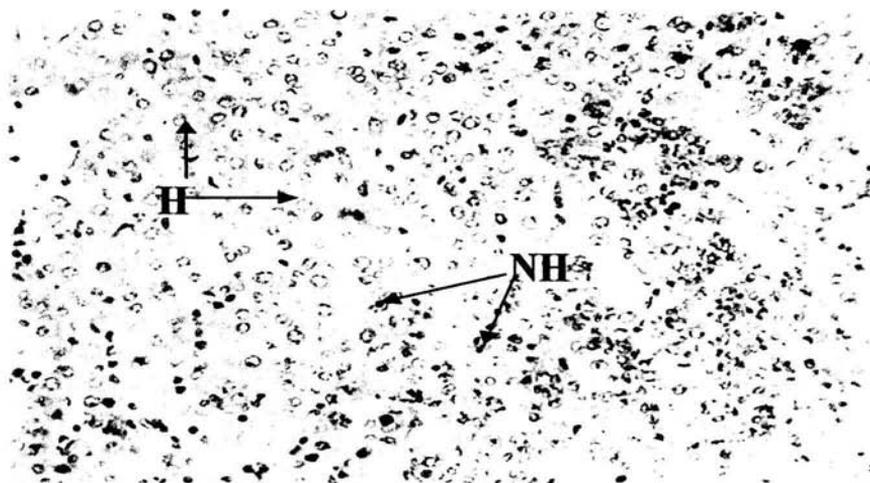


Fig. 14 Tejido hepático de un hámster tratado con 2.5 mg/kg de FK506 por espacio de 9 días y no infectado con *E. histolytica*. La estructura del tejido no es alterada por el tratamiento con FK506. **H:** Hepatocitos; **NH:** Núcleos de Hepatocitos. Aumento 10x. Tinción HE.

En las figuras 15 A y 16 se muestra el daño hepático siete días después de la inducción del AHA en hámsteres sin tratamiento con FK506. A nivel macroscópico (Fig 15 A) se observa hepatomegalia y la presencia de zonas blanquecinas en todo el hígado producto de la destrucción del tejido por la formación de los abscesos hepáticos. Mientras que a nivel microscópico (Fig. 16) se observó una clara pérdida de la estructura del tejido, lisis celular extensa y algunos trofozoítos con infiltrado inflamatorio, representado principalmente por linfocitos T, PMNs y algunas células mononucleares (Ravdin, 1988). Estas imágenes se pueden comparar con las Figuras 15 B y 17 en las que se muestran cortes histológicos representativos de los hígados de hámster infectados con *E. histolytica* y tratados

diariamente con 2.5 mg/kg de peso de FK506. Por otra parte, a nivel macroscópico los hígados de los animales tratados con FK506 presentaron características similares en peso y color a los hígados de animales no infectados ni tratados con la droga, con la excepción de diminutos puntos blancos extendidos por toda la superficie (Fig 15 B). El análisis microscópico mostró que estos puntos eran cúmulos de trofozoítos bien delimitados por tejido fibroso, con moderado infiltrado inflamatorio principalmente de PMNs y linfocitos T y con mínima destrucción tisular (Fig. 17). También se observó disminución en el número de macrófagos, probablemente debido a que FK506 también inhibe su proliferación mediante una vía independiente de CN (Lemster y cols., 1993). El resto del tejido hepático se mostró sin daño tisular a pesar de la presencia de trofozoítos.

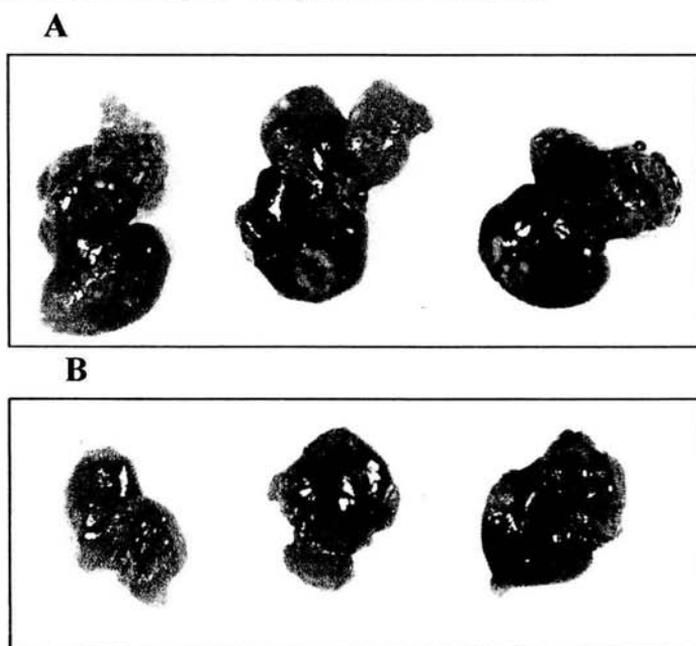


Fig. 15 A, Hígados representativos de hámsteres infectados con *E. histolytica*. **B,** Hígados representativos de hámsteres infectados con *E. histolytica* y tratados con 2.5 mg/kg de peso de FK506.

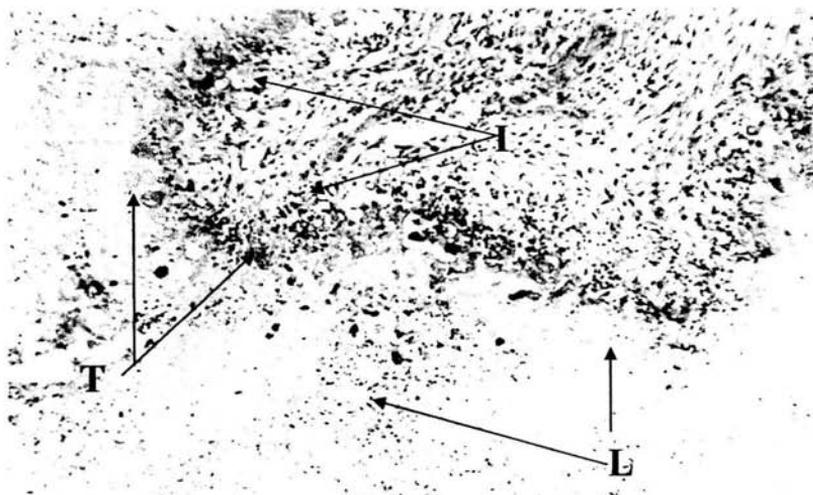


Fig. 16 Corte histológico del hígado de un hámster infectado con *E. histolytica* y no tratado con FK 506. Se observan algunos trofozoitos (T) teñidos en púrpura, un severo infiltrado inflamatorio, destrucción extensiva del hígado con liquefacción del tejido (L). Aumento 10x. Tinción HE.

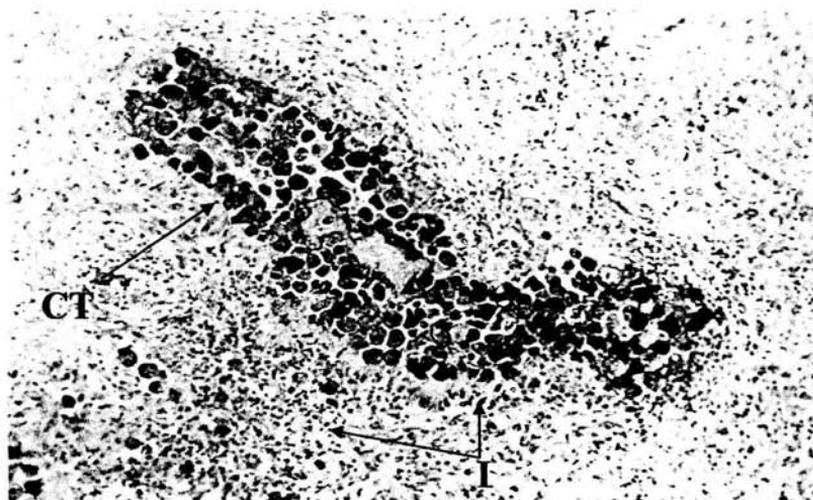


Fig. 17 Corte histológico de tejido hepático de un hámster infectado con *E. histolytica* y tratado con 2.5mg/kg de FK506. Se observa la formación de cúmulos de trofozoitos (CT), y alrededor un moderado infiltrado inflamatorio (I). Note se la integridad del tejido hepático alrededor del cúmulo de trofozoitos. Aumento 10x. Tinción HE:

VI. DISCUSIÓN

CN es el blanco a través del cual drogas como CsA y FK506 ejercen su efecto inmunosupresor sobre células T. Los complejos CsA y FK506 junto con sus respectivos ligandos, CyP y FKBP, se unen a CN, inhibiendo la defosforilación de factores de transcripción como el NF-AT, el cual regula la transcripción de genes de citocinas involucrados en la proliferación de linfocitos T como el de IL-2. En algunos casos, se ha demostrado que ésta es la vía por la cual CsA también ejerce un potente efecto anti-parasitario.

Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que la CsA inhibe la proliferación *in vitro* de la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica* a través de un mecanismo independiente de las glicoproteínas P (Carero y cols., 2004). También se reportó el primer gen en *E. histolytica* codificante de una proteína tipo ciclofilina (EhCyP), (Ostoa y cols., 2000). La identificación de este gen en *E. histolytica* cobra importancia al relacionarse con el efecto anti-amibiano de la CsA, ya que en el mismo trabajo se demostró que CsA se une a EhCyP e inhibe su actividad intrínseca de rotamasa. En el presente trabajo se realizaron una serie de ensayos dirigidos a determinar si el mecanismo de acción anti-amibiano de CsA es a través de CN, en una vía similar a como suprime a linfocitos T.

Para ello, se detectó actividad de fosfatasas totales y de CN (PP2B) en una fracción citosólica de trofozoítos de *E. histolytica*, determinada por la cantidad de fosfato liberado a partir del péptido RII. La actividad de fosfatasa de la amiba liberó 2.53 nmol, de los cuales 0.99 nmol correspondieron a la actividad de CN. La característica particular de CN es su sensibilidad específica a drogas inmunosupresoras como CsA y FK506 (Guerini, 1997). Efectivamente, la actividad identificada como CN de *E. histolytica* fue inhibida por ambas drogas en una forma dosis dependiente: 1 nM de CsA y FK506 inhibió a CN en un 52 y 49 %, respectivamente, mientras que 100 nM presentó un efecto inhibitorio del 89 y 80 %, respectivamente. En contraste, PSC-833 como era de esperarse no mostró efecto alguno, pues se trata de un análogo de CsA no inmunosupresor y que por lo tanto no se une a CN. El efecto inhibitorio de CsA fue ligeramente mayor que el de FK506, al menos en las condiciones de los ensayos de fosfatasas *in vitro*, a pesar de que se ha reportado que FK506 es de 10 a 100 veces más potente que CsA para inhibir la transcripción de genes de

diferentes citocinas como el de IL-2 (Spencer y cols., 1997). Aunque la razón de esta discrepancia se desconoce, se puede especular que FK506 se una con baja afinidad a su receptor tipo FKBP en la amiba (aún no identificado) o que el complejo FKBP-FK506 presente baja afinidad de unión a la CN amibiana, a diferencia de la alta afinidad de CsA por la CyP amibiana (Ostoa-Saloma y cols., 2000) generando complejos CyP-CsA con alta probabilidad de inhibir a CN. Nuestros resultados acerca del efecto de las drogas inmunosupresoras sobre la CN amibiana concuerdan con lo que se ha reportado para otros parásitos. Recientemente se identificó actividad de CN en extracto crudo de *S. mansoni*, la cual fue inhibida *in vitro* por CsA con una IC_{50} de 0.3 nM (Khattab y cols., 1999). Del mismo modo, en el caso de *P. falciparum*, la actividad de CN fue inhibida por la CsA *in vitro* a una IC_{50} de 0.7 nM (Dobson y cols., 1999). En mismo sentido, la actividad de CN detectada en *L. donovani* fue inhibida *in vitro* por CsA y FK506 (Barenjee y cols., 1999). Además de la detección de la actividad de CN en la amiba, nosotros identificamos un gen en la base de datos de la amiba (The Institute of Genomic Research) con alta homología a la subunidad A de las CN's reportadas. La secuencia fue identificada por su homología con la secuencia de CNA de *S. mansoni*. En la secuencia del gen se identificaron los siguientes dominios: dominio catalítico, dominio de unión a CnB, dominio de unión a CaM y dominio auto inhibitorio, los cuales están presentes en las secuencias de la mayoría de CNAs conocidas. Este gen codifica para una proteína con una identidad del 40 a 45 % con otras CNAs ya reportadas, con una masa molecular de 55,5 kDa y un punto isoeléctrico de 6.87. Estos resultados, en conjunto, sugieren que la amiba posee una fosfatasa tipo CN y que la CsA afecta la proliferación *in vitro* de trofozoítos a través de la inhibición de esta enzima.

Por otro lado, en un trabajo previo se observó que el tratamiento de hámsteres con la CsA confirió protección contra el desarrollo del AHA. Debido a que la administración de la CsA inmunosuprimió a los hámsteres, la protección observada no se pudo asociar directamente al efecto citotóxico de la CsA sobre las amibas, como se observó *in vitro*. De lo anterior, se desprendió la posible participación de linfocitos T en el desarrollo y establecimiento del AHA; sin embargo, el mecanismo del efecto protector de CsA no fue aclarado. Para determinar la participación de la repuesta inmune celular en el establecimiento y desarrollo del AHA en hámster, en el presente trabajo se evaluó el efecto de fármacos

inmunosupresores (Rapamicina y FK506) que no afectaran la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica*, sobre el desarrollo de AHA. FK506 no mostró efecto sobre la proliferación *in vitro* de trofozoítos a concentraciones de 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$; únicamente a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó un ligero retraso en la velocidad de crecimiento de los trofozoítos a partir de las 48 h con respecto al resto de las concentraciones ensayadas y al control no tratado. Este resultado contrasta con aquel observado en los ensayos de fosfatasas, donde FK506 inhibió claramente a la CN amibiana. Aunque la razón de esta discrepancia se desconoce, es probable que como se ha propuesto para *S. Mansoni* (Khattab y cols., 1998), la cantidad del receptor tipo FKBP en la amiba podría ser menor que la conocida para otras especies. Otra posibilidad es que FKBP se una a FK506 con baja afinidad, en contraste con la abundante cantidad de CyP y alta afinidad para CsA demostrada tanto en *S. mansoni* (Khattab y cols., 1998) como en la amiba (Ostoa y cols., 2000). Por su parte, Rapamicina no mostró efecto alguno sobre la proliferación *in vitro* de trofozoítos a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Al evaluar el efecto de las drogas sobre los hámsteres se observó que el tratamiento con dosis diarias de 2 mg/kg de peso de FK506 durante 9 días, inmunosuprimió a los animales. La administración de Rapamicina, por la misma vía, dosis y duración, no mostró efecto inmunosupresor sobre el hámster, determinado por ensayos de proliferación de linfocitos T a ConA. Sin embargo, la administración de Rapamicina a ratas Wistar, utilizando la misma dosis y vía, apagó la proliferación de linfocitos T a Con A, indicando que la Rapamicina usada era activa en su capacidad inmunosupresora. Este resultado contrasta con el efecto inmunosupresor reportado para Rapamicina en casi todos los modelos murinos (Ferraresco y cols., 1993). Existe un reporte que podría explicar la ausencia de efecto supresor de Rapamicina en hámsteres, el cual indica que los receptores para las drogas inmunosupresoras como CsA son estructuralmente diferentes entre especies, ya que los amino ácidos que rodean el sitio de unión a CsA y que interactúan con la CN, no son conservados (Rusnak y Mertz, 2000).

Debido a que solo FK506 mostró efecto inmunosupresor en los hámsteres, se decidió utilizarlo para evaluar su efecto sobre el desarrollo del AHA en hámsteres,.

En los hámsteres tratados con FK506 se observó una clara disminución en la extensión de los abscesos hepáticos con respecto a los controles sin tratamiento. La administración de FK506 a hámsteres resultó en una inmunosupresión de células T y al mismo tiempo en protección contra el desarrollo del AHA, lo cual sugiere la posible participación de linfocitos T en la diseminación del daño hepático. Esta posibilidad es apoyada por trabajos de Martínez-Palomo y cols., 1984, en los que sugiere que la lisis del parénquima hepático no es resultado del contacto directo de las amibas con los hepatocitos, ya que dicho contacto es poco frecuente. Además, trofozoítos fijados e inyectados en animales provocan el mismo daño hepático que los trofozoítos viables (Tsutsumi y cols., 1984). Esto parece indicar que el establecimiento y desarrollo del AHA en el modelo de hámster podría iniciarse por la lisis de células inflamatorias y la consecuente liberación de sus enzimas líticas que destruirían el tejido del hospedero. Recientemente, en un modelo de amibiasis intracecal en ratones C3H/HeJ la depleción de células T CD4⁺ disminuyó la carga parasitaria y la inflamación del ciego (Houpt y cols., 2002). Este evento ya ha sido descrito anteriormente para otros patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, en el establecimiento de la infección es mediada por la participación de células T CD4⁺ del sistema inmune del hospedero (Van-Crevel y cols., 2002). Estos reportes sugieren que la respuesta celular podría participar en la inflamación y daño del tejido hepático e intestinal durante la amibiasis.

