

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PAPEL DE *Entamoeba histolytica* SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS
QUIMIOCINAS

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:

M en C. SILVANA BEATRIZ PERTUZ BELLOSO

Director de tesis:

Dr. Eduardo García Zepeda

México, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Eduardo García-Zepeda, y con el apoyo de CONACYT (33365), y de una beca otorgada por DGEP-UNAM.

Jurado

Dr. Ruy Pérez Montfort
Dr. Eduardo García Zepeda
Dra. Cecilia Ximénez
Dra. Lilian Yépez Mulia
Dr. Rafael Bojalil
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama
Dra. Marta Torres Rojas

Dedicada A:

*México y su pueblo
Naide, nuevamente, por hacer realidad un sueño
Los sueños que te hacen lanzarte al abismo sin paracaídas,
Y sin mirar a donde
Mi padre (Fernán Pertuz), por su maravillosa visión del mundo
Mi abuela (Adriana Urdaneta), porque siempre sembró para otros
Marina Conde, por los momentos vividos y,
La magia de su planeta
Mabel Cuñarro, por alumbrar un camino
Mis hermanos, los pertusitos, por la vida que compartimos
Valeria Hernández, por despertar sentimientos de infancia
Octavio García, por su amor y, por todos los momentos
Selma Rivas, por su eterna amistad
Horacio Villafan, por compartir su sabiduría conmigo,
Y por ser un amigo incondicional
Deyamira Matus (Deya), por recordarme lo que soy, en los momentos más difíciles, en el café
de Chinos de Coyoacan "Kwoloan"
Margarita y Paoula Rodríguez, por su amistad alternativa válida en cualquier momento
Sandra Cardozo, siempre se escribe en tinta de colores en el papel casi borroso
Nairobi Jiménez, por su fraternidad cósmica e infinita que navega en el ciberespacio
Alex Alarcón, por que supo escucharme todo el tiempo, y por que le debo más de una
Eowyn (mi gato), siempre jugando, y
Por supuesto, a Mami (Carmen Belloso), porque siempre me ofreció su sonrisa y apoyos
incondicionales que traspasaron el metal, la tierra, el agua, la madera y todos los elementos
que componen este planeta azul*

*"I try my best to be like I am, but everybody wants you to be just like them"
Bob Dylan*

Agradecimientos

Por el apoyo económico: *A la Dirección General de Becas de Postgrado de la UNAM y CONACYT.*

Por el apoyo técnico: *A Sandra Lugo, Vicente O´Limon, Dr. Carlos Rosales, Patricia Espinosa, Dr. Enrique Ortega, Alfonso Olivos, Dra. Gloria Soldevilla.*

A mi comité Tutorial y Tutor: *Dr. Leopoldo Flores, Dr. Pedro Ostoa, y Dr. Eduardo García-Zepeda.*

A los amigos que vivieron la historia conmigo: *Selma Rivas, Ileana Licona, Paco Martínez, Paula Licona, Erika Noquez, Horacio Villafan, Ramses Chávez, Rodrigo Rojas, Javier Verona, Emilio Flores, Karen Nava, Verónica Mondragón, José esparza, Poncho, Pedro Pérez, Paco Torres, Nancy Monterrubio, Perla Ríos, Carla Fonseca, Janna Toiber, Maria-Luisa Haces, Alberto Camacho, Teresa Montiel, Lourdes Massieu, y especialmente a Marcela Ramírez por se convirtió en parte de esta historia, también.*

A los integrantes del comité de evaluación de la tesis: *Drs: Rafael Bojalil, Fernando Esquivel, Ruy Pérez-Montfort, Martha Torres, Cecilia Ximénez, y Lilian Yépez.*

Contenido	Página
Lista de figuras	6
Lista de Tablas	6
Lista de abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Antecedentes Generales	12
1. Características generales de las quimiocinas y sus receptores	12
1.2. Funciones de las quimiocinas y sus receptores	19
1.2.1. Papel de las quimiocinas y sus receptores en el desarrollo de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa	19
1.2.2. Papel de las quimiocinas y sus receptores en la homeóstasis del sistema inmunitario	20
1.2.3. Otras funciones de las quimiocinas.	22
2. Quimiocinas CC	22
3. Quimiocinas CXC	25
4. <i>Entamoeba histolytica</i> :	28
4.1. El parásito	28
4.2. Amibiasis	29
4.2. Determinantes de patogenicidad	32
4.3. Proteasas de cisteína de <i>Entamoeba histolytica</i>	34
5. Evasión de las funciones de las quimiocinas por patógenos	39
Planteamiento del problema	42
Hipótesis y Objetivos	43
Materiales y métodos	45
Resultados	52
Discusión y conclusiones	69
Perspectivas	80
Referencias	82
Anexos	92

Figuras	Página
Figura 1: Clasificación de las quimiocinas	13
Figura 2: Reclutamiento celular: un proceso secuencial de cuatro pasos	18
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	29
Figura 4. Actividad proteolítica de la EhCP2 analizada por zimografía y por espectrofluorometría	53
Figura 5. Proteólisis de miembros de las quimiocinas CC y CXC por EhCP2	57
Figura 6. Inhibición de la migración de células monocíticas THP-1 por efecto de la EhCP2 sobre CCL13	59
Figura 7. Inhibición de la actividad enzimática de EhCP2 por E-64 y leupeptina y su efecto sobre la actividad quimiotáctica de CCL13	61
Figura 8. Inhibición de la migración de células monocíticas THP-1 mediada por CCL13 a diferentes concentraciones de la EhCP2	62
Figura 9: Cinética de inhibición de la migración de células monocíticas EhCP2	63
Figura 10: Reducción de la migración de las células monocíticas THP-1 por efecto de la toxina pertussis sobre receptores CC.	65
Figura 11. EhCP2 inhibe la migración de monocitos mediada por CCL2	66
Figura 12. EhCP2 induce la migración de neutrófilos mediada por CXCL8 ₁₋₇₇	68
Figura 13: Modelo de evasión de la respuesta inmunitaria celular de <i>Entamoeba histolytica</i>	79

Tablas	Página
Tabla 1: Quimiocinas CC	15
Tabla 2: Quimiocinas CXC	16
Tabla 3: Propiedades de activación e inhibición de la EhCP2.	52
Tabla 4: Predicción de los péptidos que podrían generarse de la proteólisis de CCL13 por EhCP2	54
Tabla 5: Predicción de los péptidos que podrían generarse de la proteólisis CCL2 por EhCP2	55
Tabla 6: Predicción de los péptidos que podrían generarse de la proteólisis de CXCL8 ₁₋₇₇ por EhCP2	56
Tabla 7. Porcentaje de migración de las células monocíticas THP-1 al tratar CCL13 con EhCP2. Efecto de los inhibidores de proteasas de cisteína.	60

Lista de abreviaturas y siglas

EHCP2: proteasa de cisteína-2 de *Entamoeba histolytica*.

MCPs: proteínas quimioatrayente de monocitos.

MCP4: proteína quimioatrayente de monocitos-4 (CCL13).

MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos-1 (CCL2).

IL1: interleucina-1.

IL4: interleucina-4.

IL-1 β : interleucina-1 β .

IL-8: interleucina-8 (CXCL8).

INF- γ : interferón- γ .

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α .

IL-18: interleucina 18.

IL13: interleucina 13.

DARC: receptor para el antígeno Duffy.

GAG: glicosaminoglicanos.

ERL: secuencia de aminoácidos en el extremo NH₂-terminal de las quimiocinas CXC y significa, ácido glutámico-Arginina y leucina.

JAM: moléculas de adhesión intercelular.

LFA-1: antígeno 1 asociado a funciones del linfocito (integrina).

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1 (integrina).

PECAM-1: molécula de adhesión de plaquetas al endotelio-1 (integrina).

PAMs: patrones moleculares asociados a patógenos.

NK: células asesinas naturales.

I¹²⁵: yodo ¹²⁵.

Lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica*: lectina galactosa/-Nacetil-galactosamina.

COX-2: ciclooxigenasa 2.

PGE₂: prostaglandinas E₂.

S28: familia de proteasas de serina.

ERFNN: Glutamina-Arginina-Fenilalanina-Asparagina-Isoleucina-Asparagina, región en la proenzima de las proteasas de cisteína.

CHN: Cisteína-Histidina-Asparagina; región en el sitio activo de las proteasas de cisteína.

SCID: ratón con inmunodeficiencia severa y combinada.

Células BHK: línea celular de riñón de hamsters.

RNA: Ácido ribonucleico.

S³⁵: azufre ³⁵.

IgA: inmunoglobulina A.

IgG: inmunoglobulina G.

C3 y C5: proteína de complemento 3 y proteína de complemento 5.

MIF: macrophage migration inhibitory factor.

PAF: factor de activación de las plaquetas.

Cis1-3 y Cis 2-4: residuos de cisteína conservados en el extremo NH₂-terminal, en la estructura de las quimiocinas.

NO: óxido nítrico.

Resumen.

La amibiasis es una infección intestinal causada por el parásito *Entamoeba histolytica*, y es considerada como la tercera causa de muerte por infección parasitaria en todo el mundo, después de la malaria y la esquistosomiasis. En México es una enfermedad de alta prevalencia también, y constituye un problema de salud pública. En la amibiasis, la resistencia a la infección se ha asociado a los macrófagos y neutrófilos, principalmente, que desarrollan mecanismos efectores que son capaces de destruir este parásito, pero también aparecen relacionados a las etapas tempranas de la inflamación y a la amibiasis invasiva. El proceso inflamatorio que se desarrolla durante la amibiasis obedece, entre otros factores, a la regulación del tráfico de neutrófilos, macrófagos y otros leucocitos por las quimiocinas. La inflamación observada durante la amibiasis está relacionada con la inducción de las quimiocinas CXCL8 y CXCL1 por células epiteliales intestinales, que provocan el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Este proceso inflamatorio puede ser alterado por proteínas secretadas por *E. histolytica*, como las proteasas de cisteína que pueden actuar sobre proteínas de matriz extracelular, citocinas o quimiocinas, de estas, la EhCP2 esta asociada con la eritrofagocitosis, y posiblemente con el daño al hospedero. En la amibiasis las poblaciones celulares asociadas a la inflamación están bien caracterizadas, pero no se conoce claramente las quimiocinas involucradas ni el papel que juega la proteasa de cisteína-2 en la modulación del proceso inflamatorio. Nosotros pensamos que las proteasa de cisteína-2 están involucradas en la modulación del tráfico de leucocitos durante el proceso inflamatorio. Por ello, el objetivo de este estudio fue demostrar que la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* (EhCP2), afectaba la actividad quimiotáctica de las quimiocinas-CC (CCL2 y CCL13), involucradas en la regulación del reclutamiento de monocitos/macrófagos, y de las quimiocinas-CXC (CXCL8), involucradas en el reclutamiento de neutrófilos. Nosotros encontramos que las funciones de las quimiocinas sufrieron modificaciones cuando éstas fueron tratadas con la EhCP2; así EhCP2 inhibió la actividad quimiotáctica de CCL2 y CCL13 sobre los monocitos THP-1, pero aumentó el efecto quimiotáctico de CXCL8 sobre granulocitos humanos. En conjunto estos resultados nos llevan a proponer que EhCP2 puede modular el tráfico de células monocíticas y granulocitos al sitio de infección al generar formas truncadas de CCL13, CCL2 y CXCL8 con funciones antagónicas sobre los receptores CC, o agonistas sobre los receptores CXCR1-2, alterando con ello la respuesta inflamatoria mediada por estas quimiocinas; lo cual podría originar que *E. histolytica* pudiera invadir capas profundas del tejido epitelial intestinal, fenómeno asociado con la infiltración de neutrófilos, y al mismo tiempo, *E. histolytica* puede subvertir la respuesta de las células monocíticas controlando el tráfico de éstas, todo lo cual puede contribuir al daño a la mucosa intestinal, y a la diseminación de los trofozoítos de *E. histolytica*. Esta estrategia representa un nuevo mecanismo de evasión de *E. histolytica* de la respuesta inflamatoria regulada por las quimiocinas.

Abstract.

Amoebiasis is an infection caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*, and it is considered to be the third leading cause of death by parasitic disease in the world, surpassed only by malaria and schistosomiasis. Macrophages and neutrophils are associated with the killing of *E. histolytica* trophozoites, and they are also linked with the early stages of inflammation. Inflammation development during amoebiasis and other parasitic diseases is regulated by chemokines, which control the traffic of neutrophils, macrophages and other leukocytes. During invasive amoebiasis, the inflammatory response is triggered in part by CXCL8 and CXCL1 induction, provoking the recruitment of neutrophils to the infection site. This inflammatory response may suffer alterations by secreted proteins from *E. histolytica*, such as cysteine proteases that may act on the extracellular matrix, cytokines or chemokines. Even though leukocytes associated with inflammation development during amoebiasis have been described, we do not have a clear knowledge of the chemokines involved in this inflammatory process and the role played by cysteine proteases from *E. histolytica* in the modulation of this response. We think that secreted cysteine proteases of *E. histolytica* are involved in the modulation of leukocyte traffic during inflammatory response. Thus, the goal of this study was to show the effect of cysteine protease-2 from *E. histolytica* (EhCP2) on chemotactic functions of CC-chemokines (CCL13 and CCL2), which regulate the traffic of monocytes/macrophages; and of CXC-chemokines (CXCL8) which modulate the recruitment of granulocytes. We found that EhCP2 inhibited the chemotactic activity of CCL2 and CCL13 on THP-1 monocytes, but increased the chemotactic effect of CXCL8 on human granulocytes. As a whole, these results lead us to propose that EhCP2 modulates monocyte and granulocyte traffic to the infection site by generating truncated forms of CCL2, CCL13 and CXCL8 with antagonist functions on CC receptors, or agonist effects on CXCR1-2; which as could provoke invasion of *E. histolytica* trophozoites to other epithelial cells of intestinal tissue due neutrophils infiltration, and in the same time, *E. histolytica* also could subvert mononuclear cells controlling the cells traffic, thus contributing to the damage to the intestinal mucosa and the spread of *E. histolytica* trophozoites. This strategy is a novel evasion mechanism of *E. histolytica* from the inflammatory response regulated by chemokines.

Introducción.

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un parásito protozoario que causa la amibiasis, una infección intestinal con una alta prevalencia entre la población mexicana y mundial (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Hasta el momento, en *E. histolytica* se han descrito varias proteínas asociadas a la interacción con el hospedero. De estas proteínas, las proteasas de cisteína han sido relacionadas con la destrucción de proteínas de matriz extracelular, y de proteínas del sistema inmune, tales como inmunoglobulinas y proteínas de complemento (Stanley, 2003).

E. histolytica presenta más de 20 genes que codifican para estas proteasas, pero solo 6 han sido relacionadas con el daño a la mucosa intestinal, y con el ataque a proteínas del sistema inmunitario (Bruchhaus et al., 2003). La EhCP5, por ejemplo, actúa como convertasa de IL-1 β , cuyo efecto se traduce en la inducción de IL-8 (CXCL8), y en el mayor reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, lo cual contribuye a la invasión extraintestinal de los trofozoítos de *E. histolytica* (Zhang et al., 2000). La EhCP2, una proteasa de cisteína que es secretada al contacto con las células del hospedero, podría estar involucrada con la invasión al tejido intestinal y con la evasión al sistema inmunitario; aunque no ha sido demostrado. En la evasión de la respuesta inmune es posible que esta proteasa contribuya a la alteración de la respuesta inflamatoria que está mediada, entre otras moléculas, por quimiocinas, proteínas de bajo peso molecular encargadas de regular el tráfico de leucocitos; asociados con la destrucción de los patógenos (Rot y von Andrian, 2004).

Las quimiocinas divididas en cuatro subfamilias: CC, CXC, Cx3C y CX3, según dos de los cuatro de residuos cisteína cumplen funciones muy importantes en la regulación de la respuesta inmunitaria inflamatoria, y en la homeóstasis del sistema inmunitario (Rossi y Zlotnik, 2000). Varios antecedentes muestran que estas moléculas pueden llegar a ser subvertidas por proteínas codificadas en genes virales y de parásitos helmintos (Maizels et al, 2001; Lalani et al., 2001). Estos hallazgos unidos a la posibilidad de que *E. histolytica* evade la respuesta inflamatoria, nos llevaron a nuestro objetivo principal que fue determinar el efecto de la EhCP2 sobre las actividades biológicas de las quimiocinas de la subfamilia CC, asociadas a la regulación del tráfico

de células monocíticas, y de las quimiocinas de la subfamilia CXC relacionadas a la regulación del tráfico de granulocitos.

Antecedentes Generales.

1. Características generales de las quimiocinas y sus receptores.

Las quimiocinas o citocinas quimioatrayentes son pequeñas proteínas (~8-14 kDa), con cuatro residuos de cisteína conservados que forman 2 enlaces disulfuros (Cis1-3 y Cis 2-4), (Clark-Lewis et al., 1995; Baggiolini, 2001). En base al rearrreglo de los dos residuos de cisteína del extremo NH₂-terminal, las quimiocinas han sido divididas en dos grandes familias, CXC y CC, dependiendo de si los dos residuos de cisteína tienen un aminoácido entre ellos (CXC) o están adyacentes (CC) (Zlotnik y Yoshie, 2000; Rot y von Adrian, 2004). Hasta el momento se han reportado 16 quimiocinas CXC (CXCL1 al 16) y 28 quimiocinas CC (CCL1 al 28), (Figura 1; Tablas 1 y 2). También han sido descritas otras dos clases de quimiocinas, la linfotactina (C), y la fractalcina (CX₃C), con tres residuos de aminoácidos entre los dos residuos de cisteína y tan sólo un residuo de cisteína, respectivamente.

Las quimiocinas fueron clasificadas también como quimiocinas inflamatorias y quimiocinas homeostáticas (Sallusto et al., 2000; Boomker et al., 2005; Moser et al., 2004). Sin embargo, recientemente se encontró que varias de las llamadas quimiocinas homeostáticas ejercen funciones duales y son también expresadas en los procesos inflamatorios (Moser et al., 2004; Rot y von Adrian, 2004).