En el presente trabajo FK506 confirió protección del 80 al 90 %, superior a lo obtenido con CsA, lo que podría deberse al hecho de que FK506 es 10 a 100 veces más potente que CsA para inhibir la transcripción de genes de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-6, entre otras (Spencer y cols., 1997). Además, se ha demostrado que FK506 también ejerce sus efectos supresores sobre otras células inmunes como, linfocitos B, macrófagos y células cebadas. (Zabawski y cols., 2000).

Los resultados de este trabajo sugieren que la respuesta celular mediada por linfocitos T favorece la destrucción del tejido durante el desarrollo del AHA en el hámster. En este sentido, se podrían dirigir futuras investigaciones para identificar las moléculas de la respuesta celular del hospedero que participan en la destrucción del tejido hepático. La apoptosis en células hepáticas inducida por TNF- α , óxido nítrico ó bien la destrucción de

la matriz extracelular por colagenasas que liberan macrófagos, fibroblastos u otras células del hospedero podrían ser las responsables directas de la destrucción hepática.

La identificación de la CN en *E. histolytica*, cobra importancia al relacionarse con mecanismos de proliferación importantes para la supervivencia del parásito. Además, la vía de la CN ofrece un abanico de posibilidades para el desarrollo de fármacos anti-amibianos.

VII. CONCLUSIONES

1. Se identificó por primera vez en *E. histolytica*: a) Actividad de fosfatasa PP2B (CN) y b) Una secuencia que muestra similitud con la subunidad catalítica de otras CNAs.
2. Es probable que la CsA inhiba la proliferación de *E. histolytica* al menos en parte, a través del bloqueo de la actividad de su CN.
3. La respuesta inmune celular es la principal responsable de la destrucción tisular en el AHA en hámsteres.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Archinal-Mattheis** A, Rzepka RW, Watanabe T. 1995 Analysis of the interaction of SDZ PSC 833 (3'-keto-Bmt1 -Val 2- cyclosporine), a multidrug resistance modulator, with P-glycoprotein. *Oncol. Res.* **7**, 603-610.
- **Banerjee** C, Sarkar D, and Bhaduri A. 1999. Ca²⁺ and calmodulina-dependent protein phosphatase from *Leishmania donovani*. *Parasitology* **118**: 567-573
- **Bell** A, Werneli B, Franklin R 1994. Role of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and calcineurin in the mechanisms of antimalarial action of cyclosporin A, FK506, and rapamicin. *Bioch. Pharmacol.* **48**, 495-503
- **Bienenstock** J, Berus AD. 1983. Some thoughts on the biologic role of immunoglobulin A. *Gastroenterology.*, **84**:178.
- **Bueding** E, Hawkins J, Cha YN. 1981. Antischistosomal effects of cyclosporin A. *Agents and Actions* **11**, 380-3.
- **Caballero** A, Viveros M, Salvatierra B, Tapia R, Sepúlveda J, Gutierrez G y Ortiz-Ortiz L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **50**:412-9
- **Canales-Treviño** ML, Tsutsumi V, Ramírez-Rosales A, y col. 1986. Amibiasis hepática experimental en el cobayo; un modelo de resistencia. *Arch Invest Med (Méx)*. **17** supl:23
- **Carrero** J C, Diaz M A, Viveros M, Espinoza B, Acosta E, y Otiz-Ortiz L. 1994. Human secretory immunoglobulin A anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infection and Immunity*, **62**:764-67.
- **Carrero** JC, Petrossian P, Olivos A, Sánchez-Zepeda M, Ostoa-Saloma P, Laclette JP. 2000. Effect of cyclosporin A on *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **31**, S8-S9.
- **Carrero** JC, Lugo M, Perez DG, Ortiz-Martinez C and Laclette JP. 2004. Cyclosporin A (CsA) Inhibits the proliferation the *Entamoeba histolytica* though blocking the activity of calcineurin. *International Journal for Parasitology.* **34**, 1091-1097
- **Chappell** LH, Wasting JM 1992. Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host-parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitol.* **105**, S25-S40.

- **Choudhuri** G Prakash V, Kumar A. 1991. Protective immunity to *Entamoeba histolytica* infection in subjects with antiameobic antibodies residing in a hyperendemic zone. *Scand J Infect Dis*, **23**: 771-6.
- **Clipstone** NA, Florentino DF, Crabtre GR 1994. Molecular analysis of the
 - interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J. Biol. Chem.* **269**,
 - 26431-26437
- **Cole** GA, Nickell SP, Mokhtarian F, Scheibel LW. 1983. Effects of cyclosporine on experimental infections. *Transplantation Proceedings* **15**, 3013-18.
- **Conde-Bonfil** MC, De la Mora-Zerpa C. 1992. *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Publica de México.*, **34**: 335-341
- **De Leon** A. 1970. Pronóstico tardío en el absceso hepático amibiano. *Archivos de Investigación Médica (Mex)*, **1**: 205-6.
- **Delgadillo** DM, Perez DG, Gomez C, Ponce A, Paz F, Bañuelos C, Mendoza L, Lopez C, Orozco E. 2002. The *Entamoeba histolytica* EhPgp5 (MDR like) protein induce swelling of the trophozoites and alters chloride-dependent currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Microbial. Drug. Resist.* **8**, 15-25.
- **Diamond** LS, Harlow DR, Cunnick CC. 1978. A new medium for the axenic
 - cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Med.*
 - *Hyg.* **72**, 431-432.
- **Di Pietro** A, Dayan G, Steinfelds E, Krell T, Trompier D, Baubichon-Cortay H, Jault JM. 1999. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells; using Recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *J. Brazilian.* **32**, 925-939
- **Dobson** S, May T, Berriman M, Del Vecchio C, Fairlamb A, Chakrabarti D, Barik S. 1999. Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin-cyclophilin-cyclosporin complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 167-181.
- **Foxwell** B, Mackie a, Ling V, Ryffel B. 1989. Identification of Mutidrug
 - Resistance- Related P-glycoprotein as a Cyclosporine Binding protein. *Mol.*

- *Biochem. Parasitol.* **99**, 167-181.
- **Fracasso** M, Brady FM, Moree HD, Walker L, Rose GP, et al. 2001. Phase II study of paclitaxel and valsopodar (PSC-833) in refractory ovarian carcinoma: Gynecologic oncology group study. *Journal of Clinical Oncology* , Vol **19**; Issu (12): 2975-2982.
- **Ghadirian** E, Meerovitch E. 1980. Effect of *Trichinella spiralis* infection on the experimental amebic liver absces in hamster. *Arch Invest Med (Mex)* **11** (1): 185
- **Gonzales-Galnares** M y Gutierrez G. 1986. Reducción de la letalidad
 - por absceso hepático amibiano. Experiencia de un Hospital Pediátrico
 - Mexicano. *Arch. Inest. Méd. (Méx.)*, **17**: (supl.1):341-349.
- **Guerini** D. 1997. Calcineurin: Not Just a Simple Protein Phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Com.* **235**, 271-275
- **Gutierrez**, G., Ludlow A, Espinoza G, Herrera S, Muñoz N, Rattoni N y Sepúlveda B. 1976. National Serologic survey. II. Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in México. (Sepúlveda, B y Diamod, L.S., eds.). Proceedings of the international Conference on Amebiasis. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 609-618.
- **Haffar** A, Boland J, Morren S y Edwards S. 1982. Amebic liver abscess in children. *Pediatr. Infect Dis*, **1**:322.
- **Handschumacher** RE, Hardin MW. 1984. Cyclophilin: a especific cytosolic binding protein of Cyclosporin A. *Science* **226**, 544-547.
- **Harding** MW, Handschumacher RE, Speicher DW 1986. Isolation and amino acid secuencia of cyclophilin. *The journal Biol. Chem.* **261**, 8547-8555
- **Higgins** CF. 1995. Volume-activated chloride currents associated with the multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Physiol.* **428**, S31-S36
- **Kelsall** B L, Ravdin J I. 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*, **168**: 1319-22.
- **Khattab** A, Pica-Mantocchia L, Wenger R, Cioli D, Klinkert MQ 1999. Assay of *Schistosoma mansoni* calcineurin phosphatase activity and assessment of its role in parasite survival. *Mol. Bichem. Parasitol.* **99** , 269-27