Las quimiocinas “inflamatorias” controlan el reclutamiento de leucocitos efectores en infecciones, inflamación, daño al tejido y tumores, y entre ellas podemos mencionar a: CXCL6, CXCL8, CXCL1, CXCL2, CCL3, CCL5, CCL7. Boomker et al. (2005), las define como las quimiocinas cuya expresión es inducida después de la activación celular. Por el contrario, las llamadas quimiocinas “homeostáticas” regulan el tráfico de leucocitos vírgenes (*naïve*) durante la hematopoyesis en la médula ósea y timo. Las quimiocinas “homeostáticas” también se han asociado con la inmunidad adaptativa temprana que ocurre en el bazo, nódulos linfáticos y placas de Peyer. Estas quimiocinas promueven también el mantenimiento de los tejidos periféricos (Moser et al., 2004), y están definidas por su expresión constitutiva y restringida a un tejido en particular (Boomker et al., 2005). Algunas de estas quimiocinas son: CXCL12, CXCL13, CXCL14, CCL19 y CCL18. Las quimiocinas con funciones duales, por su parte, son

aquellas que pueden estar asociadas a la respuesta inmunitaria adaptativa, pero también ejercen funciones quimioatrayentes sobre leucocitos no efectores, que incluyen a los leucocitos precursores y maduros en arresto. Dentro de este grupo se encuentran: CXCL9-11, CXCL 16, CCL17, CCL20, CCL22, CCL25, CCL1 (Moser et al., 2004)

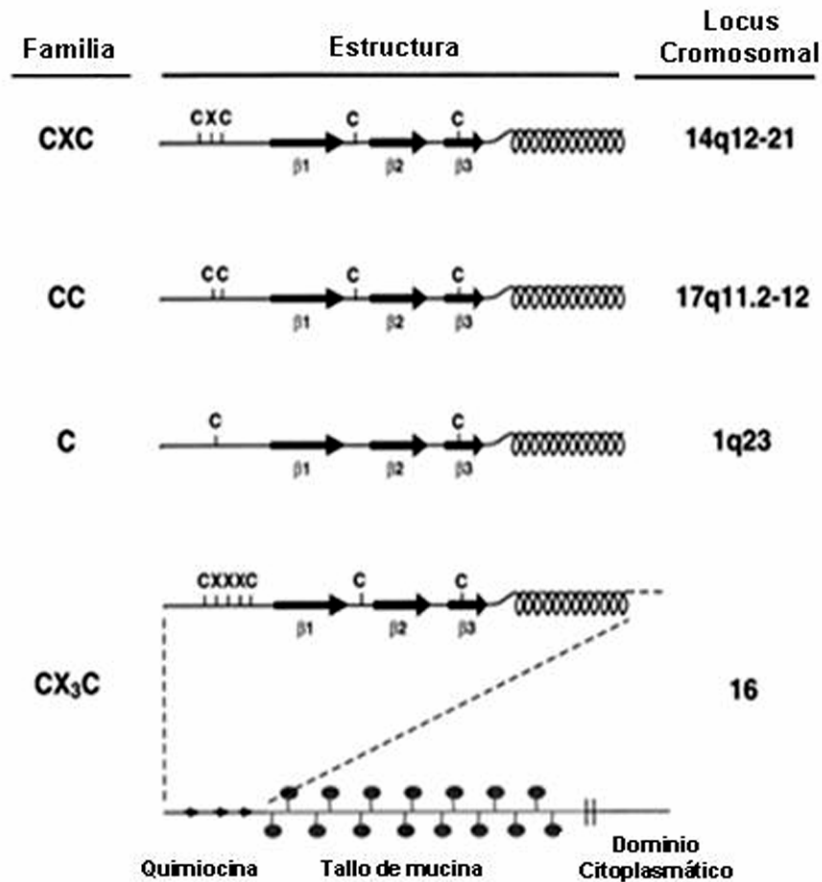


Figura 1. Clasificación de las quimiocinas

Las quimiocinas son muy similares estructuralmente y tienen al menos tres hojas β -plegadas (indicadas como β 1-3) y una α -hélice C-terminal. Muchas de las quimiocinas tienen al menos cuatro residuos de cisteína en una posición conservada, según las cuáles las familias son clasificadas en: CXC, CC, C y Cx₃C, esta ultima familia tiene un dominio de unión a la membrana. Adicionalmente se muestran los cromosomas que contienen los genes para estos grupos de quimiocinas. Fuente: Rollins, 90: 909-928, 1997.

Las quimiocinas se presentan como polipéptidos de 70 a 80 residuos de aminoácidos con una homología en la secuencia de los aminoácidos muy sustancial, por ejemplo, entre los miembros de la subfamilia MCPs: CCL2, CCL7, CCL8 y CCL13 y Eotaxina (CCL11) la homología es del 56-71%.

Las quimiocinas pueden presentarse como homodímeros, pero recientemente se encontró que estas moléculas pueden asociarse en heterodímeros y potenciar su actividad (Paoletti et al. 2005). El monómero de CXCL8, una de las quimiocinas mejor estudiada, tiene una región NH₂-terminal desordenada, una región en forma de lazo (“loop”), tres hebras-β- antiparalelas y una α-hélice COOH-terminal (Figura 1). En el dímero de CXCL8, las hebras-β forman seis hojas β-plegadas con las hélices atravesando este (Clark-Lewis et al., 1995).

Las quimiocinas interactúan con receptores acoplados a proteínas G heterotrimerica, que poseen 7 dominios transmembranales. Hasta el momento, se han identificado 18 receptores para quimiocinas, de los cuáles 6 receptores unen quimiocinas CXC (CXCR1-6), diez receptores unen quimiocinas CC (CCR1-10), el receptor que une linfocitina (XCR1), el receptor que une fractalcina, y el receptor del antígeno Duffy (DARC), que une tanto quimiocinas CC como CXC (Murdoch y Finn, 2000; Rot y von Adrian 2004). Adicionalmente, existen receptores de origen viral que también unen quimiocinas (Boomker et al., 2005). La interacción de las quimiocinas CXC con el receptor respectivo ocurre principalmente a través del región ERL (Glu-Arg-Leu) del extremo NH₂-terminal, y en el caso de las quimiocinas CC, los primeros 10 aminoácidos de la región NH₂-terminal son indispensables para la interacción (Clark-Lewis et al., 1995).

Un receptor de quimiocinas puede estar constituido por 350 aminoácidos, el extremo NH₂-terminal es extracelular, y puede estar sulfatado sobre los residuos de tirosina. El dominio COOH-terminal de los receptores de quimiocinas es intracelular y contiene residuos de serina y treonina que constituyen sitios de fosforilación. Los dominios transmembranales son 7 α hélices, con tres lazos extracelulares e intracelulares compuestos de aminoácidos hidrofóbicos, orientados perpendicularmente a la membrana. Estos receptores contienen puentes disulfuros altamente conservados en el lazo extracelular 1 y 2. Las proteínas G heterotrimericas están acopladas en el segmento COOH-terminal y posiblemente en el tercer lazo del dominio intracelular (Murdoch y Finn, 2000; D’Ambrosio et al., 2003; Rot y von Adrian, 2004).

Tabla 1. Quimiocinas CC

Subfamilia CC	Nomenclatura actual	Receptor
I-309	CCL1	CCR8
MCP1	CCL2	CCR2
MIP1 α	CCL3	CCR1, 5
MIP1 β	CCL4	CCR5
RANTES	CCL5	CCR1,2,5
MCP3	CCL7	CCR1,2,3
MCP2	CCL8	CCR3
EOTAXINA	CCL11	CCR3
MCP4	CCL13	CCR2,3
HCC-1	CCL14	CCR1
HCC-2	CCL15	CCR1,3
HCC-4	CCL16	CCR1,2,5
TARC	CCL17	CCR4
DC-CK-1	CCL18	?
MIP-3 β	CCL19	CCR7
MIP-3 α	CCL20	CCR6
6Ckine	CCL21	CCR7
MCD	CCL22	CCR4
MPIF-1	CCL23	CCR1
MPIF-2/EOTAXINA-2	CCL24	CCR3
TECK	CCL25	CCR9
EOTAXINA-3	CCL26	CCR3
CTACK	CCL27	CCR10
MEK	CCL28	CCR3,10

FUENTE: Comerford and Nibbs. Immunology Letters, 96: 163-174, 2005

Tabla 2. Quimiocinas CXC

Subfamilia CXC	Nomenclatura actual	Receptor
GRO α	CXCL1	CXCR2, 1
GRO β	CXCL2	CXCR2
GRO γ	CXCL3	CXCR2
PF4	CXCL4	CXCR3B
ENA-78	CXCL5	CXCR2
GCP-2	CXCL6	CXCR1, 2
NAP-2	CXCL7	CXCR2
IL-8	CXCL8	CXCR1,2
Mig	CXCL9	CXCR3A/B
IP-10	CXCL10	CXCR3A/B
I-TAC	CXCL11	CXCR4
SDF-1 α/β	CXCL12	CXCR5
BLC	CXCL13	CXCR5
BRAK/BOLEKINA	CXCL14	?
LUNGKINE	CXCL15	?
—	CXCL16	CXCR6

FUENTE: Comerford and Nibbs. Immunology Letters, 96: 163-174,2005

Una de las principales funciones de las quimiocinas es la regulación del tráfico celular, el cual esta mediado por la interacción de un ligando de quimiocina con un receptor acoplado a proteína G, que induce la reorganización del citoesqueleto necesaria para la migración de los leucocitos. Esta migración celular obedece a un gradiente de quimiocinas formado por la unión de las quimiocinas a heparan sulfato, presentes en la superficie de las células endoteliales, y denominados glicosaminoglicanos (GAGs), (Alberts et al., 1994).

Los GAGs, polisacáridos cargados negativamente están unidos a un núcleo de proteínas y forman lo que se conoce como proteoglicanos. Estas moléculas sirven como anclaje de las quimiocinas, las cuáles por ser moléculas básicas se unen de forma electrostática a los GAGs por el extremo carboxilo terminal, como en el caso de

CXCL8, o el extremo aminoterminal, como en el caso de CCL3. Esta unión promueve la presentación de las quimiocinas a las células, por ejemplo CCL4 inmovilizada a proteoglicanos induce la adhesión de las células T a los ligandos de las integrinas. Se ha reportado que CXCL8 y CCL5 se unen a heparan sulfatos de la matriz extracelular e inducen la adhesión y la migración transendotelial de leucocitos (Middleton et al., 2002; Boomker et al., 2005).

Por otro lado, las quimiocinas en su forma soluble pueden ser monómeros, dímeros u oligómeros en alto orden, propiedad que en el caso de CXCL8 o CCL5 determina una mayor afinidad por los proteoglicanos, y está asociada con la formación de diferentes gradientes de quimiocinas (Boomker et al., 2005).

Las quimiocinas también interaccionan con el endotelio a través de DARC, un receptor de quimiocinas que no está acoplado a proteínas G. DARC está asociado con la captura y en la endocitosis/transcitosis de las quimiocinas (Middleton et al., 2002). Estudios realizados *in vivo* demuestran que CCL5, CCL2 y CCL7 colocalizan con DARC en el endotelio vascular, y en endotelio de los vasos linfáticos aferentes (Rot, 2003).

La formación del gradiente de quimiocinas es fundamental para la activación de integrinas y otras moléculas de adhesión que están involucradas en la adhesión y en la posterior extravasación de los leucocitos, ambos procesos integrados en un modelo de 4 pasos o de secuencias (Springer 1994; Butcher, 2003; Rot y Von Adrian, 2004), en el cual, los leucocitos primero interaccionan con baja afinidad con las células endoteliales (*tethering*), y posteriormente por acción de la presión del flujo sanguíneo se acercan aun más al endotelio, en un paso conocido como movimiento rotatorio (*rolling*); ambos pasos dependen de selectinas, glicoproteínas transmembranales tipo-I, y de integrinas de la subfamilia α_4 , miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El rodamiento de los leucocitos induce cambios de afinidad de las integrinas α_4 y/o β_2 , inducido por cambios conformacionales (Qin et al., 2004). Los leucocitos, por último, se adhieren firmemente al endotelio, y transmigran a través de las células que lo integran hacia el gradiente de quimiocinas (Rot y Von Adrian, 2004), (Figura 2).

La trasmigración de los leucocitos es también una serie de eventos en los cuáles selectinas e integrinas interaccionan e inducen señales intracelulares que

conducen a la separación de moléculas que forman parte de las uniones fuertes intercelulares (*tight junctions*), tales como, las JAM (*junctions adhesion molecules*), perteneciente a la subfamilia de las inmunoglobulinas, y al subsiguiente paso del leucocito por entre las células endoteliales (van Buul y Hordijk, 2004; Imhof y Aurrand-Lions, 2004). Por ensayos de colocalización se demostró que la trasmigración de los linfocitos a través del endotelio depende de LFA-1 (*lymphocyte functions-associated antigen-1*) y de su interacción con ICAM-1 y/o PECAM-1, inicialmente, y posteriormente de la interacción de LFA-1 con JAM-1, lo cual abre una especie de brecha por la cual pasan los leucocitos, y este evento ha sido demostrado por colocalización con anticuerpos contra caderina, una molécula que conforma las uniones ocluyentes entre las células endoteliales (Aurrand-Lions et al., 2002; van Buul y Hordijk, 2004).

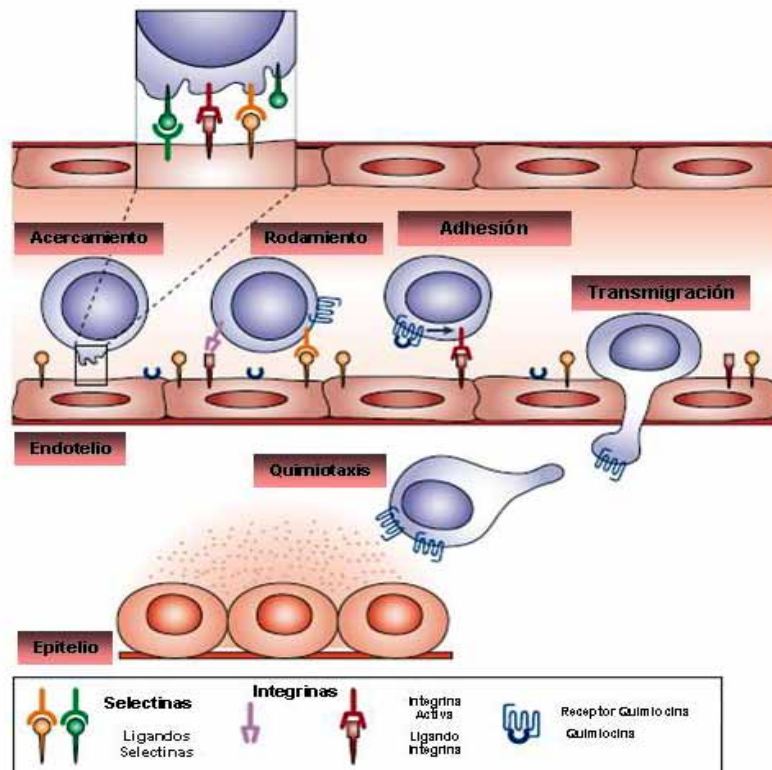


Figura 2. Reclutamiento celular: un proceso secuencial de cuatro pasos.

Los leucocitos que están en circulación pueden acercarse al endotelio e interactuar con baja afinidad por medio de selectinas o de integrinas. La activación de integrinas por quimiocinas en la superficie del leucocito provocan la adhesión firme al endotelio, propiciando la trasmigración de los leucocitos a través del endotelio hacia el gradiente de quimiocinas. Fuente: Kunkel y Butcher, *Nature Immunology*, 3:822-829, 2003.

1.2. Funciones de las quimiocinas y sus receptores.

1.2.1. Papel de las quimiocinas y sus receptores en el desarrollo de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

En general, las quimiocinas y sus receptores regulan el tráfico de los linfocitos T durante la respuesta inmunitaria, el tráfico de células dendríticas y otras células presentadoras, constituyendo un puente entre la respuesta inmunitaria innata y adquirida (Stein et al., 2005; Randolph et al., 2005). Además, las quimiocinas y sus receptores regulan el reclutamiento de leucocitos que mantienen la estructura de los órganos linfoides y algunas quimiocinas juegan un papel importante en la angiogénesis y angiostasis de vasos sanguíneos, y por lo tanto en la generación de tumores, y en metástasis de células tumorales. Recientemente, se ha encontrado que las quimiocinas pueden ejercer también funciones antimicrobianas contra diversos microorganismos: bacterias y hongos.

Las quimiocinas y sus receptores son la clave en la respuesta inmunitaria innata al regular el tráfico de monocitos y neutrófilos. Esta regulación está dada por el reconocimiento inicial de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMs) por receptores membranales tipo Toll, los cuáles activan vías de señalización que aumentan la expresión tanto de quimiocinas CC como CXC de macrófagos y de células dendríticas (Luster, 2002; Coelho et al., 2005). Más específicamente, las quimiocinas CXC y sus receptores han sido involucradas en la inmunidad innata debido al efecto que ejercen sobre los neutrófilos. Las quimiocinas CC también están asociadas a la inmunidad innata, especialmente los receptores CCR1 que se expresan sobre monocitos (Luster, 2002).

La inmunidad adquirida se ha asociado con los receptores CC, tales como CCR2, 4, 5 y 8 y sus ligandos, y muchos de estos receptores están relacionados también con algunos eventos iniciales de la inmunidad innata, tales como la activación de macrófagos (Coelho et al., 2005). El tráfico de los linfocitos T y B dentro de los órganos linfáticos está mediado por las quimiocinas CCL18, CCL22, CCL20, CCL21 y CCL19, inducidas por el estroma de los nódulos linfáticos y por las células dendríticas, y está asociado también con el reclutamiento de células dendríticas cargadas de

antígenos a nódulos linfáticos donde ocurre la presentación de antígenos a las células T (Luster, 2002).

Las quimiocinas y sus receptores inducen también el reclutamiento de los linfocitos T y contribuyen a la diferenciación de la respuesta inmunitaria. Sallusto et al. (1998), encontraron que los receptores CCR5 y CXCR3 se expresan en células T del subtipo-1 (T_H1), principalmente; mientras que los receptores CCR3, y CCR4 se asocian a las células T del subtipo-2 (T_H2). Uno de los inductores de CCR5 sobre los linfocitos T es la interleucina-12 (IL-12) que esta ligada a la respuesta T_H1 . Adicionalmente, CCL11, CCL13 CCL24, CCL26, CCL17 y CCL1 son ligandos que se han asociado con el subtipo T_H2 y se expresan en inflamaciones alérgicas (García et al., 1996; García et al., 1996; Sallusto et al.1998; Loetscher et al; 1998; Luster, 2002; Wong y Fish, 2003; Rot y von Adrian, 2004).

1.2.2. Papel de las quimiocinas y sus receptores en la homeóstasis del sistema inmunitario.

Las quimiocinas y sus receptores participan en la organización de los órganos linfoides primarios y secundarios. La migración de los timocitos durante el desarrollo esta mediada por CXCL12, CCL25 y CCL21, cuya expresión inducida por las células estromales del timo (Sallusto, et al, 2000; Rossi y Zlotnik, 2000; Ohl et al., 2003). En ausencia de CXCR4, el receptor para CXCL12, se han observado defectos en el reclutamiento de los progenitores de las células T o en su desarrollo (Ohl et al., 2003). Similarmente, precursores de linfocitos T provenientes de ratones deficientes en CCL21 muestran también deficiencias en la migración al timo, y en la colonización del timo con respecto a ratones silvestres (Liu et al., 2005). De la misma manera, ratones deficientes en CCR9, el receptor para CCL25, presentan deficiencias en la repoblación de linfocitos T en el timo, indicando que este receptor y su ligando están también asociados con la regulación del tráfico de las células progenitoras de T de medula ósea al timo, (Uehara et al., 2002).

Otro receptor involucrado en la regulación de la migración de los precursores de linfocitos T es CCR7, receptor que une CCL19 y CCL21. Ratones deficientes en el receptor CCR7 presentan una arquitectura anormal del timo, con zonas de la médula y

corteza reducidas como resultado de la alteración del tráfico de los linfocitos T maduros que se acumulan en la corteza del timo (Ueno et al., 2004).

Similarmente, algunos receptores de quimiocinas están asociados a la migración de los precursores de los linfocitos B en la medula ósea (Ohl et al., 2003). CXCR4 y CXCR5, y sus ligandos están asociados con la migración de precursores de linfocitos B y con la organización del centro germinal. La deficiencia de los receptores CXCR4 y CXCR5 produce alteraciones en la organización del centro germinal (Allen et al., 2004).

Por otra parte, las quimiocinas están también involucradas en los procesos de angiogénesis que generan el crecimiento de nuevos vasos, y se producen durante la embriogénesis y el ciclo menstrual (Strieter et al., 2005). Quimiocinas de la familia CXC regulan principalmente este proceso de diferentes maneras; las quimiocinas CXC que inducen la angiogénesis y cuya característica es la presencia en extremo amino-terminal de una secuencia de aminoácidos ELR (Glutamina-Leucina-Arginina), y las quimiocinas que inhiben la angiogénesis o las denominadas quimiocinas angiostáticas (inhibición de la formación de vasos y arterias), cuya característica es que no presentan la secuencia ELR, y son generalmente inducidas por IP-10 (CXCL10), (Moore et al, 1998; Strieter et al., 2005).

Las quimiocinas ELR relacionadas con angiogénesis son: CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8. CXCL8, por ejemplo, promueve la proliferación y la sobrevivencia de las células endoteliales. Uno de los receptores involucrados en la actividad proangiogenica de las quimiocinas CXC con la secuencia ELR es el receptor CXCR2 que regula la migración de las células endoteliales (Heidenmann et al, 2003).

Las quimiocinas sin la secuencia ELR, por el contrario, tienen fuerte actividad inhibidora de los factores angiogénicos e incluyen quimiocinas, tales como, CXCL4, 9,10, 11 y CXCL14. Las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 inducidas por el interferón tipo I, y por el interferón tipo II inhiben factores angiogénicos, tales como, el factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares, y reducen la quimiotaxis de las células endoteliales (Strieter et al., 2005). El receptor que está implicado en la inhibición de la quimiotaxis de las células endoteliales parece ser CXCR3B; la unión de

CXCL10 con este receptor reduce el crecimiento de células tumorales (Strieter et al., 2005).

1.2.3. Otras funciones de las quimiocinas.

Las quimiocinas también pueden actuar como agentes antimicrobianos. La actividad antimicrobiana de las quimiocinas fue observada inicialmente en quimiocinas de la subfamilia CXC, tales como: CXCL7 (Dürr y Peschel, 2002).

Las quimiocinas, CXCL4 y CCL5 derivadas de plaquetas presentaron actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans* (Tang et al., 2002). Cole et al. (2001), también demostraron que las quimiocinas inducidas por interferón, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 tenían actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Más recientemente, Yang et al (2003), encontraron que CCL20 y otras quimiocinas de la subfamilia CC: CCL11, CCL13, CCL17, CCL18 y CCL19, principalmente, presentaron actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Estos investigadores proponen que el mecanismo del efecto antimicrobiano, está asociado con la formación de pequeñas áreas en la superficie de las quimiocinas compuestas de aminoácidos cargados positivamente, que en conjunto constituyen un dominio catiónico y que interacciona con la superficie de las bacterias.

2. Quimiocinas CC.

Las quimiocinas de la familia CC, que incluyen varias quimiocinas (Tabla 1), y a las llamadas MCPs (*monocyte chemoattractant proteins*) y a las eotaxinas, comparten entre si más del 60% de homología y juegan un papel importante no sólo en la migración de los leucocitos, sino también en la liberación de enzimas, expresión de moléculas de adhesión y liberación de histamina (Pivarcsi y Homey, 2005; García et al., 2005).

Las quimiocinas MCPs (MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP3/CCL7, y MCP4/CCL13 inducen estas funciones en una gran gama de células del sistema inmunitario: monocitos, linfocitos, basófilos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos (Van Coillie et al., 1999; Haringman et al., 2000; Yamamoto et al., 2005).

Las quimiocinas MCPs son producidas por varias células, tejidos, leucocitos y células tumorales, y su expresión es disparada por citocinas proinflamatorias, principalmente: IL-1 β , TNF- α e INF- γ (Proost et al., 1996; Van Coillie et al., 1999; Moschizuki et al., 1998; Votta et al. 2000; Woodworth et al., 2004), siendo la mayor fuente de las MCPs las células endoteliales, fibroblastos y células monocíticas (Proost et al., 1996; Van Coillie et al., 1999; García y Humbert, 2005). Sin embargo, otros tipos de células también pueden producir MCPs, por ejemplo la microglia produce MCPs bajo ciertos estímulos (Van Coillie et al., 1999). Para fines de este estudio sólo se mencionarán las quimiocinas CCL2 por su participación en el ataque a parásitos protozoarios, y la CCL13 por que aunque está asociada con inflamación en enfermedades alérgicas, su papel en el desarrollo de la respuesta inmunitaria contra parásitos no ha sido elucidado todavía.

CCL2 o MCP1 es la quimiocina de la familia CC más estudiada, ha sido asociada a la regulación de la migración de monocitos/macrófagos durante la respuesta inflamatoria. CCL2 es secretada por células endoteliales, fibroblastos, células monocíticas, células cebadas, eosinófilos, neutrófilos estimulados con TNF α , células T (Huffnagle et al., 1995; Gu et al., 1997; Van Coillie et al., 1999; Yamashiro et al., 1999; Krupa et al., 2004; Becker, 2005). Células epiteliales, astrocitos y microglia son también capaces de producir esta quimiocina, luego de la estimulación con IL-1 β , TNF α , INF γ , principalmente (Proost et al., 1996; Struyf et al., 1998).

CCL2 al igual que las otras quimiocinas de la subfamilia de las MCPs es capaz de inducir la liberación de enzimas por monocitos y basófilos, así como, la liberación de ácido araquidónico por monocitos (Proost et al., 1996). CCL2 también ha sido involucrada en la inducción del estallido respiratorio en células infectadas por patógenos. Altas concentraciones de CCL2 indujeron un aumento en los niveles de NO (óxido nítrico), en macrófagos infectados con *Trypanosoma cruzi* (Villalta et al., 1998), lo cual está asociado con la destrucción de este parásito. CCL2 es capaz de atraer monocitos, basófilos, células NK y células T de memoria, al interaccionar con el CCR2B, receptor por el cual tiene alta afinidad. CCL2 y su receptor cumplen un papel importante en la diferenciación hacia una respuesta T_H1, como se ha visto en modelos

de infección con *Cryptococcus neoformans* (Needham et al., 1996; Chensue et al., 1996; Traynor et al., 2002).

CCL2 actúa como regulador de la migración de monocitos y de la diferenciación de los linfocitos T en las infecciones por patógenos. CCL2 esta involucrada en la regulación de la respuesta inmunitaria contra *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* induciendo la eliminación de estos parásitos (Brenier-Pinchart et al., 2001). CCL2 induce el estallido respiratorio en monocitos infectados con *Leishmania* por ejemplo, y puede inhibir la replicación de protozoarios parásitos intracelulares, tales como *Toxoplasma gondii* (Mannheimer et al., 1996; Aliberti et al., 1999; Brandonisio et al., 2002; Bhattacharyya et al., 2002; Robben et al., 2005). Una desregulación de CCL2 en la toxoplasmosis, que está relacionada con la proliferación de los taquizoítos de *Toxoplasma gondii* en fibroblastos humanos, mostró que el desbalance en la expresión de esta quimiocina suprime la diferenciación de las células T aumentando la sobrevivencia del parásito (Brenier-Pinchart et al., 2000; Del Río et al., 2004). Así mismo, ratones deficientes en CCL2, infectados con *Trichuris muris*, no expulsaban estos nematodos, aumentado la carga parasitaria (deSchoolmeester et al., 2003). De la misma manera, una alta expresión de CCL2 estaba también asociada con la susceptibilidad a infecciones por *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Salmonella enterica* (DePaolo et al., 2005).

Esta quimiocina se ha asociado también a enfermedades inflamatorias, como: aterosclerosis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide o nefropatías por diabetes (Van Coillie et al., 1999; Takashi et al. 2003; Sheikine y Hansson, 2004; Bartosik-Psujek y Stelmasiak, 2005). Las enfermedades inflamatorias del intestino también están asociadas con alta expresión de RNA-mensajeros de CCL2, en células endoteliales y células del músculo liso de la mucosa inflamada (Grimm et al., 1996; García y Humbert, 2005).

CCL13 o MCP4 es una quimiocina de entre 9 a 8.5 kDa perteneciente también a la subfamilia de las MCPs que se expresa en varios órganos humanos, especialmente en el intestino delgado y colón (García-Zepeda et al., 1996; Godiska et al., 1996). Células endoteliales y epiteliales expresan CCL13 estimuladas con TNF α ,

interferón- γ , interleucina-1 e interleucina-4, (García-Cepeda et al., 1996; Stella too et al., 1997; Petering et al., 1998; Nakamura et al., 2001; Meyer et al., 2003; Woodworth et al., 2004). Al igual que las otras MCPs, CCL13 se expresa en monocitos y eosinófilos e induce potentemente el reclutamiento de monocitos y eosinófilos aislados de sangre periférica humana y células monocíticas (García-Zepeda et al., 1996; Godiska et al., 1996; Kalayci et al., 2004; Pivarcsi y Homey, 2005).

Esta quimiocina interacciona con CCR2B y CCR3, receptores estos que pueden ser expresados sobre monocitos y eosinófilos, provocando la movilización de calcio intracelular. En un ensayo de unión a receptores celulares (*Binding*), en monocitos aislados de sangre periférica, se encontró que CCL13 era capaz de desplazar la unión de CCL5 I¹²⁵ y CCL2 I¹²⁵ al receptor, y más específicamente CCL13 fue capaz de desplazar la unión de CCL2 I¹²⁵ a CCR2B con alta afinidad (Berkhout et al. 1997).

CCL13 se encuentra altamente expresada en tejidos epiteliales respiratorios de pacientes con enfermedades alérgicas o inflamatorias. Lamkhioued et al. (2000), usando la hibridación *in situ*, con una sonda de RNA antisentido de CCL13 marcada fluorescentemente, sobre cortes de tejido de pacientes con asma, encontraron que el epitelio respiratorio de estos pacientes había alta expresión del RNA mensajero de CCL13, y una mayor cantidad de la proteína sobre el epitelio respiratorio, indicado con ello que CCL13 está asociada con enfermedades inflamatorias. Se encontraron también altos niveles de CCL13 en pacientes con glomerulonefritis, una hibridación *in situ* demostró el incremento de en zonas peritubulares, tubulares, y en células epiteliales del glomérulo del riñón inflamado (Chakravorty et al., 2001). CCL13 también se ha encontrado altamente expresada en varias otras enfermedades, tales como la aterosclerosis (Berkhout et al., 1997; Sheikine y Hansson, 2004).

3. Quimiocinas CXC.

Las quimiocinas de la familia CXC y sus receptores están asociadas principalmente con la regulación de la angiogénesis y algunos de sus miembros están involucrados con la progresión de tumores y con la metástasis (Romagnani et al., 2004; Rosenkilde y Schwartz, 2004).

Las quimiocinas CXC contienen un tripéptido presente en el amino-terminal de la molécula que se ubica antes de la primera cisteína ERL (Glu-Leu-Arg), que es un sitio crítico para la interacción con el receptor (Clark-Lewis et al., 1995), y para su función, ya que las quimiocinas CXC con el tripéptido ERL actúan a través de los receptores CXCR1 y CXCR2. Algunas quimiocinas CXC no contienen este motivo en el extremo amino-terminal (CXC —ERL), y actúan sobre linfocitos por medio de CXCR3 y CXCR4 (Rollins, 1997; Segerer et al., 2000). Las quimiocinas de la familia CXC y sus receptores son expresados por células endoteliales, fibroblastos, neutrófilos, células dendríticas, células T y B, células asesinas naturales y eritrocitos (Tabla 2), (Rollins, 1997; Segerer et al., 2000; Christopherson y Hromas, 2001; Romagnani et al., 2004). En general, éstas quimiocinas son inducidas por interleucina-1 β y TNF α , y algunas quimiocinas CXC son inducidas por INF γ , tales como CXCL10 (Segerer et al., 2000). Para fines de este estudio sólo se describirá brevemente la quimiocina CXCL8, quimiocina involucrada en el tráfico de neutrófilos durante la repuesta inflamatoria desarrollada en la amibiasis.

CXCL8 ó IL8 es una de las quimiocinas de la familia CXC mejor estudiada, se sintetiza como una proteína precursora de 99 aminoácidos con un péptido señal que es cortado a una proteína de entre 72 a 77 aminoácidos (Matsushima et al., 2001). Adicionalmente, CXCL8 es procesada, por proteasas liberadas por neutrófilos, en el extremo aminoterminal a formas truncadas de entre 69 a 77 aminoácidos que aumentan su actividad, así la forma de 69 aminoácidos ejerce una potente actividad quimiotáctica con respecto a las otras formas truncadas de la CXCL8 (Yoshimura et al., 1989; Hebert et al., 1990; Nakagawa et al., 1991; Padrines et al., 1994; Van Damme et al., 1990; Mukaida, 2003).

CXCL8 es producida por monocitos, linfocitos T, neutrófilos, células asesinas naturales, células endoteliales, células epiteliales, y fibroblastos (Van Damme et al., 1989; Mukaida, 1992; Hammond et al., 1995; Morohashi et al., 1995; Mukaida, 2000; Sparkman et al., 2004; Bruslerud et al., 2004 Lin et al., 2005), por la acción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 y TNF α . Fitzgerald et al. (2002), encontraron, en células epiteliales del esófago de pacientes con reflujo esofágico, que CXCL8 era inducida por IL1 β .

CXCL8 se une a los receptores CXCR1 y CXCR2 con alta afinidad, estimulando la migración y la activación de los neutrófilos (Murphy y Tiffany, 1991; Holmes et al., 1991; Suzuki et al., 1994; Trettel et al., 2003; Li et al., 2004). Schroder et al., (1989), encontraron que CXCL8 induce la degranulación, activa el estallido respiratorio, y provoca la activación de la lipoxigenasa-5 que origina la liberación de mediadores inflamatorios derivados del ácido araquidónico. CXCL8 actúa también sobre basófilos, y en presencia de IL-13 propicia la liberación de histamina (Dahinden et al., 1989).

CXCL8 está asociada con varias afecciones inflamatorias, como enfermedades respiratorias ocasionadas por infecciones bacterianas (Mukaida, 2003; Talavera et al., 2004). En el esputo de pacientes con bronquitis crónica, infectados con *Haemophilus influenzae*, se encontraron altos niveles de CXCL8 y de TNF α (Sethi et al., 2000). CXCL8 también se ha encontrado involucrada con otras enfermedades respiratorias, como el asma, fibrosis ideopática pulmonar y con el síndrome agudo respiratorio (Mukaida, 2003; Krupa et al., 2004). CXCL8 regula la inflamación en la glomerulonefritis, uveítis idiopática intermedia, esofagitis, esófago de Barrett's y otros desordenes digestivos (Mukaida et al., 1998; Klok et al., 1998; Daig et al., 2000; Fitzgerald et al., 2002; Savage et al., 2004).

Miembros de las quimiocinas de la familia CXC y CXCL8 regulan también la respuesta inflamatoria en varias infecciones por parásitos helmintos y protozoarios. *In vivo*, el infiltrado inflamatorio provocado por *Cryptosporidium parvum* presentó neutrófilos relacionados con la inducción de CXCL1 y 2 (Laurent et al., 1997; Lacroix-Lamandé et al., 2002). En la amibiasis, las quimiocinas-CXC también han sido observadas. Seydel et al. (1997), *in vivo*, observaron que CXCL1 y CXCL8 estaban asociadas con el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, y con la formación de abscesos hepáticos amibianos. Las quimiocinas CXC también están involucradas en la formación de los granulomas, observados en varias infecciones parasitarias. Una alta expresión de CXCR3 y de sus ligandos CXCL10 y CXCL9 esta ligada a la migración de eosinófilos y a la formación de los granuloma durante la infección por *Schistosoma japonicum* (Li et al., 2004).

4. *Entamoeba histolytica*.

4.1. El parásito.

Entamoeba histolytica es un parasito protozoario que provoca la amibiasis humana, y tiene un ciclo de vida en el cual se han identificado dos formas: Un quiste o forma infectiva y un trofozoíto o forma vegetativa que se multiplica.

El ciclo de vida de este parásito inicia con la ingesta de los quistes (10-20 μm de diámetro), contenidos en agua o alimentos contaminados con heces fecales humanas, en donde pueden permanecer viables entre 10-30 días. Las condiciones que contribuyen a la transformación de los trofozoítos en quistes no están completamente esclarecidas, pero varios trabajos señalan la participación de moléculas como la lectina Gal/GalNAc, proteasas de cisteína y de serina, en presencia de galactosa, glucosa y varios minerales. Aparentemente, un paso previo a la formación del quiste es la agregación de los trofozoítos que depende del contacto propiciado por la lectina Gal/GalNAc (Riahi y Ankri, 2000; Carranza-Rosales et al., 2000; Eichinger, 2001; Barrón-González et al., 2005). El desenquistamiento de los trofozoítos ocurre en el intestino delgado, por mecanismos aún no determinados completamente. Los trofozoítos (20-30 μm) migran al intestino grueso y al colón donde se alimentan de bacterias y otros contenidos intestinales y se transforman en quistes, que serán expulsados al medio ambiente a través de las heces (Figura 3).

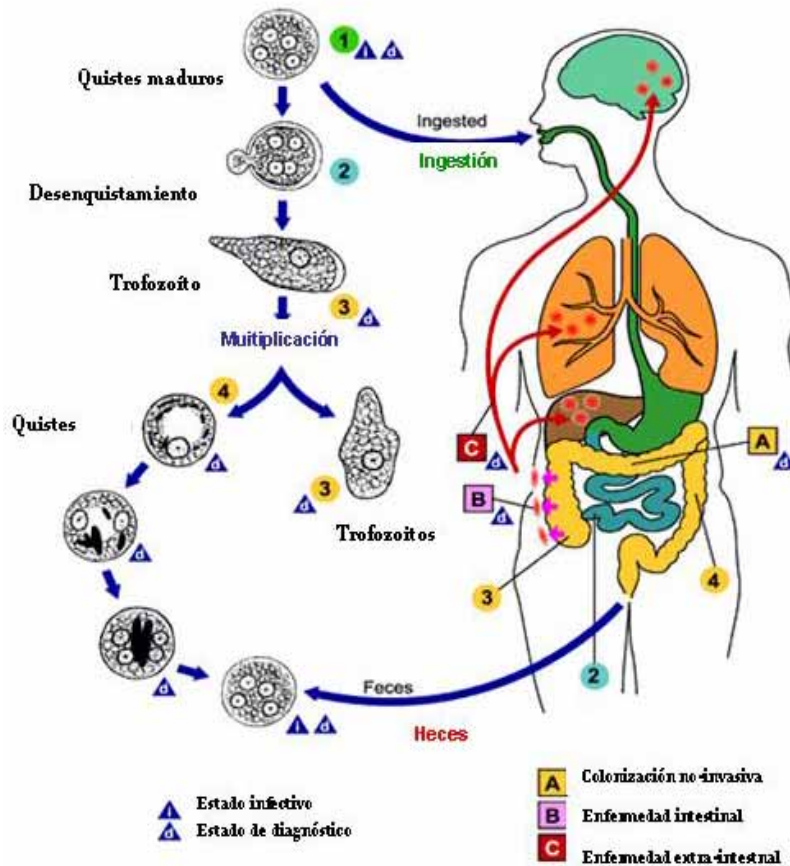


Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

❶ La Infección por *E. histolytica* ocurre por la ingesta de quistes maduros, ❷ el desenquistamiento ocurre en el intestino delgado, y ❸ los trofozoitos son liberados y migran al intestino grueso. Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria y producen quistes, ❹ los quistes pasan en las heces, debido a la protección conferida por sus paredes, los quistes sobreviven hasta semanas en el ambiente y son responsables de la transmisión. *E. histolytica* causa una enfermedad intestinal: amibiasis. La amibiasis puede, en condiciones aún no determinadas, convertirse en una infección invasiva y causar complicaciones como la formación de abscesos hepáticos (A, B y C). Fuente: *Entamoeba Homepage*.