- **Kino** T, Hatanaka H, Hashimoto M, y cols. 1987. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation and physicochemical characteristics. *J. Antibiotic*. **40**: 1249-1255.
- **Kocken** CHM, Van Der Wel A, Rosenwirth B, Thomas AW 1996. *Plasmodium vivax*: *in vitro* antiparasitic effect of cyclosporin. *Exp. Parasitol*. **84**, 439-443.
- **Krestchmer**, R.R. 1990. Epidemiology of amebiasis. (R.R Krestchmer, ed). In Amebiasis: Infection and disease by *Entamoeba histolytica*. **CRC Press, Boston**, pp. 174-189.
- **Lemster** y cols. 1993. Cyclosporin A and FK506 block M-CSF-dependant macrophage proliferation through a calcineurin-independent mechanism.
- **Manez** R, Jain A, Marino IR, y cl. 1995. Comparative evaluation of tacrolimus (FK 506) and cyclosporin A as immunosuppressive agents. *Transplant Rev*. **9**:63-76.
- **Martinez-Palomo** A. 1987. The Pathogenesis of Amoebiasis. *Parasitol. Tod*. **3**:111-118
- **Martínez-Palomo** A 1988. Biology of Amebiasis: Progress and perspectives. *Biol. Parasitism*. 61-76.
- **Meerovich** E and Chadee K. 1988. In vivo Models for Pathogenicity in Amebiasis. In Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. Ed. Jonathan I. Ravdin. pp.179-185.
- **McCabe** RE, Luft BJ, Remington JS. 1985. Effect of murin interferon gamma on murine toxoplasmosis. *J Infect Dis*, **150**: 961
- **Morris** RE. 1996. Mechanism of action of new immunosuppressive drugs. *Kidney int*. **49** (supp.53): 26-38.
- **Murray** HW, Rubin BY, Rothermen ICD. 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulate human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest*, **72**: 1506.
- **Neil** A, Crabtree G 1992. Identification of calcineurin as key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*. **357**, 695-697.
- **Organización Panamericana de Salud**. Consulta con expertos en amebiasis. *Boletín Epidemiológico*. Vol. **18**. No. 1. México, Marzo 1997.

- **Organización Mundial de la Salud.** Amoebiasis, an expert consultation. Weekly Epidemiological Record No. 14, Ginebra, Abril 1997.
- **Ostoa-Saloma P, Carrero JC, Petrosian P, Herión P, Landa A, Laclette JP.** 2000. Cloning, characterization and functional expression of a cyclophilin of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Bioch. Parasitol.* **107**, 219-225.
- **Peters DH, Fitton A, Plosker GL, y col.**1993. Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation *Drugs.* **46**: 746-794.
- **Petri W A Jr, Chapman M D, Snodgras T.** 1989. Subunit structure of the galactose and N-actetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica* *J. Biol Chem* **264**: 3007-12.
- **Ravdin JI.** 1988. Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. Ed. Churchill Livingstone. pp. 132-139.
- **Ravdin J I, Jackson TFGH, Petri W A Jr.** 1990. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*, **162**: 768-72.
- **Ravdin J.** 1995. Amebiasis. *Clinical Infectious Diseases*, **20**:1453-1466.
- **Reed S L, Sargeant P G, Braude A I.** 1983. Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **77**:248-53.
- **Reed S.L. y Ravdin J.** 1995. Amebiasis. En Blaser M., Smith P. and Ravdin J.(editores) *Infections of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, New York.*
- **Reinertson JW, Thompson PE.**1951. Experimental amebic hepatitis in hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med*, **76**:518
- **Said-Fernandez S.** 1990. Virulence Factors of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex).* **21**(3):253-62.
- **Said-Fernández et al.**1991. Archivos de Investigación Médica (Méx.) Vol 17, Supl 1, 173-178
- **Salata RA, Martinez-Palomo A, Murray HW y col.** 1986b. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune mechanisms effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol*, **136**: 2633.

- **Salata R A**, Murray H W, Rubin B Y, Ravdin J I. 1986. The role of gama interferon in the generation of human macrophages and T lymphocytes cytotoxic for *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg*, **37**: 72-8.
- **Salata R A**, Martinez-Palomo A, Murphy C F, et al. 1986. Patients trated for amebic liver Abscess develop a cell mediated immune response effective in vitro against *Entamoeba Histolytica*. *J Immunol*, **136**: 2633-9.
- **Salata RA**, Cox J, Ravdin JI. 1987a. The interaction of Human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunol*, **9**: 249.
- **Salata RA**, Murray HW, Rubin BY, y col. 1987b. The role of gamma interferon in the generation of human macrofages cytotoxin for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am J Trop Med Hyg*
- **Salata R A** Pearson R D, Ravdin J I. 1989. Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J Clin Invest*, **75**: 491-9.
- **Salata R A**, Martinez-Palomo A, Conales L Ravdin J I. 1990. Immune sera suppreses the antigen specific proliferative response in T lymphocytes from patients cured of amebic liver abscess. *Infect Immun* **58**: 3941-6.
- **Serra E**, LardansV, Dissous C. 1999. Identification of NF-TA- like transcription factor in *S. mansoni* it s possible involmente in the antiparasitic action of cyclosporin A. *Mol. Bioch. Parasitol.* **101**, 33-41.
- **Sher A**, Ahmad S, y Muller-Berat C. 1980. Cell mediated immune response in experimental Amebiasis. *Arch. Invest. Med.*, **11**: 201-208
- **Somasundaram C**, NG, ML, Sinnaiah R. 1989. An in vivo study on the effect of the immunosuppressant drug cyclosporin in malaria-infected mice. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 71.
- **Spencer CM**, Goa KL, Gillis JC. 1997. Tacrolimus: an update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation *Drugs*. **50**: 925-975.
- **Stanley SL** 2003. Amoebiasis. *Lancet*.1025-34.

- **Tanimoto M**, Sepulveda B, Vasquez-Saavedra JA y col. 1971. Lesiones producidas en el hígado de hámsteres por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axenico. *Arch Invest Med (Mex)* **2** (suppl 1): 179.
- **Téllez A.**, Linder E., Meyer E. Morales W. 1997. Intestinal parasitosis in León, Nicaragua. *Acta Tropica*
- **Thomson AW**, Bonham CA, Zeevi A. 1995. Mode of action of tacrolimus (FK 506): molecular and cellular mechanism. *The Drug Monit.* **17**: 584-591.
- **Tomen–Scott K** 1981. Antimalarial activity of cyclosporin A. *Agents and Action.* **11**, 770-773.
- **Tsutsumi, V.**, Mena R., y Martínez-Palomo, A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J. Pathol.*, **117**: 81-89.
- **Tsutsumi, V.**, y Matínez-Palomo, A 1988. Inflammatory reaction experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J. Pathol.*, **30**:112-119.
- **Van-Helvoort A**, Smith AJ, Sporn H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, Van-Meer G. 1996. MDR 1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR 3 P-glycoprotein specifically traslocates phosphatidylcholine. *Cell.* **87**, 507-517.
- **Vickery AC**, y Nayar JK. 1987. *Brugia Pahangi* in nude mice : protective immunity to infective larvae is Thy 1.2⁺ cel dependent and cyclospirin A resistant. *Journal of Helminthology* **61**, 19-27.
- **Walsh, J.A** 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. *Rev. Infec. Dis.*, **8**:228-238.
- **Wastling JM**, Mackenzie K, Chappell LH. 1992. Effects of cyclosporin A on the morphology and tegumentary ultrstructure of *Hymenolepis microstoma* in vivo. *Parasitology* **104**, 531-538.
- **Zabawski EJ**, Costner M, Cohen JB, Cockerell CJ. 2000. Tacrolimus: pharmacology and therapeutic uses in dermatology. *International Journal of Dermatology.* **39**: 721-727.
- **Zambrano-Villa S**, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. 2002. How protozoan Parasites evade the immune response. *Trends Parasit Review.* **18**, 272-278.