4.2. Amibiasis.

Es una infección, cuya estadística la ubican dentro de las tres primeras infecciones por parásitos en países subdesarrollados. Aunque, en países desarrollados existen casos de esta infección sobre todo entre viajeros (Petri et al., 2001). Un informe clásico de la WHO mostró, mediante análisis serológicos y parasitológicos imprecisos,

que los casos de amibiasis (incluyendo la colitis amibiana y los abscesos hepáticos), se acercan a 50 millones de personas y que ocurren alrededor de 100,000 muertes/año en varias partes del mundo (Petri et al., 2001; Stanley 2003; Huston, 2004). Sin embargo, las cifras exactas de la incidencia de la amibiasis no son conocidas debido en parte a que muchos de los análisis usados para la detección de la *E. histolytica* no contemplan *Entamoeba dispar* (*E. dispar*), una amiba que no está asociada a la amibiasis.

Gatti et al. (2002), examinaron la presencia del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*, en una población de niños con 9.5 años de una escuela elemental de Ecuador, y encontraron que la prevalencia de *E. dispar* fue mayor que la de *E. histolytica* entre los sujetos analizados. Otro trabajo realizado en niños (1-12 años de edad), en el Hospital Infantil de México, mostró también que la incidencia de *E. dispar* es mucho mayor (82%) que *E. histolytica* (18%) (Bernal et al., 2000). Aunado a esto, muchas de las técnicas utilizadas para la detección de *E. histolytica* no son tan sensibles y en algunos casos pueden existir falsos negativos. Petri et al. (2001), mostraron, en un estudio realizado en niños de Dhaka (Bangladesh), que el número de niños positivos a *E. histolytica* era mayor cuando se utilizaba la técnica de PCR que cuando se usaba la técnica de detección de parásitos en heces. Nuevos estudios que combinan RT-PCR con ELISA aumentan el rango y la sensibilidad en la detección de *E. histolytica* en muestras de heces, y provenientes de punciones hepáticas de pacientes con abscesos hepáticos (Roy et al., 2005).

Desde el punto de vista epidemiológico, la amibiasis ha sido analizada en áreas endémicas de la infección, y la prevalencia real y la caracterización de la amibiasis han sido determinadas. Un estudio realizado en Dhaka, con niños entre 2-7.6 años de edad con episodios diarreicos frecuentes, mostró que la incidencia del parásito es alta (82.47%), pero que sólo un pequeño porcentaje de los episodios diarreicos estaban asociados a *E. histolytica*, y sólo entre el 12% al 25% de los niños infectados desarrollaban amibiasis invasiva, y que una buena proporción de los niños infectados con *E. histolytica* no mostraban síntomas (Haque et al., 2003).

En una población mayor de 20 años en Vietnam (región de alta prevalencia del parásito) se demostró, mediante PCR de muestras de heces, que sólo un 11% de la población en estudio (383), eran positivos para *E. histolytica* y permanecieron

asintomáticos durante el periodo de estudio. La infección por *E. histolytica* puede persistir por más de un año en algunos individuos, pero algunos otros resuelven la infección con una terapia apropiada (Blessmann et al., 2003).

Estos trabajos plantean que la amibiasis es frecuente en zonas endémicas para esta infección, pero que un buen porcentaje de los sujetos infectados con *E. histolytica* no desarrollan síntomas, ni una infección invasiva, como fue confirmado recientemente por Ramos et al. (2005). Por otro lado, este parásito puede persistir alrededor de un año en los individuos infectados sin tratamiento y la posibilidad de re-infección al menos en adultos es muy baja. Finalmente se puede afirmar que, la incidencia de los casos de amibiasis es de sólo 10% aproximadamente de las poblaciones estudiadas.

Aunque, una proporción considerable de los individuos infectados por *E. histolytica* no desarrollan síntomas, como fue mencionado anteriormente, sólo un 4% al 10% de los individuos adultos desarrollan amibiasis invasiva (Huston et al., 1999; Stanley, 2003), que puede manifestarse como disentería, principalmente. Sin embargo, algunos sujetos pueden desarrollar complicaciones, como la colitis amibiana o los abscesos hepáticos. El número de casos de abscesos hepáticos en personas infectadas con *E. histolytica* es bajo; sin embargo, en los últimos años se incrementado los casos de hombres adultos que desarrollaron abscesos hepáticos amibianos (Nattakom et al., 2001; Ramiro et al., 2000; Ruíz et al., 2004). Otras complicaciones de la amibiasis invasiva han sido reportadas. McCarthy et al., (2002); reportaron un caso de apendicitis en un niño de 10 años de edad que estaba asociado con la infección por *E. histolytica*.

En México, 8.4% de la población han sido expuestos a *E. histolytica*, y se estima que hay más de un millón de casos de amibiasis entre la población (Caballero-Salcedo et al., 1994). Más recientemente un estudio realizado en Coahuixtla (zona rural del estado de Morelos), en el 64% de la población, mostró que más de la mitad de la población estudiada estaba parasitada con algún protozooario, de esta población sólo el 19% estaba infectado por *E. histolytica/Entamoeba dispar*. En este estudio se demostró la presencia de más de dos especies: *E. histolytica/E. dispar* en sujetos parasitados al analizar las muestras por microscopía. Un análisis por PCR confirmó estas

observaciones y permitieron establecer que *E. histolytica* tenía mayor prevalencia (43.7%), mientras que *E. dispar* se presentó sólo en un 12% de las muestras que presentaron este complejo (Ramos et al., 2000), demostrando que *E. histolytica* sigue prevaleciendo entre la población mexicana de zonas rurales en un índice que parece superar al reportado en 1994 (8.4%).

Más recientemente, Ramos et al., (2005), en la misma comunidad del estado de Morelos, y en muestras de heces y usando PCR, encontraron que *E. histolytica* tenía una prevalencia del 11 %, pero en un 7% de los casos *E. histolytica* está asociada con *E. dispar*, lo cual hace difícil la apreciación de la verdadera incidencia de la infección.

En otro estudio realizado en zonas urbanas y suburbanas del Estado de Puebla (México), se determinó la prevalencia de anticuerpos contra antígenos de *E. histolytica* utilizando ELISA y hematoaglutinación, y usando Inmunoglobulina G contra antígenos de *E. histolytica* a partir de muestras de suero de donantes registrados en el IMSS-Puebla. La seroprevalencia fue del 8.6% por hematoaglutinación y del 6.4% cuando los resultados fueron confirmados con ELISA, demostrando que el diagnóstico usando estas dos técnicas es más sensible para estudios epidemiológicos (Sánchez-Guillén et al., 2000). Este estudio indica, además, de que Puebla es endémico para la amibiasis, especialmente en zonas de bajas condiciones sanitarias.

Estos trabajos en conjunto denotan que la amibiasis es una enfermedad con una prevalencia importante entre la población mexicana rural y urbana, y constituye un problema de salud pública, y al igual que otros estudios epidemiológicos realizados en otras partes del mundo la técnica utilizada para la detección del parásito es importante para definir el impacto real de la enfermedad, porque al menos en México, la prevalencia real de la amibiasis parece ser mayor que el 8.4% que se sigue mencionando en las estadísticas.

4.3. Determinantes de patogenicidad.

Los trofozoítos de *E. histolytica* pueden penetrar la mucosa intestinal causando lesiones ulcerosas que resultan en los síntomas clásicos de la amibiasis: diarrea, calambres estomacales y vómitos. Proteínas identificadas en *E. histolytica*, tales como: lectinas, que median la adhesión al epitelio, péptidos formadores de poros, que destruyen células del hospedero, y proteasas, que degradan moléculas de la matriz

extracelular y del sistema inmunitario del hospedero, han sido asociadas con la invasión intestinal y extraintestinal (World Health Organization, 1997; Huston et al., 1999; Petri, 2002; Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Stanley, 2003; Coudrier et al., 2005).

La lectina-Gal/GalNAc de *E. histolytica*, conformada por dos subunidades, una cadena pesada y una cadena ligera, está involucrada en la adhesión a las células epiteliales del hospedero. La cadena pesada está asociada con la invasión de los trofozoítos de este parásito, como lo demuestran experimentos realizados con amibas mutantes, en la cuales la falta de esta subunidad provocaba la pérdida de la capacidad de los trofozoítos de adherirse a las células blanco del hospedero (Ankri et al., 1999; Padilla-Vaca et al., 1999; Petri, 2002; Abd-Alla et al., 2004). En este sentido, Dodson et al. (1999), encontraron que la cadena pesada de la lectina presentaba un dominio de reconocimiento, y un dominio de unión a carbohidratos, que al ser bloqueados con anticuerpos inhiben la adhesión a las células blanco. Otros estudios confirman que la lectina Gal/GalNAc está asociada con la unión de los trofozoítos a las células intestinales e indirectamente con la patogenicidad de *E. histolytica* (Seguin et al., 1995; Cheng et al., 1998; Coudrier et al., 2005; Ocadiz et al., 2005). La lectina-Gal/GalNAc no sólo está asociada con la unión del parásito a las células del epitelio, sino que también interviene en la separación de las uniones-fuertes entre las células epiteliales (Petri, 2002; Leroy et al., 2000).

Otras moléculas involucradas en la destrucción de células del hospedero son los péptidos que conforman el ameboporo (pequeñas proteínas 5 kDa), que interaccionan con las membranas de las células Jurkat, HL60 y U-937, y generan lisis de estas células (Bruhn et al., 2001; Nickel et al., 1999; Leippe et al., 2004; Zhang et al., 2004). Aunque, Leippe (1997), no asocia la presencia de estas proteínas con la destrucción de las células del hospedero, sino que considera a las proteínas del ameboporo ligadas al control de la población bacteriana en el intestino, por lo que la relación directa de estas proteínas con la patogenicidad de *E. histolytica* no está clara aún.

Las proteasas de cisteína, en cambio, sí han sido asociadas con la destrucción de mucosa intestinal, y con la invasión de los trofozoítos de *E. histolytica*,

pero sus características y su relación con la patogenidad serán abordadas en un apartado especial.

4.4. Proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica*.

E. histolytica secreta varias proteasas algunas de las cuáles están asociadas con el daño al hospedero. Las proteasas de cisteína son las proteínas que se secretan más abundantemente, y las que se han asociado con el desarrollo de la amibiasis (Pérez-Montfort et al., 1987, y 1994).

Sin embargo, otras proteasas también son secretadas por *E. histolytica*, pero algunas con baja actividad o en poca abundancia. Trabajos realizados por Pérez-Montfort et al. (1987 y 1994), usando extractos de trofozoítos de *E. histolytica*, y diferentes inhibidores, demostraron que existe una gran proporción de proteasas cisteína y serina, y una baja proporción de proteasas aspárticas y metaloproteasas.

Proteasas identificadas en gránulos refringentes aislados de trofozoítos de *E. histolytica*, presentaron 6 proteasas con actividad de colagenasa, que se activan en presencia de colagena tipo I y calcio (León et al., 1997), y que sin duda están asociadas con la destrucción de la matriz extracelular.

Más recientemente, se ha encontrado en trofozoítos de *E. histolytica* una hialuronidasa que al actuar sobre glicosaminoglicanos, libera N-acetil-glicosamina y ácido hialurónico, aunque no se le pudo demostrar su relación con el daño al hospedero por su baja actividad enzimática sobre matrices cubiertas de glicosaminoglicanos (Nickel et al., 2000).

Una enzima semejante a la ciclooxygenasa-2 (COX-2) humana también ha sido identificada en *E. histolytica*, y esta enzima está asociada con la regulación del metabolismo de PGE₂, y con la inflamación generada en los estadios tempranos de la amibiasis (Dey et al., 2003).

Últimamente, se identificó una proteasa de serina perteneciente a la familia S28, a la que aún no se le ha demostrado si tiene o no un papel en el desarrollo de la amibiasis (Barrios et al., 2005). Estos trabajos muestran que la mayor cantidad de proteasas que son secretadas de *E. histolytica* pertenecen principalmente a las proteasas de cisteína que serán descritas con más detalle.

Las proteasas de cisteína de *E. histolytica* son proteínas semejantes a las enzimas de la familia de las papaínas y son asignadas a la subfamilia de las proteasas semejantes a las catepsinas-L (Sajid y McKerrow, 2002). Estas proteasas son sintetizadas con un péptido señal de 12 a 14 aminoácidos, un pro-domino de 78 a 82 aminoácidos, que caracteriza este grupo de enzimas al presentar una secuencia conservada de aminoácidos: ERFNIN (Glutamina-Arginina-Fenilalanina-Asparagina-Isoleucina-Asparagina), y un dominio catalítico de 216 a 225 aminoácidos, caracterizados por una secuencia conservada de aminoácidos: CHN (Cisteína-Histidina-Asparagina). Las preproenzimas son procesadas a enzimas maduras que consisten en un aminoterminal, una región hidrofóbica (con el centro activo), y una región carboxilterminal (Que y Reed, 2000).

Estas enzimas tienen una predilección por sustratos cargados positivamente y reconocen específicamente arginina en los péptidos, como ha sido demostrado con el uso de péptidos marcados con fluoróforos, lo cual, convierte a las proteasas de cisteína de *Entamoeba* en enzimas estructuralmente semejantes a la catepsina L, pero funcionalmente semejantes a las catepsinas-B, la presencia de Asp en el sitio activo de estas enzimas explica esta característica (Sajid y McKerrow, 2002; Que y Reed, 2000; Bruchhaus et al., 2003).

En *E. histolytica* han sido identificados 20 genes que codifican para 20 diferentes proteasas de cisteína (EhCP1 a EhCP19 y EhCP112), de los cuáles sólo los genes que codifican para las proteasas EhCP1, EhCP2, EhCP3, EhCP5 y EhCP8 son los que se encontró que se expresan en *E. histolytica*-HIM-1: IMSS (Bruchhaus et al., 2003).

Algunas de estas proteasas presentan secuencias de anclaje a membrana, estructuras parecidas a los GPI, y se pueden encontrar asociadas a membranas (Bruchhaus et al., 2003). Por Inmunodetección, Becker et al. (1996), encontraron que la proteasa de cisteína de *E. histolytica* de 30 kDa colocalizaba con membranas de vesículas fagocíticas y en zonas amorfas del citoplasma, mostrando que esta proteasa se asociaba a una especie de lisosoma. Sin embargo, Spinella (1999), encontraron que la proteasa de cisteína de 60 kDa de *E. histolytica* era transportada desde vacuolas fagocíticas a la membrana, luego de que los trofozoítos eran incubados con eritrocitos

humanos. Trabajos realizados específicamente con las enzimas EhCP1, EhCP2 y EhCP5 revelaron que estas proteasas de cisteína son almacenadas en vacuolas fagocíticas y transportadas a la superficie de la membrana de los trofozoítos que entra en contacto con células del hospedero, confirmando que las proteasas, al entrar en contacto con células del hospedero, son transportadas desde vacuolas a la membrana del trofozoíto para luego ser secretadas (Jacobs et al., 1998; Que et al., 2002).

Las proteasas parasitarias están asociadas a funciones vitales de los protozoarios: desenquistamiento, metabolismo y la citoadherencia (Klemba y Goldberg, 2002). Un ejemplo claro de las funciones biológicas de las proteasas, lo constituyen las proteasas de cisteína de *Giardia*, las cuáles al ser inhibidas causan la reducción del desenquistamiento (Ward et al., 1997). Proteasas involucradas en el metabolismo y la nutrición de los protozoarios son, por ejemplo, la falcipaina de *Plasmodium* que degrada a la hemoglobina necesaria para la proliferación, y supervivencia del parásito, así la inhibición de la proteasa causa la muerte de *Plasmodium* (Rockett, 1990). La cruzipaina, proteasa de cisteína de *Trypanosoma cruzi* esta implicada en la diferenciación del amastigote a tripomastigote (Harth et al., 1993; Meirelles et al., 1992). La adherencia a las células hospedero puede ser mediada por proteasas de cisteína acopladas a adhesinas, como el caso de la proteasa de cisteína de 112 kDa encontrada en *E. histolytica* (García-Rivera et al., 1999). No obstante, algunas de estas proteasas también son capaces de regular la respuesta inmunitaria, y en este caso se ha planteado que las proteasas parasitarias pueden ser consideradas como factores de virulencia. Los ejemplos más claros lo constituyen las proteasas de *E. histolytica* y *Leishmania major*.

Proteasas de cisteína de *E. histolytica* de entre 28 kDa a 112 kDa han sido aisladas, y asociadas con la patogénesis y con el daño al hospedero (Serrano-Luna et al., 1998; García-Rivera et al., 1999; Hellberg et al., 2001; Hellberg et al., 2002; Sim et al., 2004; Boettner y Petri, 2005; Coudrier et al., 2005; Ocadiz et al., 2005). En este sentido, Navarro-García et al. (1995), demostraron por medio de análisis electrofisiológicos, sobre tejidos de colón de gerbos, que proteasas de cisteína de *E. histolytica*-virulenta, de 53 y 75 kDa, causaban una caída del potencial eléctrico en las membranas de las células del tejido probado y una alteración de este tejido. Se

estableció también la relación entre las proteasas de cisteína de *E. histolytica* y la formación de abscesos hepáticos *in vivo*. Stanley et al. (1995), encontraron que los ratones SCID inoculados con trofozoítos de *E. histolytica*-HM1-IMSS presentaban abscesos hepáticos, y en una inmunodetección con un anti-EhCP1 de los tejidos infectados, localizaron proteasas de cisteína-1 en las lesiones, y alrededor de los trofozoítos. El daño directo de las proteasas de cisteína y su relación con la necrosis fueron demostrados cuando se inocularon ratas con trofozoítos incubados con inhibidores de proteasas, y se encontró que no había necrosis, en comparación con los tejidos provenientes de ratas inoculadas con los trofozoítos (Becker et al., 1988).

No obstante, varios trabajos demuestran que las proteasas de cisteína de *E. histolytica* no están asociadas ni con la destrucción de células humanas, ni con la formación de abscesos hepáticos. *In vitro*, usando monocapas de células de riñón de hamsters (BHK), incubadas con cepas de *E. histolytica*, con el gen para la proteasa de cisteína 5 (EhCP5), y sin el (vector con un RNA anti-sentido para EhCP5); se encontró que la monocapa celular era destruida con o sin la presencia de la proteasa, lo cual demostró que en la destrucción de las células dependía de otros factores, y no de las proteasas (Ankri et al., 1998). *In vivo* y usando el gen para otra proteasa, cuando se inocularon trofozoítos de *E. dispar* que la alta expresaban el gen para la proteasa de cisteína 2 de *E. histolytica* (EhCP2), se encontró que no aumenta la formación de abscesos hepáticos en gerbos, aunque hay un efecto citopático considerable sobre células de ovarios de hamsters (CHO), (Helberg et al., 2001). Con esta misma proteasa (EhCP2), e inyectando microesferas cubiertas con la enzima en el portal hepático de gerbos, se encontró que la enzima no estaba asociada con formación de abscesos hepáticos, ya que estos no se formaban (Olivos-García et al., 2003).