IX. ARTICULO PUBLICADO



Cyclosporin A inhibits calcineurin (phosphatase 2B) and P-glycoprotein activity in *Entamoeba histolytica*

Julio C. Carrero^{a,*}, Haydee Lugo^a, D. Guillermo Pérez^b, César Ortiz-Martínez^a, Juan P. Lacleste^a

^aDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, A.P. 70228, 04510 México DF, Mexico

^bPrograma Institucional de Biomedicina Molecular, ENMYH, IPN, Guillermo Massieu Helguera 239, Fracc. La escalera, Ticomán, CP 07320 México DF, Mexico

Received 9 March 2004; received in revised form 10 May 2004; accepted 20 May 2004

Abstract

Cyclosporin A (CsA) inhibits the proliferation of several protozoan parasites through blocking the activity of calcineurin (Cn) or P-glycoproteins (Pgp). We report here, that inhibition of the proliferation of *Entamoeba histolytica* trophozoites, the causal agent of human amebiasis, is due to interference of the phosphatase activity of Cn, in a similar fashion to the effect of this immunosuppressive drug on T lymphocytes. The non-immunosuppressive CsA analog PSC-833, which binds Pgp without interfering the function of Cn, did not inhibit the proliferation of HM1:IMSS trophozoites. Moreover, phosphatase activity of amebic Cn, detected using the phosphopeptide RLL, was drastically affected by incubation with CsA, but not with PSC-833. On the other hand, both drugs were also tested on clone C2 trophozoites, which grow in the presence of emetine due to over-expression of Pgp. The effect of CsA was similar to that observed on HM1:IMSS trophozoites, whereas PSC-833 only affected the proliferation and viability of clone C2 when the trophozoites were grown in the presence of 40 μ M of emetine, suggesting an interference of the Pgp activity. This suggestion was confirmed by results from experiments of Pgp-dependent efflux of rhodamine from pre-loaded trophozoites, in the presence of either of these drugs. Therefore, CsA inhibition of *E. histolytica* trophozoite proliferation is more likely due to Cn than Pgp activity inhibition.

© 2004 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Calcineurin; P-glycoprotein; Cyclosporin A; PSC-833; Immunosuppressor

1. Introduction

Cyclosporin A (CsA) is a cyclic undecapeptide with potent immunosuppressive activity, obtained from the fungi *Tolypocladium inflatum* (Borel et al., 1996). CsA also inhibits proliferation in a number of parasites assayed in vitro (Chappell and Wastling, 1992; Page et al., 1995), including *Entamoeba histolytica*, the protozoa causing intestinal and liver amebiasis in humans (Carrero et al., 2000). Due to the impact of parasite diseases on human health in underdeveloped countries, there is a growing interest in the identification of non-immunosuppressive CsA analogs with anti-parasite activity, as well as on their mechanisms of action.

CsA inhibits the proliferation of T lymphocytes through binding to cyclophilin (Cyp), a protein of the immunophilin

family. The complex CsA–Cyp inhibits the phosphatase activity of calcineurin (Cn) thereby inhibiting the dephosphorylation of NF-AT-like transcriptional factors. Phosphorylated transcriptional factors cannot be translocated to the nucleus, thus interrupting the transcription of genes involved in cellular replication, such as interleukin-2 (Clipstone and Crabtree, 1992). Moreover, CsA and some of its analogs are competitive inhibitors of P-glycoproteins (Pgp). The ATP-dependent efflux pump activity of Pgps is partially responsible for cellular detoxification and multi-drug resistance (MDR) phenotype in normal and malignant cells (Shustik et al., 1995). Both mechanisms of action have been documented in different parasites: in *Plasmodium falciparum* (Dobson et al., 1999) and *Schistosoma mansoni* (Serra et al., 1999), CsA–Cyp complex inhibits their Cns, in the latter resulting in the blockage of the expression of *Sm28GST*, a gene associated with growth and differentiation of this trematode; in *Toxoplasma gondii* (Silverman et al., 1997) and *Cryptosporidium parvum* (Perkins et al., 1998),

* Corresponding author. Tel.: + 52-55-5622-3860; fax: + 52-55-5550-6447.

E-mail address: carrero@servidor.unam.mx (J.C. Carrero).

blocking of the efflux pump activity of Pgp appears to be the mechanism by which CsA affects the replication of these parasites.

The mechanism by which CsA inhibits the replication of *E. histolytica* trophozoites is still unknown, although previous functional studies, showed binding of CsA to recombinant *E. histolytica* Cyp and inhibition of its rotamase (*cis*–*trans* peptidyl-prolyl isomerase) activity (Ostoa-Saloma et al., 2000). Here, we present evidence suggesting that CsA inhibits the proliferation of *E. histolytica* trophozoites through binding to the parasite's Cn, blocking its serine–threonine phosphatase activity (PP2B).

2. Materials and methods

2.1. Entamoeba histolytica trophozoite cultures

Trophozoites of the HM1:IMSS strain were maintained axenically at 37 °C in TYI-S-33 medium (Diamond et al., 1978) supplemented with 15% fetal bovine serum (Biofluids), 6% vitamin solution (JRH Biosciences) and antibiotics (Lakeside). Trophozoites of the clone C2, exhibiting a drug-resistant phenotype related to Pgps over-expression (Orozco et al., 1985; Descoteaux et al., 1995), were maintained in the same culture conditions. However, before carrying out experiments where Pgp function was evaluated, C2 trophozoites were grown in the presence of 40 µM emetine for several generations until a stable culture was obtained. All trophozoites were harvested at the log-phase (72 h) of cultures, through ice-chilling and centrifugation at 150 × g for 5 min at 4 °C.

2.2. Growth of HM1:IMSS and C2 trophozoites in the presence of CsA and PSC-833

Cultures of both types of trophozoites (1.4×10^4 /ml) were grown as described above for 96 h in the presence of identical concentrations of CsA or its non-immunosuppressive analogue PSC-833, ranging from 10^{-3} to 100 µg/ml (equivalent to 8×10^{-4} to 80 µM). For experiments where Pgp function was evaluated, trophozoites of the clone C2 were cultured in the presence of 40 µM emetine. Due to their lipophilic properties, stocks of CsA and PSC-833 were prepared in ethanol. Therefore, control cultures were added with an equivalent amount of ethanol alone, never higher than 1/1000 (v/v). Viability of trophozoites was determined every 24 h under light microscopy using Trypan blue exclusion.

2.3. Rhodamine efflux assays

Trophozoites of the clone C2 (1×10^6) growing in presence of 40 µM emetine, were harvested and then incubated with 1 µg/ml rhodamine in phosphate buffered

saline pH 7.4 (PBS), for 30 min at 37 °C, as previously described (Bañuelos et al., 2002). After three washings with cold PBS, cells loaded with rhodamine were resuspended in serum-free TYI-S-33 medium and incubated in the absence or presence of CsA or PSC-833 (1 and 10 µg/ml) during 4.5 h at 37 °C. In order to evaluate the efflux of rhodamine from the cells, samples were taken before and after incubation, centrifuged at 150 × g for 5 min, and the fluorescence was measured in the supernatant at excitation and emission settings of 515 and 537 nm, respectively, using a LS-50B spectrofluorometer (Perkin Elmer). Concentration of the released rhodamine was calculated by interpolation on a rhodamine standard curve using serum-free medium.

2.4. Phosphatase activity assays

HM1:IMSS trophozoites cultured for 72 h were harvested as described above and washed three times with PBS. Assays of total phosphatase activity (PP1 + PP2A + PP2B + PP2C) and Cn (PP2B) were carried out on a high-speed cytosolic fraction from trophozoites, using the Calcineurin Cellular Activity Assay Kit (Calbiochem, USA) following the instructions recommended by the manufacturer. Briefly, the high speed cytosolic fraction was obtained by centrifugation at 25,000 × g of lysed trophozoites (thawing and freezing) in the presence of 10 µM iodoacetamide as a protease inhibitor. The cytosolic fraction was then depleted of phosphate and nucleotides (source of free phosphate) by gel filtration and used at different dilutions in the malquita green phosphatase assay. Reactions were carried out in 50 µl, under different conditions for detection of the four different classes of cytoplasmic serine–threonine phosphatases described for eukaryotic cells: protein phosphatases (PP) 1, 2A, 2B (Cn) and 2C (Shenolikar and Ingebritsen, 1984). Thus, PP1 and PP2A (not PP2B) are strongly inhibited by the marine sponge toxin okadaic acid (OA); PP2C is Mg⁺⁺-dependent, and PP2B is Ca⁺⁺ and calmodulin (CaM)-dependent (Cohen et al., 1989). Conditions were as follows: (i) in the presence of a saturating amount of CaM to determine the total phosphatase activity, (ii) in CaM-free buffer added with EGTA, to eliminate the PP2B activity, (iii) in buffer with CaM plus OA, to eliminate PP1 and PP2A activities, and (iv) in CaM-free buffer plus okadaic acid and EGTA, to eliminate PP1, PP2A and PP2B activities. Reactions were initiated by the addition of the RII phosphopeptide substrate (DLDVPIPIGRFDRRVPVSAE) and stopped after 30 min of incubation at room temperature with malaquita green reagent. The absorbance at 620 nm was determined in a spectrophotometer (Bio-tek Instruments). The effect of 1 or 100 µM of CsA or PSC-833 on Cn activity was assessed in assays identical to that of condition (iii), except for the type and concentration of inhibitor. We also used the same amounts of the macrolide FK-506, another immunosuppressive drug that inhibits Cn in a similar fashion to CsA, except that it interacts with

a different cytosolic ligand (Liu et al., 1991; Siekierka et al., 1989; Harding et al., 1989). The three drugs were dissolved in ethanol and added to the reaction mix at a maximum ratio of 1/100 of the total volume. Control reactions of Cn activity were done in the presence of the same levels of ethanol.