La alteración de la matriz extracelular y otros componentes del epitelio intestinal también está mediada por proteasas de cisteína de *E. histolytica*. Li et al. (1995), encontraron que una proteasa de cisteína de 30 kDa se une a columnas de laminina, un componente de la matriz. *In vivo*, el bloqueo de laminina con anticuerpos estuvo asociado con la reducción de la formación de abscesos hepáticos en ratones SCID, lo cual indica que ciertas proteasas de cisteína interaccionan con componentes de la matriz extracelular para dar inicio al ataque a las células del hospedero.

La proteasa de cisteína 5 de *E. histolytica* (EhCP5) está involucrada en la degradación de la vilina (proteína de unión a actina y un componente de la microvellosidad de los enterocitos, luego del contacto de los trofozoítos con los enterocitos humanos, y que en parte produce la desorganización de la microvellosidad de los enterocitos (Lauwaet et al., 2003).

La mucina otro componente de las células epiteliales es también degradado por proteasas de cisteína de *E. histolytica*, luego de que la mucina marcada con S³⁵ quedó reducida a varias bandas, al incubarse con estas proteasas. Adicionalmente, en un cultivo con células productoras de mucina (LS17At) se encontró que las proteasas alteraban la capa celular (Moncada et al., 2003).

Las proteasas de cisteína de *E. histolytica* están involucradas también en la regulación de la respuesta inmunitaria al degradar moléculas, tales como: Interleucina 1 β , interleucina 18, anticuerpos y proteínas de complemento. Uno de los primeros trabajos señaló que proteasas de extractos de trofozoítos de *E. histolytica* eliminaban la cadena pesada de la inmunoglobulina A (IgA), y que cuando se usó una batería de inhibidores no había degradación de la IgA, lo cual implicaba que las proteasas de cisteína actuaban sobre la IgA, este hallazgo indicaba que la degradación de IgA podría provocar adherencia de los trofozoítos de *E. histolytica* a la mucosa intestinal (Kelsall y Ravdin, 1993).

La cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG) fue también degradada por proteasas de cisteína presentes en extractos de trofozoítos de *E. histolytica*, y se planteó que la degradación de IgG podría ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria humoral (Tran et al., 1998).

Las proteasas de cisteína de *E. histolytica* también cortan proteínas de complemento como C3 y C5, y activan con ello la cascada de complemento. La incubación de una proteasa de 30 kDa con C3 y C5 marcadas con Iodo¹²⁵ originó la degradación de estas proteínas en una cadena- α y cadena- α' . Por autoradiografía, se demostró que estos productos eran moléculas semejantes a C3a y C5a, que presentaron actividad, pero la degradación progresiva de estas moléculas conduce a productos que no presentan ni actividad antiplaquetaria en el caso de C3a, ni actividad quimiotáctica en el caso de C5a, lo cual indicaba que las proteasas de cisteína de *E.*

histolytica activan la vía de complemento y al mismo tiempo regulan la respuesta inflamatoria al inactivar productos como C3a y C5a (Reed et al., 1995).

La respuesta inflamatoria se altera por la proteólisis de citocinas como: IL β e IL18. La proteasa de cisteína-5 de *E. histolytica* (EhCP5), es capaz de inducir inflamación intestinal y el mecanismo fue la inducción IL- β y CXCL8 por las células epiteliales, cuando cepas de *E. histolytica*, que la alta expresaban el gen para EhCP5 establecieron contacto con el epitelio intestinal. La inducción de IL β fue debida a la conversión de la IL- β inmadura en IL- β madura, que es una forma activa de esta interleucina, implicada en la activación de neutrófilos, macrófagos, y en liberación por las células epiteliales intestinales de mediadores lipídicos secundarios, los cuales en parte provocan la respuesta inflamatoria (Burns et al., 2003; Zhang et al., 2000). La inhibición de IL-18 por contacto con la EhCP5 también alteró la respuesta inflamatoria al reducir los niveles de INF- γ , y la activación, principalmente, de macrófagos, que son las células encargadas de la destrucción de los trofozoítos de *E. histolytica* (Que et al., 2003).

5. Evasión de las funciones de las quimiocinas por patógenos.

Varias familias de virus y algunas bacterias despliegan estrategias que interfieren con las funciones de las quimiocinas para escapar de la respuesta inmunitaria del hospedero y, con ello sobrevivir y diseminarse (Liston y McColl, 2003). En muchos casos, la mimetización de las quimiocinas parece ser una de las vías de escape más eficaces empleadas por los virus (Lalani et al., 2000). La interrupción del gradiente de quimiocinas por proteasas bacterianas, que destruyen GAGs, y la captura de las quimiocinas por proteínas bacterianas que unen quimiocinas similares a las descritas para los virus, constituyen algunas de las formas de evasión de la red de quimiocinas (Menozzi et al., 2002). El bloqueo o la activación de receptores de quimiocinas por proteínas secretadas por protozoarios y helmintos, es otro de los mecanismos de escape de la red quimiocinas. Estas estrategias, plantean, Maizels et al. (2001), son producto de la coevolución entre los parásitos y el sistema inmunitario del hospedero, que favorecen formas de tolerancia que le permiten al parásito persistir largo tiempo.

Hasta el momento no existen reportes del mimetismo molecular de las quimiocinas por helmintos y protozoarios. Sin embargo, proteínas que mimetizan citocinas han sido identificadas en algunos helmintos. Una proteína homologa al interferón- γ del hospedero (INF- γ), fue identificada en los productos secretados por *Trichuris muris*. El INF- γ -parasitario fue capaz de unirse al receptor del INF- γ del hospedero, y afectar el funcionamiento de éste, activando células T y B, como lo hace el INF- γ del hospedero (Grencis y Entwistle, 1997). En este caso es evidente que el INF- γ parasitario propicia la polarización de la respuesta inmunitaria al subtipo T_H1 que beneficia al parásito, contribuyendo de esta manera a la sobrevivencia de *T. muris* en el hospedero.

Otras citocinas miméticas se han encontrado en parásitos del género *Trichinella* y *Brugia*. Ambos parásitos secretan proteínas que mimetizan MIF (macrophage migration inhibitory factor), una citocina proinflamatoria importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria durante las infecciones por helmintos, que es capaz de alterar el reclutamiento de monocitos, hecho que inhibe la migración de monocitos al sitio de infección y modula la inflamación del hospedero (Pastrana et al., 1998; Tan et al., 2001; Falcone et al., 2001; Zang et al., 2002; Wu et al., 2003; Rodríguez et al., 2003).

La activación de los receptores de quimiocinas por factores parasitarios ha sido descrita en protozoarios y helmintos. Uno de los ejemplos mejor estudiado es el factor quimiotáctico de granulocitos identificado en *Leishmania major*, que induce un alto índice de migración de neutrófilos comparado con la CXCL8 humana, y origina una especie de circuito de amplificación en el reclutamiento de neutrófilos conveniente para *Leishmania*, que es fagocitada por estos leucocitos y protegida del ataque del sistema inmunitario del hospedero (van Zandbergen et al., 2002; Laskay et al., 2003).

Otro ejemplo lo constituyen proteínas secretadas por *Ascaris suum* que se unen a los receptores para CXCL8, CXCR1 y 2, provocando que estos receptores no respondan a su ligando natural; de esta manera, *A. suum* altera el reclutamiento de los neutrófilos (Falcone et al., 2001).

Por último, otro mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria empleado por los parásitos es la interferencia de la red de quimiocinas por proteasas secretadas.

Estas proteasas son capaces de degradar citocinas y quimiocinas, o de rasurar la capa de glicosaminoglicanos. Al respecto, se mencionan la identificación de proteasas de cisteína, catepsinas y metaloproteasas, entre otras proteasas que contribuyen al daño al hospedero, y la alteración de la respuesta inmunitaria celular.

Nippostrongylus brasiliensis secreta una acetilhidrolasa que es capaz de inactivar PAF (factor de activación de plaquetas), e inhibir la agregación de plaquetas, aparentemente para evitar la inflamación intestinal (Blackburn y Selkirk, 1992).

Una catepsina L aislada de *Fasciola hepatica* ilustra también esta forma de inactivar a los factores quimioatrácticos o a las quimiocinas humanas. La catepsina L de *F. hepatica* reduce los niveles de $\text{INF-}\gamma$, cambiando la dirección de la respuesta inmunitaria hacia un subtipo T_H2 , que resulta benéfica para la sobrevivencia del parásito (O'Neill et al., 2001).

Proteasas de cisteína identificadas en *Paragonimus westermani* fueron capaces de inducir CXCL8 de eosinófilos, y regular la apoptosis de estas células; lo cual reduce la inflamación asociada a los eosinófilos, aumentando la sobrevivencia del gusano en la lesiones provocadas por las larvas (Shin y Lee, 2000).

Más ligado a nuestro trabajo es la evidencia de la proteasa de cisteína-5 de *Entamoeba histolytica* inactiva IL-18 provocando la desviación de la respuesta inmunitaria y alterando la respuesta inflamatoria orquestada en contra de este parásito (Que et al., 2003).

Finalmente, las metaloproteasas identificadas en algunos gusanos regulan la migración de eosinófilos a los sitios de infección al inactivar la eotaxina-1 (CCL11), quimiocina que ejerce actividad quimiotáctica sobre eosinófilos. De esta forma, *Necator americanus* desregula la respuesta inflamatoria, al actura sobre CCL11, impidiendo con ello la migración de eosinófilos, los cuáles son fundamentales en el ataque a este parásito (Culley et al., 2001).

Justificación del problema.

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis, una infección que tiene alta incidencia entre la población mexicana, y que constituye un problema de salud pública. El desarrollo de la amibiasis intestinal puede conducir a la colitis amibiana, y en algunos casos a la formación de abscesos hepáticos. Hallazgos en este sentido muestran que *E. histolytica* induce daño a las células epiteliales intestinales durante el proceso invasivo por medio de proteínas, tales como, lectinas, proteasas, y péptidos que conforman el ameboporo. Varios antecedentes muestran que *E. histolytica* puede evadir la respuesta inmunitaria, afectando la activación de los macrófagos y la proliferación de los linfocitos T, mediante proteínas que *E. histolytica* secreta durante la colonización y la invasión de la mucosa intestinal.

Las proteasas de cisteína están asociadas con el ataque a la mucosa intestinal y a proteínas del sistema inmunitario, tales como, inmunoglobulinas y proteínas de complemento. Stanley (2003), más recientemente, encontró que las proteasas de cisteína pueden modificar la respuesta inflamatoria. EhCP5, la proteasa de cisteína 5, por ejemplo actúa sobre IL1 β provocando la maduración de esta citocina, lo cual induce la liberación de CXCL8 por el epitelio intestinal, y el aumento en el reclutamiento de neutrófilos, que en el caso de la amibiasis se asocian al daño a la mucosa intestinal. Esta y otras alteraciones de la respuesta inflamatoria pueden estar propiciadas por las proteasas de cisteína de *E. histolytica*. La proteasa de cisteína 2, una proteasa que se secreta al contacto con las células del hospedero, y se sabe que induce una respuesta inflamatoria moderada y que podría estar asociada con la invasión en el epitelio intestinal, pudiera estar asociada también con la modulación de la respuesta inmunitaria al actuar sobre citocinas y quimiocinas, pero esto no ha sido demostrado.

Las quimiocinas han sido objeto de estudio en las últimas décadas por su relación con la inflamación producida en varias enfermedades, y con la homeóstasis del sistema inmunitario; sin embargo, su participación en la respuesta orquestada ante infecciones parasitarias ha sido poco documentada. CCL2 y CCL4, por ejemplo, han sido asociadas con la inducción del estallido respiratorio en macrófagos infectados con

Trypanosoma cruzi. La inducción de quimiocinas en otras infecciones por parásitos protozoarios está también relacionada con el reclutamiento de leucocitos y con subsecuente desarrollo de la respuesta inmunitaria. Durante la amibiasis, la inducción de CXCL1 y CXCL8 está asociada con el desarrollo de la respuesta inflamatoria, y con el estado invasivo de los trofozoítos de *E. histolytica*.

En este estudio nos centraremos en las subfamilias de las quimiocinas CC y CXC, dos de las principales subfamilias de las quimiocinas involucradas en la respuesta inmunitaria contra infecciones parasitarias, incluyendo la amibiasis. Partiendo de la hipótesis de que *E. histolytica* puede modular la respuesta inflamatoria a través de la alteración de las actividades funcionales de las quimiocinas, se tratará de conocer el efecto de la proteasa de cisteína-2 sobre las funciones de las quimiocinas CC, CCL2 y CCL13, y CXC, CXCL8.

Hipótesis.

Entamoeba histolytica modulará la actividad proinflamatoria de las quimiocinas mediante la proteasa de cisteína-2, realizando proteólisis en las regiones que contienen arginina y fenilalanina en estas moléculas, y generando dos o más péptidos no funcionales que provocarían la inhibición de actividad quimiotáctica de CCL2 y CCL13, quimiocinas CC encargadas de regular el reclutamiento de los monocitos. De la misma manera, la modificación de la respuesta inflamatoria mediada por las quimiocinas también puede ser alterada por la proteasa de cisteína 2 de *Entamoeba histolytica* potenciando la función quimiotáctica de CXCL8, una quimiocina CXC que regula el tráfico de neutrófilos, al realizar proteólisis de los primeros 4 aminoácidos del extremo aminoterminal, y exponer el dominio ERL de esta molécula. De tal manera, que las proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica* estarían involucradas no sólo en la destrucción de la matriz extracelular, y en daño a la mucosa intestinal sino también a la modificación de la respuesta inflamatoria como una estrategia para evadir la respuesta inmunitaria.

Objetivo general.

Determinar el papel de la proteasa de cisteína-2 de *Entamoeba histolytica* (EhCP2), en la modulación de las actividades funcionales de las quimiocinas CC, CCL2 y CCL13 y de las quimiocinas CXC, CXCL8.

Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto de la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* (EhCP2) sobre la quimiotaxis mediada por las quimiocinas de la familia CC en células monocíticas.

1.1. Analizar los productos de la proteólisis de CCL13 y CCL2 tratadas con EhCP2.

1.2. Analizar la actividad quimiotáctica de CCL13 y CCL2 tratada con EhCP2 en células monocíticas.

2. Determinar el efecto de la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* sobre la quimiotaxis mediada por la CXCL8.

2.1. Analizar los productos de la proteólisis de CXCL8₁₋₇₇ tratada con la EhCP2.

2.2. Analizar la actividad quimiotáctica de CXCL8₁₋₇₇ tratada con la EhCP2 en granulocitos humanos.

2.3. Analizar la actividad quimiotáctica de CXCL8₁₋₇₂ tratada con la EhCP2 en granulocitos humanos.

Materiales y Métodos.

Células.

Mantenimiento y cultivo de las células THP-1.

Los ensayos de quimiotaxis para probar monocitos contra las quimiocinas de la familia CC, CCL13 y CCL2 se realizaron con la línea de células tumorales monocíticas humana-THP-1 (ATTCC-TIB202), que responden a estas quimiocinas (Godiska et al., 1997), y que expresan el receptor CC-2 durante esta fase (Phillips et al., 2005). Las células THP-1 se mantuvieron en RPMI-1640-2 mM de L-glutamina (Gibco, USA), ajustado con 1.8 g/L de bicarbonato de sodio, HEPES (10 mM, (Gibco, USA), piruvato (1 mM, Gibco, USA), y suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, USA), y se incubaron a 37° C en presencia del 5% de CO₂. Las células se cultivaron hasta obtener más del 80% de confluencia y para la realización de los ensayos, las células fueron teñidas con azul tripano (Sigma), y luego cuantificadas para analizar su viabilidad. Para todos los ensayos la viabilidad de las células fue del 98% a 99%.

Aislamiento de granulocitos de sangre periférica humana.

Los ensayos de quimiotaxis con granulocitos contra la CXCL8 se realizaron con neutrófilos aislados de sangre periférica humana de donantes sanos y voluntarios. Para esto, la sangre fresca (10 ml) se mezcló por inversión con 25 µl de heparina (1000 unidades/ml, Sigma-USA), y dextran (6%, Sigma-USA), en HBSS (0.1 M), y se dejó decantar durante 1 hora. Los leucocitos contenidos en el plasma se separaron en un gradiente Ficoll-Paque (Sigma, USA), por centrifugación a 1600 rpm durante 20 minutos a 4° C. Luego, la pelletilla obtenida se resuspendió en el amortiguador de lisis de eritrocitos (NH₄Cl, 155 mM; KHCO₃; 10 mM y EDTA, 0.1 mM), durante 5 minutos. Esta suspensión se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, y la pelletilla de células resultante se resuspendió en HBSS hasta su uso. Antes de su uso, los granulocitos fueron teñidos con azul de tripano (Sigma-USA), y cuantificados para calcular la viabilidad, la cual generalmente estuvo alrededor del 80%.

Reactivos.

Las quimiocinas humanas recombinantes CCL13, CCL2, CXCL8 (72 y 75 aminoácidos), provienen de PeProtech (USA). Los inhibidores de proteasas, leupeptina (Ac-Leu-Leu-Arg-Aldehyde, 1 mg/ml), y E-64 (N-[N-(L-3trans-carboxyoxirane-

2carbonyl)-L-leucyl]-agmatine; 0.5 µg/ml), provienen de Roche, Mannheim (Germany). El Péptido sintético, Benziloxycarbonil-Phe-Arg-7 amino-4 metil coumarina (Z-Phe-Arg-AMC, 5 mM), y la calceína-AM (200 ng/ µl), fueron proporcionados por Molecular Probes (USA). Polimixina B (10 µM), y la toxina pertussis fueron proporcionados por Sigma (USA). Todos los reactivos para electroforesis, incluyendo el Ditiotreititol (DTT, 1 M) fueron obtenidos de BioRad (USA). Todos los reactivos para el cultivo provienen de Gibco-BRL (USA).

Obtención y aislamiento de EhCP2.

EhCP2 fue proporcionada por Alfonso Olivo, del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM-Hospital General, y su obtención y aislamiento fue realizada como se describe brevemente: EhCP2 fue aislada a partir de trofozoítos de *E. histolytica* por doble extracción con éter de etílico y por filtración molecular (Olivos-García et al., 2003). La enzima aislada y purificada fue mantenida en amortiguador de cloruro de mercurio (1 mM), cloruro de sodio (0.15 M), y tris (20mM), a pH 7.4, para evitar que la autodigestión de la EhCP2. El peso molecular de la EhCP2 se determinó en minigeles de poliacrilamida-SDS-Tris-Glicina al 8% bajo condiciones reductoras (BioRad, USA, Bollag et al., 1996), y la concentración de la proteína se midió por el método de Lowry para microplacas, usando el BSA para la curva patrón (BCA de Pierce, USA).

Zimograma de la EhCP2.

La actividad proteolítica de la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* (EhCP2), se analizó usando minieles de poliacrilamida nativos (BioRad, USA) copolimerizados con 0.1% de gelatina (Sigma, USA), (Hellberg et al., 2002). Brevemente: la EhCP2 (2.5 a.m.) se corrió en condiciones no reductoras (4°C) de electroforesis. Posteriormente, los geles se incubaron con triton X-100 (2.5%), a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Luego, los geles se incubaron con el amortiguador de los fosfatos de sodio [(Na₂HPO₄ (1M), NaH₂PO₄ (1M), pH 7.0, Sigma, USA)-DTT (2 mM, Sigma, USA)], en agitación constante a 37 °C, durante toda la noche. Luego, los geles se tiñeron con Azul-Coomassie (BioRad, USA), y se destiñeron con ácido acético glacial-metanol (90%). Las zonas claras sobre el gel indicaron la actividad proteolítica de la enzima.

La EhCP2 (2.5 μM) fue activada en el amortiguador de fosfato (0.1 M), pH 6.0 con DTT (2 mM), durante 30 minutos a 37 °C, antes de su uso, y para detener la reacción de proteólisis, al tubo de reacción se le adicionaba un amortiguador de fosfato de sodio (0.1 M, pH 6.0), que contenía leupeptina (1 μM) y E-64 (20 μM), y se incubaba 30 minutos adicionales a 37°C.

Activación e inhibición de EhCP2 usando un sustrato-fluorescente.

La EhCP2 (2.5 μM) en el amortiguador de fosfatos de sodio (0.1 M), pH 6.0, y DTT (2 mM), fue preincubado durante 5 minutos a 37 °C, y luego, fue incubado con Z-Arg-Phe-AMC (3 μM), 5, 30 y 60 minutos a la misma temperatura. La actividad enzimática se midió posteriormente en un espectrofotómetro (Bio-Tek, USA), en el rango de excitación de 350nm y emisión de 460 nm (Serveau et al., 1996). EhCP2 se pretrató con E-64 (20 μM) o leupeptina (10 μM), durante 30 minutos a 37°C, y luego fue incubado con el sustrato fluorescente, para probar el efecto de los inhibidores. Los resultados fueron analizados en unidades de fluorescencia. El porcentaje de actividad se calculó comparando los valores de las unidades de fluorescencia del control contra los valores de la EhCP2 incubada con el sustrato.

Proteólisis de quimiocinas CC y CXC por EhCP2.

Para la reacción de proteólisis, CCL13 (100 ng/ml), se trató con EhCP2 (2.5 μM) a intervalos de tiempo de 15, 30, 90 y 180 minutos. Como control, EhCP2 (2.5 μM), fue usada inhibida con E-64 (20 mM), o con leupeptina (10 mM), e incubada con CCL13 (100 ng/ml) a la misma temperatura durante 30 minutos a 37°C.

El efecto de la EhCP2 sobre otras quimiocinas de la familia CC, se evaluó incubando EhCP2 (2.5 μM) preactivada con CCL2 (200 ng/ml), 30 minutos a 37° C.

El efecto de la EhCP2 sobre otras quimiocinas de la familia CXC, se determinó incubando EHCP2 (2.5 μM) preactivada con CXCL8 (200 ng/ml), 30 minutos a 37°C.

En todos los casos, las reacciones de proteólisis se detuvieron con la adición de amortiguador del fosfato (pH 6.0) con inhibidores, como fue mencionado anteriormente.

Las proteínas y los productos de la proteólisis de CCL13, CCL2 y CXCL8 se separaron en minigeles de poliacrilamida en el amortiguador de corrida, tricina-PAGE-

SDS (16.5%, BioRad, USA), bajo condiciones reductoras (Schägger y Jagow, 1987), y se detectaron usando tinción de plata (GelCode Silver SNAP, Pierce, USA).

Análisis por Western blot de los productos de proteólisis de CCL13.

Los productos de la proteólisis de CCL13 y CXCL8₁₋₇₇, separados en mini-geles Tricina-PAGE-SDS (16.5%), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad, USA), y se detectaron con el anti-CCL13 policlonal de conejo (1:1000) obtenido en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General de Massachussets, USA (Lamkhioed et al., 2000), y con el anti-CXCL8 (PeProtech, USA), respectivamente. Luego, fueron revelados con el anticuerpo secundario, anti-IgG-conejo-HRP (1:5000, Zymed Laboratorios, USA), usando el kit ECL de quimioluminiscencia (Amersham Phamacia Biotech, UK).

Marcaje de células con calceína-AM.

Las células provenientes de la línea celular THP-1 o aisladas de sangre periférica humana se concentraron por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en HBSS (Gibco, USA). Luego, la resuspensión de células fue incubada con calceína-AM (0.5 μ M), a 37°C durante 15 minutos, para su marcaje. Posteriormente, esta suspensión de células se lavó dos o tres veces por centrifugación a 1200 rpm durante 2 minutos. Las células marcadas y lavadas se resuspendieron nuevamente en HBSS y se conservaron en esta suspensión hasta su uso.

Quimiotaxis con monocitos contra quimiocinas CC.

Los análisis, de migración de las células THP-1 se realizaron en una cámara Boyden modificada (48-pozos, Neuro Probe, USA), a través de una membrana de policarbonato (5 mm de diámetro, Neuro Probe, USA), en la cual, las células (500,000 células/ml) marcadas con calceína-AM (0.5 μ M; Molecular Probes, USA), y resuspendidas en HBSS sin calcio y sin magnesio (De Gendt et al., 1996), se adicionaron en la parte superior de la cámara e incubaron 90 minutos a 37° C, con las quimiocinas tratadas y sin tratar con la EhCP2, colocadas en la parte inferior de la cámara (García-Zepeda et al., 1996). Posteriormente, la membrana de policarbonato (5.0 μ m), se retiró y lavó para despegar las células que no migraron. Los resultados se analizaron en el densitómetro-FX (BioRad, USA), mediante el programa Quantity One-

4.4.1 (BioRad, USA), y se mostraron en densidad de las células marcadas como unidades de fluorescencia por mm^2 .

En los análisis de quimiotaxis de las células monocíticas hacia CCL13 y CCL2, tratadas y sin tratar con la EhCP2 se probaron las siguientes condiciones:

1. La influencia de la concentración de EhCP2 en la proteólisis de CCL13 que se analizó incubando CCL13 (100 ng/ml) con la EhCP2 a 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 μM en HBSS (Gibco, 1mM), durante 30 minutos a 37°C.

2. La cinética de la proteólisis de CCL13 que se determinó incubando CCL13 (100 ng/ml) con EhCP2 (2.5 μM) a tiempos de 15, 30, 60, 90 y 180 minutos en HBSS, cada una de estas reacciones se detuvo con el amortiguador HBSS-leupeptina (1 μM).

3. El efecto proteolítico de la EhCP2 sobre CCL13 que se confirmó incubando CCL13 (100 ng/ml), con EhCP2 tratada con leupeptina (10 μM) y E-64 (20 μM), como se mencionó previamente.

4. La EhCP2 se pretrató con polimixina B (1 μM), un agente que neutraliza LPS, durante 30 minutos a 37° C, para confirmar que la enzima amibiana estuviera libre de endotoxinas (Tsuzuki et al., 2001), y luego se incubó con CCL13 (100 ng/ml) durante 30 minutos a la misma temperatura. Un control de la enzima amibiana pretratada con polimixina B suspendida en PBS se incluyó como control negativo.

5. En todos los ensayos se usó como control positivo CCL13 (100 ng/ml), sin tratar en HBSS. Los controles negativos fueron: los amortiguadores de activación (1mM de DTT-HBSS) e inactivación E-64 (1 μM)-HBSS o leupeptina (1 μM)-HBSS, HBSS, y la EhCP2 (2.5 μM)-HBSS.

6. El efecto de EhCP2 sobre CCL2, otro miembro de la familia de las quimiocinas CC, se analizó para quimiotaxis bajo las condiciones determinadas para CCL13, y estas fueron:

6.1. El efecto proteolítico de la EhCP2 sobre CCL2 que se confirmó incubando CCL2 (100 ng/ml) con EhCP2 (2. 5 μM).

6.2. La inhibición de la EhCP2 (2. 5 μM) con leupeptina (10 μM) y E-64 (20 μM) y su efecto sobre las funciones quimiotácticas de la CCL2 (100 ng/ml) durante 30 minutos a 37°C, como se mencionó previamente,

Inhibición de las proteínas G acopladas a receptores CC por la toxina pertusiss.

Las células THP-1 cosechadas por centrifugación (1000 rpm), y resuspendidas en HBSS (sin calcio y magnesio), se incubaron con la toxina pertusiss (200 ng/ml), durante 2 horas a 37°C en presencia de CO₂ (5%). Las células tratadas se usaron para quimiotaxis como se describió anteriormente. Los resultados se compararon con los obtenidos con células THP-1, sin tratar con la toxina *pertusiss*.

Quimiotaxis con neutrófilos de sangre periférica humana contra CXCL8.

Un volumen de 50 µl de la suspensión de neutrófilos purificados de sangre periférica humana (250.000 células/ml), y marcadas con calceína-AM (0.5 µM), se adicionaron en la parte superior de una cámara Boyden modificada (46 pozos, Neuro Probe, USA), separadas por una membrana de policarbonato (8 µm de diámetro, Neuro Probe, USA), de los estímulos, se incubaron con 30 µL de las quimiocinas tratadas, y sin tratar con la EhCP2 durante 45 minutos y colocadas en la parte inferior de la cámara. Los resultados en unidades de fluorescencia por mm² se analizaron como se especificó anteriormente.

Para probar el efecto de la EhCP2 sobre la actividad biológica de la CXCL8, la EhCP2 (2.5 µM) previamente activada se incubó con la CXCL8₁₋₇₇, (100 ng/ml) durante 30 minutos a 37° C, y luego se probó en quimiotaxis con neutrófilos, como se mencionó anteriormente. Como control, se probó la CXCL8 cortada de 72 aminoácidos, para analizar el efecto de la enzima amibiana sobre la CXCL8 sin los primeros 8 aminoácidos del extremo aminoterminal; para esto la CXCL8 (100 ng/ml) se incubó con la EhCP2 (2.5 µM), bajo las condiciones mencionadas.

El efecto directo de la proteasa amibiana se determinó con el uso de los inhibidores de proteasas de cisteína, E-64 (20 µM) y leupeptina (10 µM). En todos los ensayos los controles incluidos fueron: amortiguadores de activación (1mM de DTT-HBSS) e inactivación (E-64 (1 mM) o leupeptina (1mM)-HBSS), HBSS y la EhCP2 (2.5 µM)-HBSS, como controles negativos, y la CXCL8 (100 ng/m)-HBSS, como control positivo.

Análisis teórico de la secuencia de los péptidos generados de la proteólisis de las quimiocinas.

La secuencia, el peso molecular y el número de péptidos generados por la proteólisis de las quimiocinas fueron analizadas teóricamente usando los programas ExPASy-PeptideCutter y PROLYSIS, tomando en cuenta las condiciones reductoras de las proteínas para geles de poliacrilamida.

Análisis estadístico de los datos.

Los resultados se indicaron en media \pm error estándar. Para comparar el efecto de la proteasa amibiana sobre la actividad de las quimiocinas probadas a través del tiempo y a diferentes concentraciones de la enzima, los datos fueron tratados con la prueba ANOVA de una vía, tomando una $p < 0.05$ como diferencia significativa. En la alteración de la actividad de las quimiocinas por la proteasa amibiana bajo condiciones de activación o inactivación de esta, los datos fueron procesados con la prueba t para dos poblaciones, comparando los resultados de ambos tratamientos, y tomando una $p < 0.05$ como diferencia significativa. En el efecto de la proteasa amibiana sobre las quimiocinas, los datos fueron también analizados por prueba t para dos poblaciones, tomando como control positivo la quimiotaxis de las células a la quimiocina intacta. Finalmente, los resultados provenientes de los experimentos con la toxina pertusiss fueron analizados por ANOVA de una vía, comparando las células sin tratar con la toxina con las que tenían el tratamiento y tomando una $p < 0.05$ como significativa.

Resultados.

Propiedades de activación e inhibición de EhCP2.

El peso molecular de la EhCP2 fue de 36.91 kDa, como lo muestra el gel PAGE-SDS (8%), figura 4A. La EhCP2, presentó actividad enzimática como lo reveló la degradación de la gelatina en geles PAGE; la figura 4B, muestra la zona de degradación de la matriz de gelatina como una banda clara que coincide con el peso molecular de la EhCP2 (36.91 kDa). La actividad enzimática de la EhCP2, usando el Z-Phe-Arg-AMC, sustrato específico para proteasas de cisteína, fue del 100%, degradando 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}$ del sustrato. La inhibición de la actividad enzimática de la EhCP2 también fue demostrada usando Z-Phe-Arg-AMC, y fue observada con el uso de E-64 y leupeptina, inhibidores de proteasas de cisteína. Ambos inhibidores actuaron sobre la EhCP2 inhibiendo su actividad enzimática hasta un 70% (Tabla 3). La cinética de degradación del Z-Phe-Arg-AMC tratado con EhCP2 mostró que la enzima amibiana puede realizar proteólisis de la mayor cantidad de sustrato a los 30 minutos, tiempo en el cual la enzima presentó su mayor porcentaje de actividad enzimática (Figura 4C).

Tabla 3: Propiedades de activación e inhibición de la EhCP2.

	EhCP2 sin inhibidores	E-64	Leupeptina
Actividad total	100		
Actividad residual		30%	10%

EhCP2 (2.5 μM) fueron incubados con el péptido Z-Phe-Arg-AMC (3 μM) durante 30 minutos a 37 °C, y la actividad de la enzima fue medida por espectrofotometría como se indicó en materiales y métodos. Para la inhibición de la actividad enzimática de la EhCP2, la enzima fue preincubada con E-64 (20 mM), y leupeptina (10 mM), bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

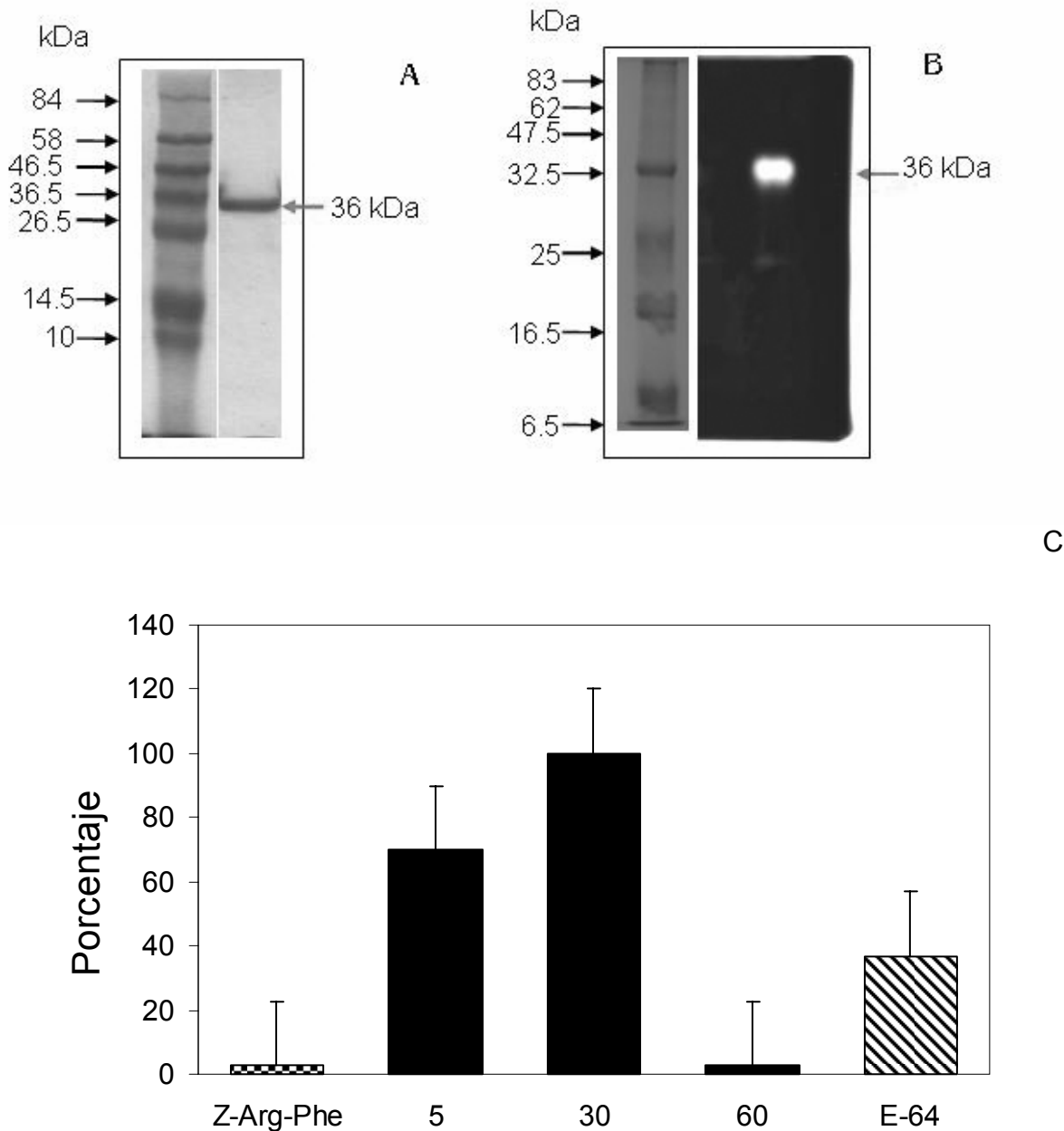


Figura 4. Actividad proteolítica de la EhCP2 analizada por zimografía y por espectrofluorometría.

A. EhCP2 analizada en geles PAGE-SDS (12%) con azul de Coomassie. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. EhCP2 (2.5 μ M), la flecha indica el peso molecular de la proteasa. **B.** Zimograma de actividad de la EhCP2 en geles PAGE (8%), copolimerizados con gelatina (0.1%), zonas claras indicando la proteólisis. **C.** Porcentaje de actividad de la EhCP2 (2.5 μ M), usando el péptido Z-Phe-Arg-AMC (3 μ M), determinada por espectrofotometría. Datos presentados en porcentaje de actividad enzimática, tomando en cuenta la actividad máxima a los 30 minutos, representan media \pm error estándar ($n=3$).

EhCP2 actúa sobre CCL13 produciendo dos péptidos no funcionales.

La EhCP2 (36.91 kDa), fragmentó a CCL13 en dos bandas, una de 3.9 kDa y la otra de 2.6 kDa, aproximadamente (Figura 5a), y la proteólisis de CCL13 ocurre a partir de los 30 minutos; indicando que esta enzima amibiana truncó la quimiocina en dos péptidos; aunque teóricamente la enzima amibiana podría realizar otros cortes sobre la molécula (Tabla 4), generando hasta cinco péptidos. Este patrón también se observó a los 180 minutos de incubación de la EhCP2 con la quimiocina (Figura 5a). La proteólisis de la CCL13 por la EhCP2 se confirmó por inmunodetección con el anticuerpo CCL13, y con el uso de inhibidores específicos de proteasas, con los cuáles no se produce la proteólisis de CCL13 (Figura 5b).