Protein concentration in the supernatant was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard; protein integrity of this fraction was evaluated in 10% SDS-PAGE stained with Coomassie blue. *p*-NPP, Bovine CaM and okadaic acid were purchased from Sigma (St Louis, MO). CsA and FK506 were from Novartis (Switzerland).

3. Results

3.1. Effect of CsA and PSC-833 on the viability and proliferation of HM1:IMSS and C2 trophozoites

The effect of CsA on the proliferation of trophozoites had been previously reported (Carrero et al., 2000); the drug inhibited proliferation of HM1:IMSS in a dose-dependent manner (Inhibitory Concentration 50% (IC₅₀) = 1 µg/ml), causing death of trophozoites at drug concentrations in the culture media over 50 µg/ml (40 µM). In contrast, treatment of HM1:IMSS trophozoites with the non-immunosuppressive CsA analog PSC-833, at the same range of the concentrations reported for CsA (1×10^{-3} to 100 µg/ml), failed to show a clear effect on the proliferation and viability of the trophozoites (Fig. 1). Kinetics of growth at 24, 48, 72 and 96 h of culture were similar among the trophozoites untreated or treated with 1×10^{-3} to 10 µg/ml of PSC-833.

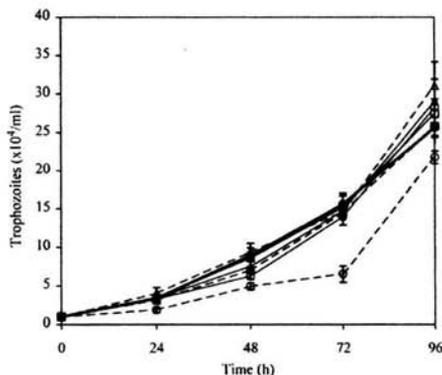


Fig. 1. Effect of the non-immunosuppressive CsA analog PSC-833 on the proliferation of HM1:IMSS trophozoites. The HM1:IMSS trophozoites were grown as described in Materials and methods in the absence of PSC-833 (—●—), or in the presence of 10^{-3} (—□—), 10^{-2} (—Δ—), 10^{-1} (—○—), 1 (—◇—), 10 (—▽—) and 100 (—○—) µg/ml. Viable trophozoites were counted under light microscopy at the indicated time points. Values represent the mean \pm SD; $n = 9$ in each case.

Only the trophozoites treated with 100 µg/ml showed a slight decrease in growth at 72 h, returning to control levels at 96 h (Fig. 1). The lack of effect of PSC-833 on the proliferation and viability of the trophozoites suggested that the mechanism responsible for the anti-amebic effect of CsA was not associated with the efflux pump activity of the amoeba Pgp, or that PSC-833 did not affect Pgp function of trophozoites in the culture conditions used for the assay. To explore these two possibilities, we took advantage of the emetine-resistant mutant clone C2 that shows MDR phenotype associated to Pgp overexpression (Orozco et al., 1985; Descoteaux et al., 1995). Assays on clone C2 were performed in two ways: (i) in the absence of emetine, to determine the direct effect of CsA and PSC-833 on these trophozoites, and (ii) in the presence of high concentrations

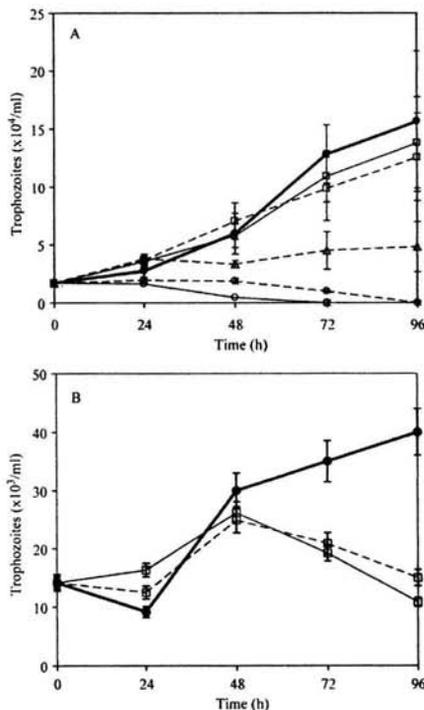


Fig. 2. Effect of CsA on the viability and proliferation of clone C2 trophozoites. (A) C2 trophozoites cultures growing in the absence of emetine were treated with CsA at 1 (—□—), 5 (—□—), 10 (—Δ—), 100 (—○—) or 1000 (—○—) µg/ml. Untreated trophozoites (—●—). (B) Steady-state cultures of C2 trophozoites growing in the presence of 40 µM emetine were treated with CsA at 1 (—□—) or 5 (—□—) µg/ml. Untreated trophozoites (—●—). Viable trophozoites were counted under light microscopy at the indicated time points. Values represent the mean \pm SD; $n = 9$ in each case.

of emetine (40 μ M), in order to determine the effect of both drugs on the Pgp-dependent survival of C2 trophozoites. CsA inhibited the proliferation of C2 trophozoites in the absence of emetine in a dose-dependent way. Low dose of 1 μ g/ml CsA did not affect growth, whereas 10 μ g/ml appeared to allow the survival, but not the proliferation of the trophozoites. Finally, concentrations \geq 100 μ g/ml were lethal for the parasites (Fig. 2A). These results were similar to those observed with CsA on HM1:IMSS trophozoites (Carrero et al., 2000).

The effect of CsA on the functionality of C2 Pgps was then evaluated on C2 trophozoites growing several generations in the presence of 40 μ M emetine. It is worth mentioning that clone C2, exhibiting a MDR phenotype,

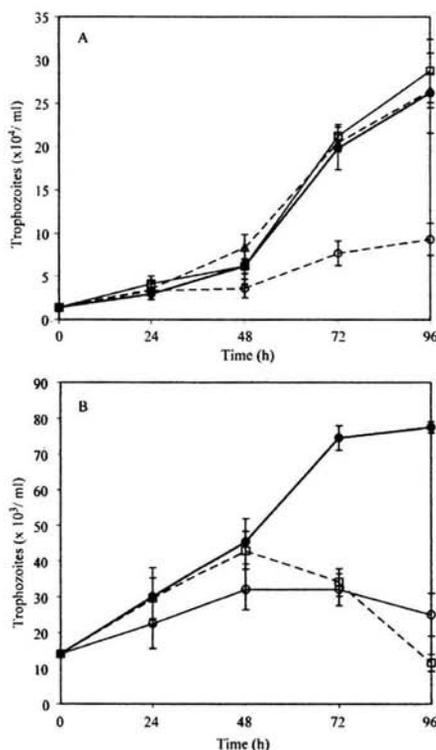


Fig. 3. Effect of the non-immunosuppressor PSC-833 on the viability and proliferation of clone C2 trophozoites. (A) C2 trophozoites cultures growing in the absence of emetine were treated with PSC-833 at 1 (◻), 10 (◻) or 100 (○) μ g/ml. Untreated trophozoites (●). (B) Steady-state cultures of C2 trophozoites growing in the presence of 40 μ M emetine were treated with PSC-833 at 10⁻¹ (●), or 1 (◻) μ g/ml. Untreated trophozoites (○). Viable trophozoites were counted under light microscopy at the indicated time points. Values represent the mean \pm SD; $n = 9$ in each case.

proliferates more slowly in the presence of emetine (Orozco et al., 1985). In our experiments, proliferation of clone C2 in presence of 40 μ M emetine was three to four-fold slower than in the absence of the drug (Compare A and B in Figs. 2 and 3). Cultures of C2 with emetine were treated with CsA at 1 and 5 μ g/ml, concentrations that did not affect the C2 proliferation in the absence of emetine (Fig. 2A). Both concentrations significantly decreased the proliferation and survival of C2 trophozoites after 48 h of incubation (Fig. 2B), with respect to the control growing only with emetine, suggesting that emetine accumulated inside the cells, possibly due to CsA competition for the active site on C2 Pgps.