Tabla 4. Predicción de los péptidos que podrían generarse de la proteólisis de CCL13 por EhCP2

Secuencia de CCL13							
1	10	17	27	36	46	69	75
QPDALNVPST CC FTFSSKKISL QR LKSYVITT SR CPQKAVI FR TKLGKEI C ADPKEKWWQNYMKHL GR KAHTLKT							
Número de fragmentos	Número de residuo	Peso molecular (Da)	Secuencias ^a				
5	69-75	798.48	KAHTLKT				
3	28-36	1062.33	^d CPQKAVI FR				
2	18-27	1167.67	LKSYVITT SR ^c				
4	46-69	2972.56	TKLGKEI C ADPKEKWWQNYMKHL GR				
1	1-17	5059.12	QPDALNVPST CC FTFSSKKISL QR				

^a Los péptidos generados durante la digestión de la CCL13 por la EhCP2 fueron caracterizados teóricamente mediante el programa de predicción de proteólisis enzimática (Cutter-1998-1999 Koen Van Der Straeten, Hervé Choplin and Thierry Moreau) en las condiciones de cisteína sin tiol con proteínas tratadas con reactivos para la electroforesis en geles de poliacrilamida. Se calcularon los pesos moleculares, el sitio de corte de la enzima y los fragmentos generados de los péptidos que posiblemente se generaron durante la proteólisis. ^b EhCP2 actúa preferentemente sobre residuos de arginina en la posición 2 (P2) del sustrato mediante el sitio 2 (S2) del bolsillo en el sitio activo (Que et al., 2002). P₂P₁, sitios de proteólisis en el sustrato. ^c Posibles sitios de proteólisis en el sustrato. ^d Residuos de cisteína conservados.

EhCP2 también actúa sobre CCL2 generando dos péptidos no funcionales.

La proteólisis de la quimiocina CCL2, miembro de la familia CC de las quimiocinas, se demostró también cuando la quimiocina se trató con la enzima

amibiana, como se observa en la figura 5C. Al igual que la CCL13, EhCP2 (36.91 kDa) truncó CCL2 en dos péptidos, uno de 4.0 kDa y otro de 4.2 kDa, aunque también es posible que otros péptidos más pequeños (>1 kDa) podrían ser generados (Tabla 5). Estos resultados fueron confirmados cuando la EhCP2 se trató con los inhibidores de proteasas, con los cuáles no se observó proteólisis de la quimiocina (Figura 5C).

Tabla 5. Predicción de los péptidos que podrían generarse de la proteólisis de CCL2 por EhCP2

Secuencia de CCL2								
1	10	21	27	34	44	54	64	75
QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT								
Número de fragmentos	Número de residuo	Peso molecular (Da)	Secuencias ^a					
4	33-33	175.21	R					
3	28-32	609.70	LASYR ^c					
2	22-27	730.46	KISVQR ^d					
1	1-21	4365.26	QPDAINAPVTCCYNFTNR					

^a Los péptidos generados durante la digestión de la CCL2 por la EhCP2 fueron caracterizados teóricamente mediante el programa de predicción de proteólisis enzimática (Cutter-1998-1999 Koen Van Der Straeten, Hervé Choplin and Thierry Moreau), en las condiciones de cisteína sin tior con proteínas tratadas con reactivos para la electroforesis en geles de poliacrilamida. Se calcularon los pesos moleculares, el sitio de corte de la enzima y los fragmentos generados de los péptidos que posiblemente se generaron durante la proteólisis. ^b EhCP2 actúa preferentemente sobre residuos de arginina en la posición 2 (P2), del sustrato mediante el sitio 2 (S2), del bolsillo en el sitio activo (Que et al., 2002). ^c Posibles sitios de proteólisis en el sustrato. ^d Residuos de cisteína conservados.

EhCP2 actúa sobre CXCL8, miembro de la subfamilia CXC, provocando un ligero corte en el extremo aminoterminal de esta molécula.

La enzima amibiana también proteolizó CXCL8, posiblemente en los cuatro primeros aminoácidos del extremo aminoterminal de la quimiocina; como lo confirmó el hecho de que hay un ligero cambio en el patrón de corrida en el gel de poliacrilamida con respecto al patrón observado cuando se inhibió la proteasa con E-64 (Figura 5D). Esta banda observada en el gel tuvo un peso molecular de 8 kDa, aproximadamente, lo cual indica que CXCL8 (9 kDa), pierde una región de 1.5 kDa, aproximadamente. La tabla 6, ilustra el corte en los primeros 4 primeros aminoácidos del extremo NH₂-terminal que teóricamente puede estar realizando la EhCP2 (36.91 kDa), en CXCL8. En esta tabla 6, se muestra también que la EhCP2 puede ejecutar cortes en otras secuencias de la CXCL8, y en una inmunodetección se mostraron dos péptidos (datos no mostrados), aunque es posible que péptidos muy pequeños sean generados también de la proteólisis de CXCL8 (Tabla 6).

Tabla 6. Predicción de los péptidos que podrían generarse de la proteólisis de CXCL8₁₋₇₇ por EhCP2

Secuencia de CXCL8 ₁₋₇₇									
1	4	10	20	30	41	51	64	72	77
AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLS DR ELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS									
Número de fragmentos	Número de residuo	Peso molecular (Da)	Secuencias ^a						
1	1-4	483.6	AVLPR						
2	5-10	702.8	SAKERL ^c						
6	72-77	1004.2	VVEKFKR						
5	64-71	1612.8	ELCLDPKENWVQR						
3	30- 51	2239.56	VIESGPHCANTEIIVKLS DR ^d						
4	51-63	2467.9	CQCIKTYSKPFHFIKELR						

^a Los péptidos generados durante la digestión de la CXCL8₁₋₇₇ por la EhCP2 fueron caracterizados teóricamente mediante el programa de predicción de proteólisis enzimática (Expasy-PeptideCutter), en las condiciones de cisteína sin tior con proteínas tratadas con reactivos para la electroforesis en geles de poliacrilamida. Se calcularon los pesos moleculares, el sitio de corte de la enzima y los fragmentos generados de los péptidos que posiblemente se generaron durante la proteólisis. ^b EhCP2 actúa preferentemente sobre residuos de arginina en la posición 2 (P2), del sustrato mediante el sitio 2 (S2), del bolsillo en el sitio activo (Que et al., 2002). ^c Posibles sitios de proteólisis en el sustrato. ^d Residuos de cisteína conservados.

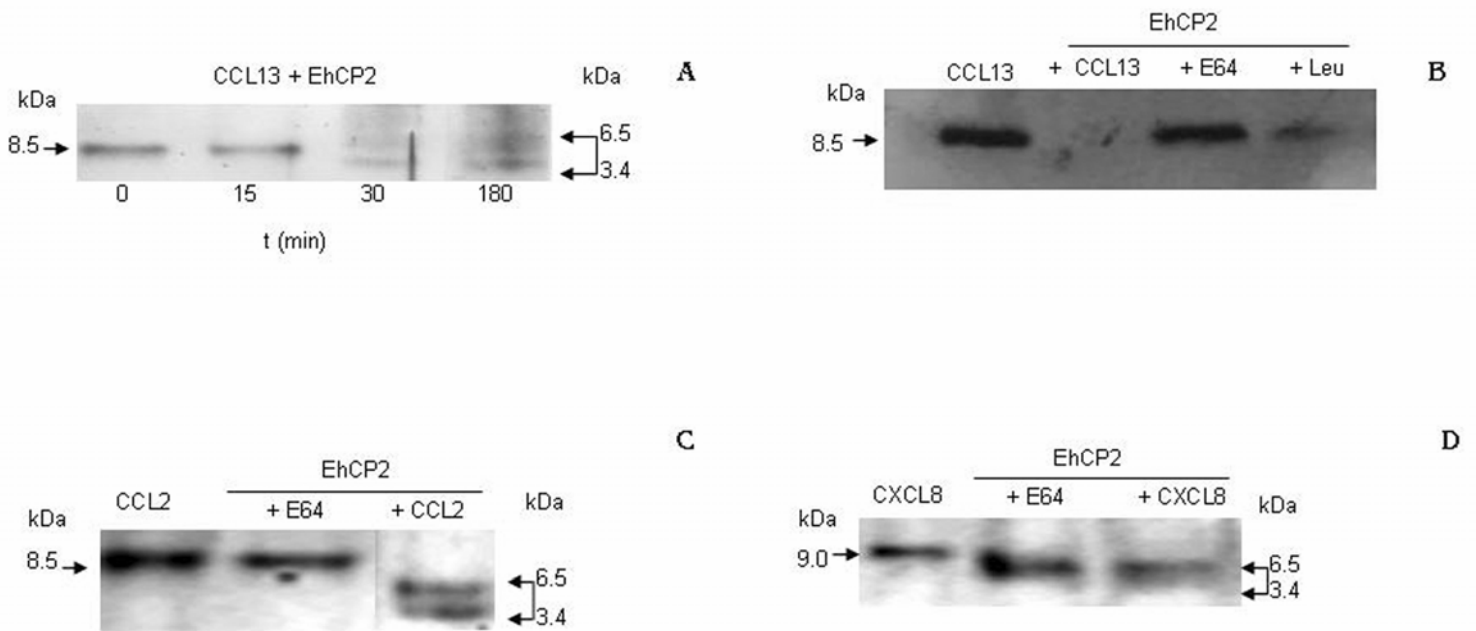


Figura 5. Proteólisis de miembros de las quimiocinas-CC y CXC por EhCP2.

A. Cinética de la proteólisis de CCL13 (100 ng/ml), por la EhCP2 (2.5 μ M), a partir de 15 minutos.

B. Western blot de CCL13 (100 ng/ml), tratada con EhCP2 (2.5 μ M), sin inhibir e inhibida con E-64 (20 μ M) y leupeptina (10 μ M), usando un anticuerpo policlonal contra CCL13.

C. Péptidos producto de la proteólisis de CCL2 (200 ng/ml), por la EhCP2 (2.5 μ M), separados por electroforesis y detectados con plata.

D. Péptidos generados de la proteólisis de CXCL8₁₋₇₇ (200 ng/ml), por la EhCP2 (2.5 μ M), separados por electroforesis y tratados con plata.

EhCP2 inhibe la migración de células monocíticas humanas por efecto sobre CCL13.

La digestión de la CCL13 en dos péptidos por efecto directo de la EhCP2 se observó en geles de poliacrilamida, nosotros en ensayos de quimiotaxis probamos que esta proteólisis generó la desactivación de la quimiocina, lo cual se tradujo en la inhibición de la migración de las células monocíticas como se observa en la figura 6 B. Esta actividad quimiotáctica de la CCL13 fue previamente confirmada en un gradiente de diferentes concentraciones de la quimiocina; la respuesta de las células monocíticas THP-1 fue más alta a 100 ng/ml como lo muestra en la figura 6 A. Nuestros datos muestran que CCL13 tratada con la proteasa de cisteína inducía menor migración de las células monocíticas THP-1, que la quimiocina sin tratar con la enzima amibiana, y esta relación fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), (Figura 6 B). Como se muestra en la figura 6 B, y en figuras que se muestran posteriormente, la inhibición de la proteasa amibiana con E-64 u otro inhibidor de proteasas de cisteína provoca la recuperación de la migración de las células monocíticas a niveles del control positivo (CCL13 sin tratamiento).

Adicionalmente en estos ensayos se descartó la posibilidad de que la EhCP2 estuviese asociada con enterotoxinas provenientes del cultivo de amibas pretratando la EhCP2 con polimixina B, un agente neutralizante de lipopolisacaridos, y luego la evaluamos bajo las mismas condiciones. Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio de la migración se debe al tratamiento de CCL13 con la EhCP2 y no a la presencia de endotoxinas bacterianas o de otros agentes asociados a la amiba; ya que no encontramos diferencia alguna en cuanto al efecto inhibitorio observado cuando CCL13 fue tratada con la EhCP2, aún con la preinbación con polimixina B, esto indirectamente nos indica que la muestra no estaba asociada a LPS (Figura 6 B). La reducción de la migración de las células monocíticas por efecto de la EhCP2 sobre la CCL13 fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), cuando se compara con la quimiotaxis de las células monocíticas hacia CCL13 sin tratar con la enzima amibiana.

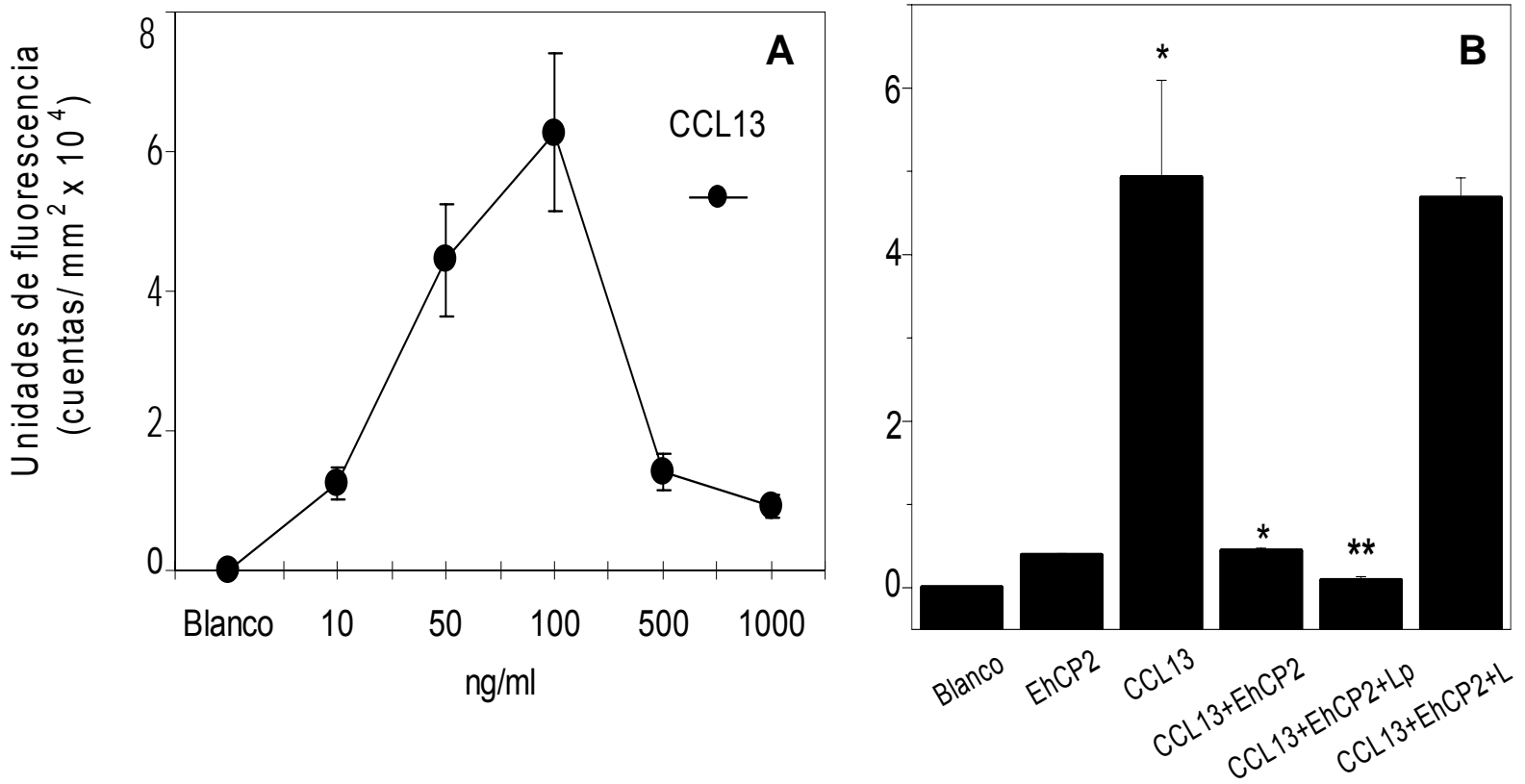


Figura 6. Inhibición de la función quimiotáctica de la CCL13 por efecto de la EhCP2.

- A.** Curva de quimiotaxis de las células monocíticas THP-1 marcadas con calceína-AM (0.5 μ M), a diferentes concentraciones de CCL13. Los datos expresados en cuentas/mm² fueron representados en la media \pm desviación estándar (n=3).
- B.** Inhibición de la quimiotaxis de las células monocíticas THP-1 en la CCL13 (100 ng/ml), tratada con EhCP2 (2.5 μ M). Recuperación de la migración de las células monocíticas al inhibir la actividad enzimática de la EhCP2 con leupeptina (L, 10 μ M). Efecto directo de la EhCP2 sobre la modificación de la actividad quimiotáctica de CCL13 al preincubar la proteasa ambiental con polimixina B (Lp, 10 μ M). Controles, blanco: HBSS y EhCP2 en HBSS. Los resultados fueron expresados en media \pm error estándar. * Diferencias significativas entre CCL13 sin tratar y tratada con EhCP2 ($p < 0.05$, n=3). ** Diferencias significativas entre CCL13 sin tratar y tratada con EhCP2 previamente incubada con polimixina B ($p < 0.05$).

El efecto de la EhCP2 sobre la actividad biológica de la CCL13 fue corroborado con el uso de inhibidores de proteasas de cisteína (Figuras 7 A y B). Leupeptina, un inhibidor de proteasas de cisteína, ratificó que el efecto observado de inhibición sobre la actividad quimiotáctica de esta quimiocina fue debido a la proteólisis de la CCL13 por la EhCP2; al mostrar que la migración de las células monocíticas THP-

1 se recuperó también al tratar la enzima amibiana con leupeptina y E-64 (Figuras 7 A y B), casi a nivel del control positivo (CCL13 sin tratamiento). Los porcentajes de migración aclararon que la inhibición alcanzada fue del 82 % para E-64 y del 100 % para la leupeptina, respectivamente, lo cual indica que la EhCP2 actúa sobre CCL13 directamente y reduce su actividad quimiotáctica (Tabla 7). Las diferencias entre la inhibición de la migración de las células monocíticas por efecto de la EhCP2 y la restauración de la migración con la EhCP2 inhibida fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Adicionalmente, los controles negativos no mostraron variación importante de la actividad de la CCL13 con el uso de los inhibidores, por lo que se confirmó que el efecto observado fue inducido por la actividad de la EhCP2 sobre la CCL13 (datos no mostrados).

Tabla 7. Porcentaje de migración de las células monocíticas al tratar CCL13 con EhCP2. Efecto de los inhibidores de proteasas de cisteína.

		E-64	Leupeptina
CCL13	100	-	-
CCL13 + EhCP2 - Inhb		28	41.69
CCL13 + EhCP2 + Inhb		82	100

Porcentajes de migración calculados a partir de los datos de 1 de 10 experimentos, realizados para cada inhibidor. El porcentaje de migración se calculó tomando la migración de las células monocíticas hacia CCL13 intacta (100 ng/ml) como el 100% de actividad migratoria, y luego se tomaron los valores provenientes del tratamiento de la CCL13 con la EhCP2 (2.5 μ M), y los datos de la actividad quimiotáctica con la enzima amibiana inhibida con E-64 (20 mM) y leupeptina (10 mM), para el cálculo de los porcentajes de migración bajo las diferentes condiciones.