As observed for HM1:IMSS, PSC-833 did not affect the growing of C2 trophozoites in the absence of emetine (Fig. 3A), except when a dose of 100 μ g/ml was added to the culture. However, in the presence of emetine, a dose of PSC-833 as low as 1 \times 10⁻¹ μ g/ml, showed a clear inhibitory effect on proliferation and survival after 48 h of incubation (Fig. 3B).

3.2. Effect of CsA and PSC-833 on rhodamine efflux of *E. histolytica* C2 trophozoites

Results showed that rhodamine efflux from C2 trophozoites growing in the presence of emetine and in the presence of 10 μ g/ml of CsA or PSC-833 diminished about 30 and 60%, respectively, with respect to untreated controls (Fig. 4). Verapamil (1 μ g/ml), a chemical blocker that reverses the MDR phenotype of C2, inhibited the efflux by 70% as expected. These results indicated that PSC-833, and to a lesser extent CsA, inhibit the Pgp-mediated efflux of rhodamine in C2 cells.

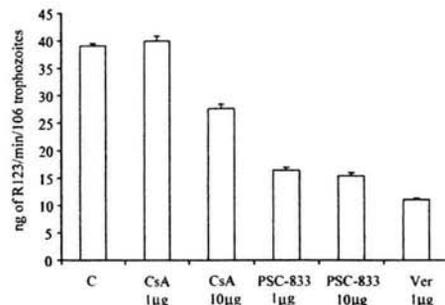


Fig. 4. Effect of CsA and PSC-833 on the rhodamine efflux from clone C2 trophozoites. C2 trophozoites growing with 40 μ M emetine and loaded with rhodamine, were incubated in the presence of 1 or 10 μ g/ml of CsA or the analog PSC-833 for 4.5 h. Rhodamine efflux was measured in the supernatant using a spectrofluorometer as described in the Materials and methods section. Verapamil (ver) at 1 μ g/ml was used as control of Pgp efflux inhibition. C: untreated trophozoites. Values represent the mean \pm SD; $n = 3$ in each case.

Table 1
Determination of different phosphatase activities in a high speed cytosolic fraction from *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS trophozoites

Assay conditions ^a	Phosphatase activities detected	nMoles of released phosphate: mean \pm SD ^b (% of control activity)
Calmodulin + Ca ⁺⁺	PP1 + PP2A + PP2B and PP2C	2.71 \pm 0.21 (100)
Calmodulin-free buffer + EGTA	PP1 + PP2A and PP2C	1.79 \pm 0.15 (66) ^c
Calmodulin + Ca ⁺⁺ + okadaic acid	PP2B and PP2C	1.32 \pm 0.09 (48)
Calmodulin-free buffer + EGTA + okadaic acid	PP2C	0.07 \pm 0.02 (2.5)

^a See Material and Methods.

^b Values represent the mean of triplicate experiments.

^c Inhibited phosphatase activity (34%) corresponds to PP2B (calcineurin) activity.

3.3. Phosphatase assays on high speed supernatants of *E. histolytica*; effect of diagnostic inhibitors

In order to determine the role of the Cn pathway on the inhibition of *E. histolytica* HM1:IMSS trophozoites proliferation by CsA, we initially determined Cn (PP2B) and other phosphatase activities known for eukaryotic cells (PP1, PP2A and PP2C), in a high speed cytosolic fraction obtained from those trophozoites (Table 1).

3.4. Inhibition of Cn by CsA and FK506

To ascertain if Cn activity detected in the high speed supernatant from ameba was susceptible to CsA and FK506, but not to PSC-833, PP2B phosphatase assays were carried out testing two concentrations of each drug (Table 2). Ameba Cn activity resulted inhibited by CsA and FK-506,

Table 2
Effect of cyclosporin A, FK-506 and PSC-833 on *Entamoeba histolytica* calcineurin (PP2B) activity detected in a high-speed cytosolic fraction

Drug tested ^a	Concentration (μ M)	nMoles of released phosphate: mean \pm SD ^b	Inhibition of PP2B activity (%) ^c
None	–	1.25 \pm 0.10	0
CsA	1	0.64 \pm 0.09	49
	100	0.15 \pm 0.03	88
FK-506	1	0.86 \pm 0.09	31
	100	0.25 \pm 0.04	80
PSC-833	1	1.33 \pm 0.17	0
	100	1.18 \pm 0.11	5

^a All reaction mixtures contained calmodulin + Ca⁺⁺ + okadaic acid (phosphatase activities detected: PP2B + PP2C; Table 1).

^b Values represent the mean of triplicate experiments.

^c The contribution of PP2C activity was neglected in these estimates as it accounts for about 2.5% (Table 1).

although CsA was slightly more effective than FK-506, reaching 88 and 80% inhibition at 100 μ M, respectively. As expected, PSC-833 did not affect the *E. histolytica* Cn activity in a significant manner, and just a marginal effect (5%) at the higher concentration was observed.

4. Discussion

The anti-parasitic effect of the immunosuppressant CsA has been widely documented (Chappell and Wastling, 1992; Page et al., 1995). In a previous report, we described the high susceptibility of *E. histolytica* HM1:IMSS trophozoites to CsA (Carrero et al., 2000). Although the mechanism of action remains unknown in most parasites, two possible pathways have been implicated (Clipstone and Crabtree, 1992; Demeule et al., 1997), that can be represented as CsA–Cyp–Cn and CsA–Pgp. Here, we present evidence suggesting that CsA inhibits the in vitro proliferation of *E. histolytica* trophozoites through binding to Cn (CsA–Cyp–Cn pathway), thus blocking its serine–threonine phosphatase activity (PP2B).

We firstly determined the effect of CsA on the pump activity of *E. histolytica* Pgps by taking advantage of an emetine-resistant mutant of *E. histolytica* known as clone C2, whose MDR phenotype is associated to Pgp overexpression (Orozco et al., 1985). We also used the non-immunosuppressive CsA-analog PSC-833 with a well-documented ability to compete with other substrates for Pgps without affecting the Cyp and thereby Cn (Loor, 1999; Tiberghien et al., 2000). In contrast to CsA, which showed a strong C2 anti-proliferative effect (Fig. 2A), PSC-833 had practically no effect on the proliferation of *E. histolytica* HM1:IMSS (Fig. 1) or C2 trophozoites growing in the absence of emetine (Fig. 3A). These results are interesting considering that PSC-833 has been shown in some instances to be a more potent anti-parasite agent than CsA (Tiberghien et al., 2000).

To rule out the possibility that PSC-833 did not block the ameba Pgp, we carried out two types of assays. First, we checked the effect of PSC-833 on C2 grown in the presence of 40 μ M emetine (Orozco et al., 1985). Secondly, we analysed the effect of PSC-833 on the efflux of rhodamine by C2 trophozoites (Bañuelos et al., 2002). Results demonstrated that PSC-833 is in fact a strong inhibitor for *E. histolytica* Pgps, inducing at low concentrations (1×10^{-1} and 1 μ g/ml), on one hand the death of C2 cells grown in the presence of emetine (Fig. 3B), and on the other, the blocking of the Pgp dependent efflux of rhodamine (Fig. 4). In spite of CsA clearly inhibited the proliferation of both wild HM1:IMSS and clone C2 trophozoites, it exhibited less inhibitory capability than PSC-833 on C2 growth in the presence of emetine, as well as on the C2 rhodamine efflux assay.

Taken together, these results with PSC-833 suggest that the inhibition of the efflux pump activity of *E. histolytica*

Pggs did not affect the rate of trophozoite proliferation *in vitro*. Moreover, since CsA inhibited the proliferation of C2 in the absence and in the presence of emetine, it was more probable that CsA acted through the Cyp–Cn pathway, even though it also affected the pump activity of Pggs. Consequently, we decided to evaluate the action of CsA on the Cn activity (PP2B) from *E. histolytica* HM1:IMSS trophozoites. Initially, we used a simple method based on the release of phosphate from the substrate *p*-NPP, that allowed detection of all four phosphatase activities known in eukaryotes (Shenolikar and Ingebritsen, 1984; Martin et al., 1985) including *P. falciparum* (Dobson et al., 1999). Using this method, we were able to detect and identify the activity of the different phosphatase in crude extracts from trophozoites. Unfortunately, the results were equivocal, when the effect of CsA and FK506 on PP2B activity was evaluated (data not shown), but not surprising (Khatab et al., 1999). A commercial kit for detection of Cn (PP2B) based on the dephosphorylation of the RII phosphopeptide provided reproducible data on the effect of CsA, FK506 and PSC-833 on *E. histolytica* Cn. The relative contributions of the different phosphatases (PP1, PP2A, PP2B (Cn) and PP2C) were evaluated in the cytosolic fraction of trophozoites, employing inhibition patterns (Cohen et al., 1989; Table 1). The amebic phosphatase activity detected in the fraction, decreased in the presence of OA or upon depletion of Mg^{++} , whilst increased in the presence of Ca^{++} and CaM (Table 1), the later suggesting that the endogenous concentration of free Ca^{++} and CaM in the amebic cytosolic extract was insufficient to fully activate Cn. It was estimated that Cn constitutes about 34% of the phosphatase activity detected in the fraction. Studies on parasites regarding the evaluation of all four protein phosphatases are scarce. However, this value is lower than the activity reported for *S. mansoni* using a similar assay, where Cn was over 50% of the total phosphatase activity detected (Khatab et al., 1999).

Crystal structure analyses have shown that CsA–Cyp and FK506–FKbinding protein complexes target a region of the enzyme that is unique to Cn and is not shared with other phosphatases, rather than the active site of the enzyme, resulting in specific inhibition of Cn (Kissinger et al., 1995; Huai et al., 2002; Huai and Ke, 2003). As expected, the amebic Ca^{++} and CaM-dependent activity detected was clearly inhibited by CsA and FK-506 in agreement with other reports (Liu et al., 1991; Liu, 1993; Dobson et al., 1999), whereas it was unaffected by PSC-833, even at high concentrations (Table 2), demonstrating that this activity in effect corresponds to the *E. histolytica* Cn.

In a previous report, we described the cloning and characterisation of the first Cyp described for *E. histolytica*. Functional studies using the recombinant EhCyp demonstrated its ability to bind CsA, resulting in a block of its rotamase activity (Ostoa-Saloma et al., 2000). Together, our previous and present results suggest that CsA exerts its anti-amebic effect through interfering with the phosphatase

activity of its Cn. CsA interacts with EhCyp and in turn, the CsA–EhCyp complex probably binds to amoeba Cn and inhibits its dephosphorylating activity, avoiding the translocation of a NF-AT-like transcription factor involved in cellular replication. However, the possibility that CsA affects any other important, and not yet identified, physiological process in *E. histolytica* cannot be ruled out.

Recently, we have identified within the *E. histolytica* genome database (The Institute of Genomic Research) a coding sequence showing high identity with the catalytic subunit A of Cn (CnA) from many organisms. Identical sequence was amplified from total amebic DNA and deposited at the GenBank (accession number AY499534). Experiments are being conducted to find out if the CsA–rEhCyp complexes in fact bind to and inhibit the phosphatase activity of recombinant *E. histolytica* Cn.

Acknowledgements

PSC-833 was kindly provided by Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland. We thank A. Olivios, B. Sánchez-Hernández and M. Nequiz for supplying HM1:IMSS trophozoites and technical assistance. This work was partially supported by research Grants from CONACYT (41693-M: J.P.L. and J.C.C.; J34137-M: D.G.P.), DGAPA UNAM (IN206102-3: J.P.L. and J.C.C.), CGPI (20030922: D.G.P.) and Fundación Miguel Alemán, A.C. (JPL).

References

- Bañuelos, C., Orozco, E., Gómez, C., González, A., Medel, O., Mendoza, L., Pérez, D.G., 2002. Cellular location and function of the P-glycoproteins (EhPggs) in *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant trophozoites. *Microb. Drug Resist.* 8, 291–300.
- Borel, J.F., Baumann, G., Chapman, I., Donatsch, P., Fahr, A., Mueller, E.A., Vigouret, J.M., 1996. *In vivo* pharmacological effects of cyclosporin and some analogues. *Adv. Pharmacol.* 35, 115–246.
- Carrero, J.C., Petrossian, P., Olivios, A., Sánchez-Zerpa, M., Ostoa-Saloma, P., Lacleite, J.P., 2000. Effect of Cyclosporin A on *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 31, S8–S9.
- Chappell, L.H., Wastling, J.M., 1992. Cyclosporin A: antiparasitic drug, modulator of the host–parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitology* 105, S25–S40.
- Clipstone, N.A., Crabtree, G.R., 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695–697.
- Cohen, P., Klumpp, S., Schelling, D.L., 1989. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett.* 250, 596–600.
- Demeule, M., Wengers, R.M., Beliveau, R., 1997. Molecular interactions of cyclosporin A with P-glycoprotein. Photolabeling with cyclosporin derivatives. *J. Biol. Chem.* 272, 6647–6652.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Samuelson, J., Orozco, E., 1995. Increase in mRNA of multiple EhPggs genes encoding P-glycoprotein homologues in emetine-resistant *Entamoeba histolytica* parasites. *Gene* 164, 179–184.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431–432.

- Dobson, S., May, T., Berriman, M., Del Vecchio, C., Fairlamb, A.H., Chakrabarti, D., Barik, S., 1999. Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin–cyclosporin complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 167–181.
- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., Schreiber, S.L., 1989. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758–760.
- Huai, Q., Ke, H., 2003. Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins–immunosuppressants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 1095–1102.
- Huai, Q., Kim, H.J., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragón, A., Liu, J.O., Ke, H., 2002. Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12037–12042.
- Khattab, A., Pica-Mattocchia, L., Wenger, R., Cioli, D., Klinkert, M.Q., 1999. Assay of *Schistosoma mansoni* calcineurin phosphatase activity and assessment of its role in parasite survival. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 269–273.
- Kissinger, C.R., Parge, H.E., Knighton, D.R., Lewis, C.T., Pelletier, L.A., Tempczyk, A., Kalish, V.J., Tucker, K.D., Showalter, R.E., Moomaw, E.W., Gastinel, L.N., Habuka, N., Chen, X., Maldonado, F., Barker, J.E., Bacquet, R., Villafranca, J.E., 1995. Crystal structure of human calcineurin and the human FKBP12–FK506–calcineurin complex. *Nature* 378, 641–644.
- Liu, J., 1993. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol. Today* 14, 290–295.
- Liu, J., Farmer, J., Lane, W., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S., 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin–cyclosporin A and FKBP–FK506 complexes. *Cell* 66, 807–815.
- Loor, F., 1999. Valspodar: current status and perspectives. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 8, 807–835.
- Martin, B., Pallen, C.J., Wang, J.H., Graves, D.J., 1985. Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphate activity of calcineurin. *J. Biol. Chem.* 260, 14932–14937.
- Orozco, E., Cruz-Hernández, F., Rodríguez, M.A., 1985. Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 49–59.
- Ostoa-Saloma, P., Carrero, J.C., Petrossian, P., Heri6n, P., Landa, A., Laclette, J.P., 2000. Cloning, characterization and functional expression of a cyclophilin of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107, 219–225.
- Page, A.P., Kumar, S., Carlow, C.K.S., 1995. Parasite cyclophilins and antiparasite activity of cyclosporin A. *Parasitol. Today* 11, 385–388.
- Perkins, M.E., Wu, T.W., Le Blancq, S.M., 1998. Cyclosporin analogs inhibit *in vitro* growth of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 843–848.
- Serra, E.C., Lardans, V., Dissous, C., 1999. Identification of NF-AT-like transcription factor in *Schistosoma mansoni*: it's possible involvement in the antiparasitic action of cyclosporin A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 101, 33–41.
- Shenolikar, S., Ingebritsen, T.S., 1984. Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases. *Methods Enzymol.* 107, 102–129.
- Shustik, C., Dalton, W., Gros, P., 1995. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation. *Mol. Aspects Med.* 16, 1–78.
- Siekierka, J.J., Hung, S.H.Y., Poe, M., Lin, C.S., Sigal, N.H., 1989. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has a peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341, 755–757.
- Silverman, J.A., Hayes, M.L., Luft, B.J., Joiner, K.A., 1997. Characterization of anti-Toxoplasma activity of SDZ 215-918, a cyclosporin derivative lacking immunosuppressive and peptidyl-prolyl-isomerase-inhibiting activity: possible role of a P-glycoprotein in Toxoplasma physiology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1859–1866.
- Tiberghien, F., Wenandy, T., Loor, F., 2000. The potent immunosuppressive cyclosporin FR901459 inhibits the human P-glycoprotein and formyl peptide receptor functions. *J. Antibiot.* 53, 509–515.