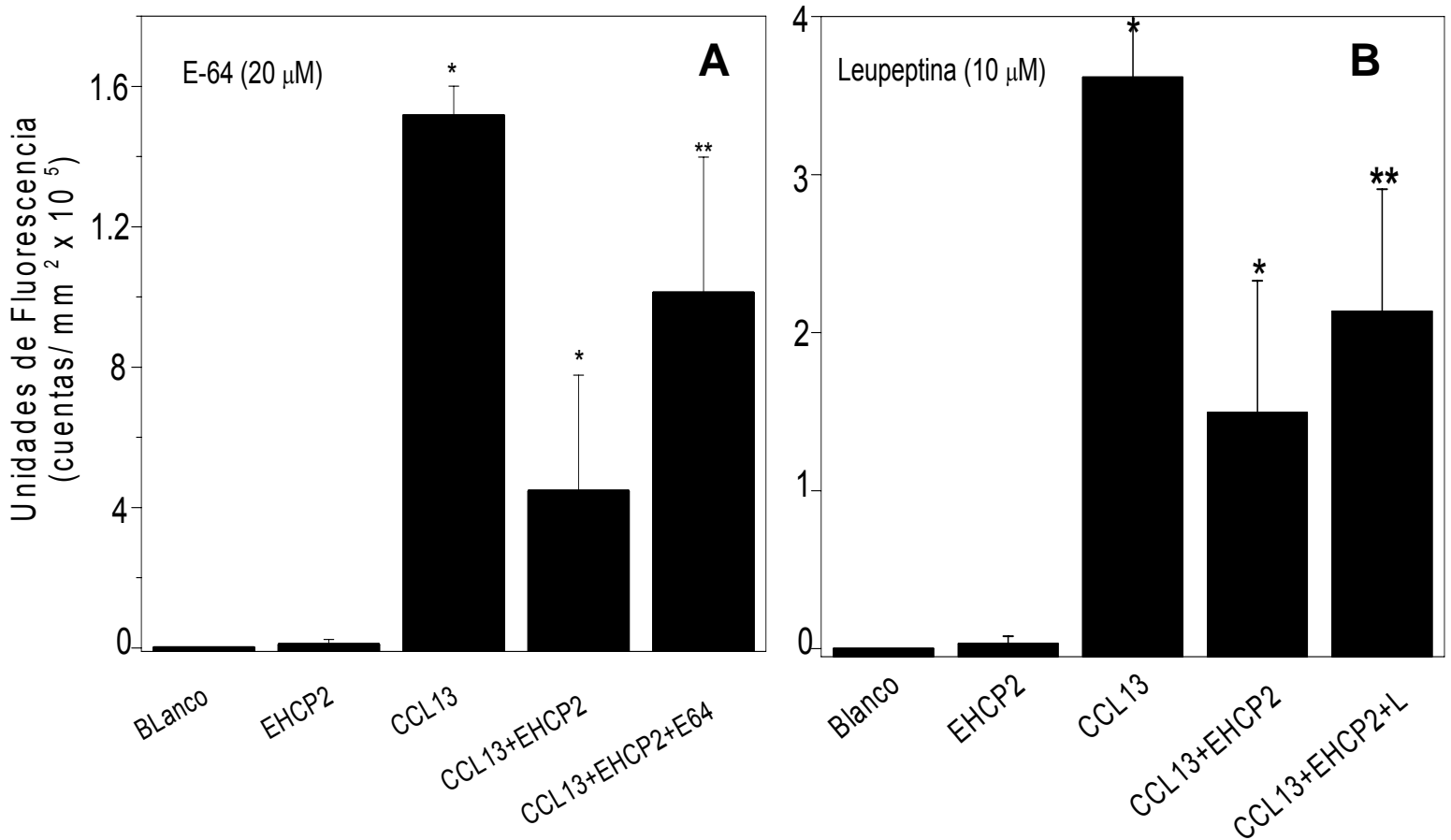


Figura 7. Inhibición de la actividad enzimática de EhCP2 por E-64 y leupeptina y su efecto sobre la actividad quimiotáctica de CCL13.

Quimiotaxis de las células monocíticas THP-1 a CCL13 (100 ng/ml), tratada y sin tratar con la EhCP2 (2.5 μM). Inhibición de la actividad enzimática de la EhCP2 con leupeptina (10 μM) (A), y E-64 (20 μM) (B). Controles: Blanco: HBSS y EhCP2 en HBSS. * Diferencias significativas entre la migración de células monocíticas con CCL13 tratada y sin tratar con EhCP2 ($p < 0.05$, $n = 9$). ** Diferencias significativas entre la migración de células monocíticas tratadas con EhCP2 con y sin los inhibidores ($p < 0.05$, $n = 9$).

EhCP2 inhibe la migración de células monocíticas de una manera dependiente de la concentración.

El efecto de la EhCP2 sobre la migración de las células monocíticas THP-1 mediada por CCL13 depende de la concentración de esta enzima; a concentraciones

más altas de 0.5 μM de la EhCP2 hubo mayor inhibición de la migración de las células monocíticas (Figura 8). Así, la inhibición de la migración de las células monocíticas depende de la concentración de la EhCP2, y la disminución del reclutamiento de las células monocíticas cuando las concentraciones de la EhCP2 estuvieron entre 2.5 μM a 5 μM , aunque una concentración de la EhCP2 de 1 μM ya provoca un buen efecto inhibitor de la actividad quimiotáctica de la CCL13. Al comparar la migración de las células monocíticas inducida por la CCL13 sin tratar con la enzima amibiana, y la migración de las células monocíticas a las diferentes concentraciones de EhCP2 se encontró que estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

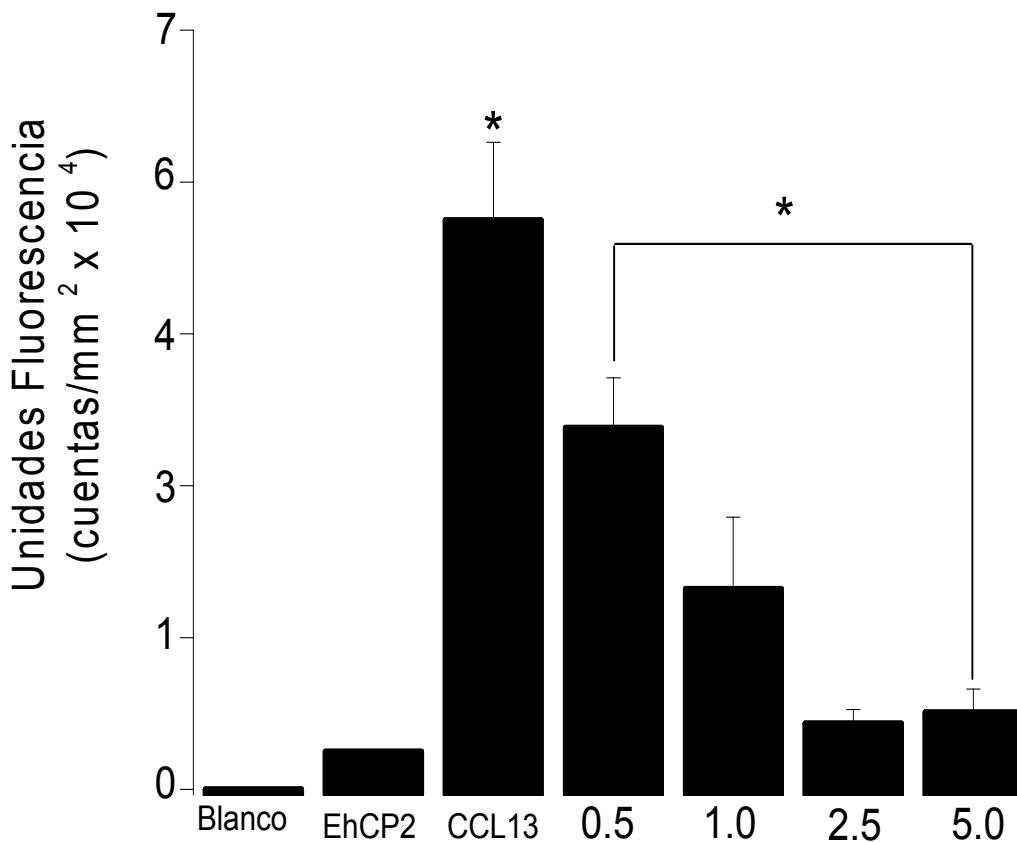


Figura 8.
Inhibición de la migración de células monocíticas mediada por CCL13 a diferentes concentraciones de la EhCP2.

CCL13 (100 ng/ml), tratada con EhCP2 no induce la migración de células monocíticas THP-1, y este efecto depende de la concentración de la EhCP2. Controles: Blanco: HBSS y EhCP2 en HBSS. Los resultados se expresaron en media \pm error estándar.

*Diferencias significativas entre la actividad de la CCL13 sin tratar y tratada con EhCP2 a diferentes concentraciones ($p < 0.05$, $n=9$).

Cinética de inhibición de la migración de células monocíticas por EhCP2

Como se observa en la figura 9, el efecto de la EhCP2 sobre la CCL13 fue dependiente del tiempo. La migración de las células monocíticas fue inhibida a partir de los 15 minutos, y fue mayor a los 180 minutos. En los primeros 15 minutos de proteólisis de la CCL13 por la EhCP2, no hubo inhibición significativa de migración de las células monocíticas como a los 180 minutos, tiempo en el cual la migración de las células monocíticas se redujo el doble que a los 15 minutos, denotando mayor inhibición a tiempos de incubación largos. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con CCL13 sin tratar con la enzima amibiana ($p < 0.05$).

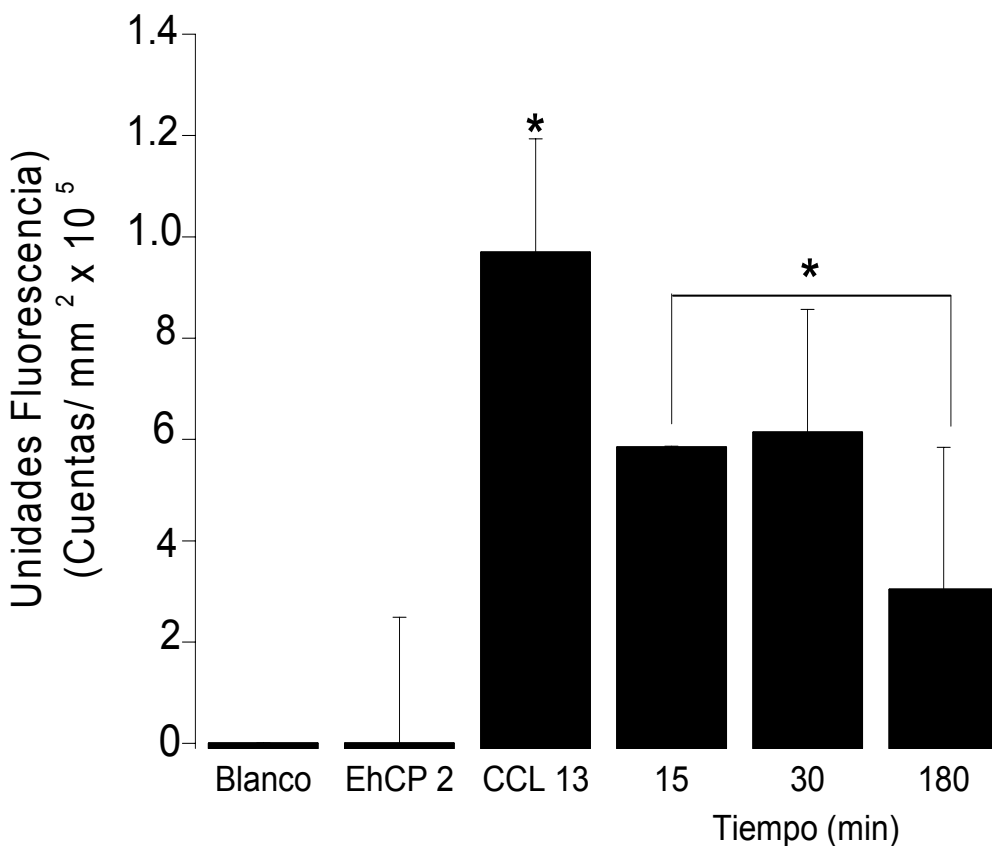


Figura 9. Cinética de inhibición de la migración de células monocíticas por EhCP2.

Curso temporal del efecto inhibitorio de la migración de las células monocíticas THP-1 provocado por la proteólisis de CCL13 (100 ng/ml) por la EhCP2 (2.5 μ M). Controles: Blanco: HBSS y EhCP2 en HBSS. Los resultados fueron expresados en media \pm error. *Diferencias significativas entre la migración inducida por CCL13 sin tratar y tratada con la EhCP2 entre 15 minutos y 180 minutos ($p < 0.05$, $n=9$).

El reclutamiento de las células monocíticas THP-1 depende de receptores acoplados a proteínas G.

La figura 10 muestra que al tratar las células monocíticas THP-1 con la toxina pertusiss, un inhibidor de proteínas G heterotrimericas, estas no respondieron al gradiente de CCL13, lo cual fue ocasionado por la inhibición de las proteínas G acopladas a los receptores CC. Por el contrario, las células monocíticas sin tratamiento con la toxina pertusiss presentaron un patrón de respuesta ante la quimiocina (Figura 10 A), comportamiento que se debe a que los receptores CC acoplados a proteínas G, a los cuales se une esta quimiocina, están funcionales. Cuando se probaron las condiciones usuales de los experimentos para probar actividad quimiotáctica, nosotros encontramos que en las células tratadas con la toxina pertusiss no se observó respuesta ante ninguna de las condiciones probadas (Figura 10 B). Por el contrario, se observó que células monocíticas THP-1 sin tratar con la toxina pertusiss ocurrió el fenómeno de inhibición de la actividad quimiotáctica de CCL13 preincubada con EhCP2; además la respuesta de estas células ante CCL13 sin tratar con la enzima amibiana también fue observada (Figura 10 B). Al comparar la respuesta de las células monocíticas ante CCL13 cuando se tratan con la toxina y sin el tratamiento se encontró que habían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

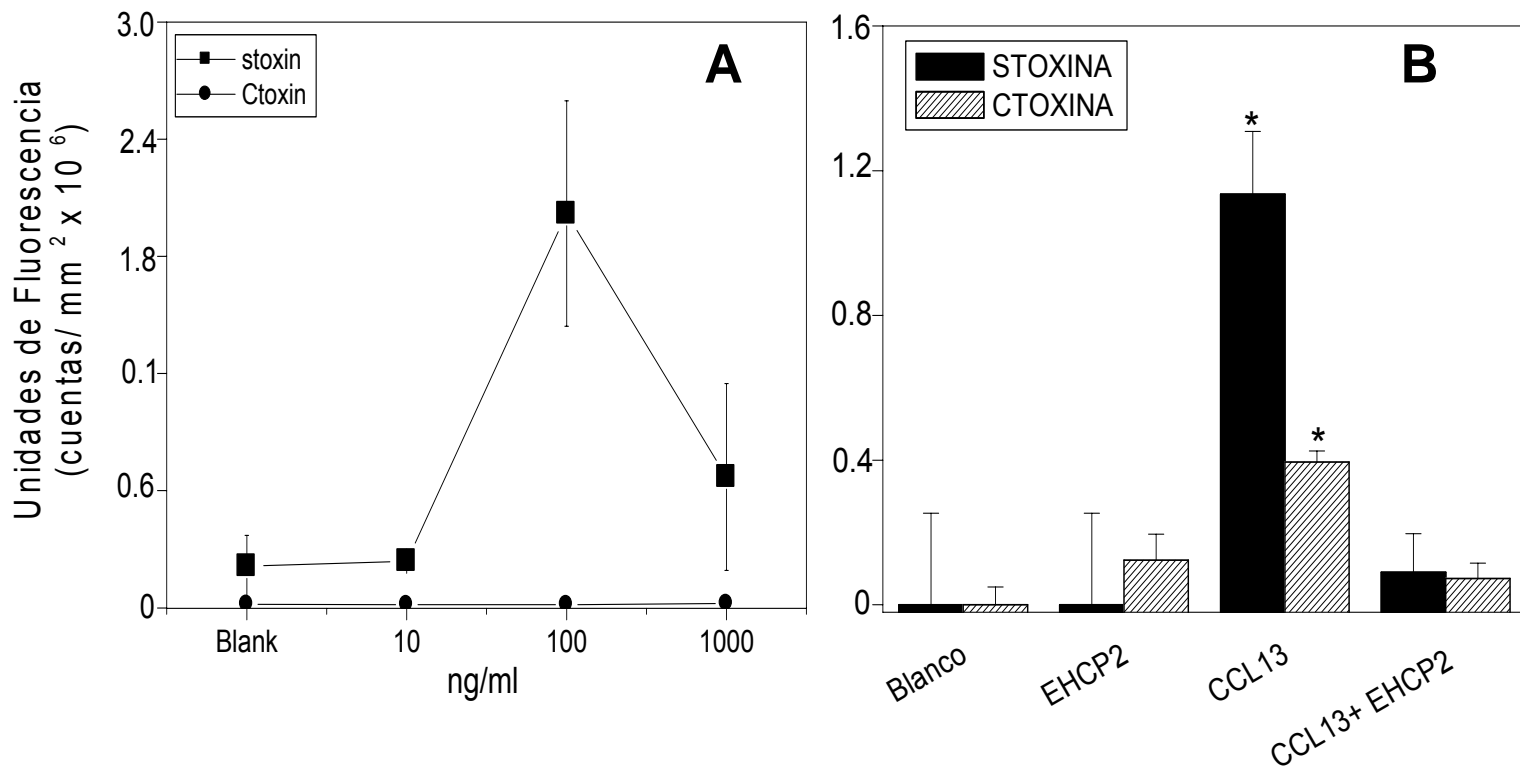


Figura 10. Reducción de la migración de las células monocíticas por efecto de la toxina pertusiss sobre receptores CC.

- A. Curva de quimiotaxis de las células monocíticas THP-1 tratadas y sin tratar con toxina contra CCL13.
- B. Abatimiento de la migración de las células monocíticas THP-1 provocado por la preincubación de las células con toxina *pertusiss* (200 ng/ml). Respuesta a CCL13 (100 ng/ml), de las células monocíticas THP-1 sin tratar con la toxina pertusiss (control positivo), e inhibición de la migración producto del tratamiento con EhCP2 (2.5 μ M). Controles: Blanco, solución HBSS y la EhCP2 en HBSS. Los resultados se expresaron en media \pm error estándar. *Diferencias significativas entre la migración de las células tratadas y sin tratar con la toxina pertussis ($p < 0.05$, $n=6$).

EhCP2 actúa también sobre otros miembros de la subfamilia CC.

..... La inhibición de la migración de las células monocíticas también está dada por la inactivación de otras quimiocinas de la familia CC (Figura 11). Se probó la CCL2, una de las quimiocinas de esta familia implicadas en procesos inflamatorios en varias

infecciones parasitarias. Las células monocíticas respondieron a un gradiente de la CCL2, como se observa en la figura 11 A. La EhCP2 también afectó las funciones de la CCL2; la migración disminuyó con CCL2 tratada con la enzima amibiana en comparación con la migración de las células monocíticas que responden a la CCL2 sin tratar con la EhCP2 (Figura 11 B), y estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La migración de las células monocíticas se restauró cuando la EhCP2 es inhibida con E-64. Esto estableció que el EhCP2 inhibe la función de CCL13 y CCL2, integrantes de la familia de las quimiocinas CC ambas encargadas del reclutamiento de células monocíticas al foco inflamatorio o infeccioso.

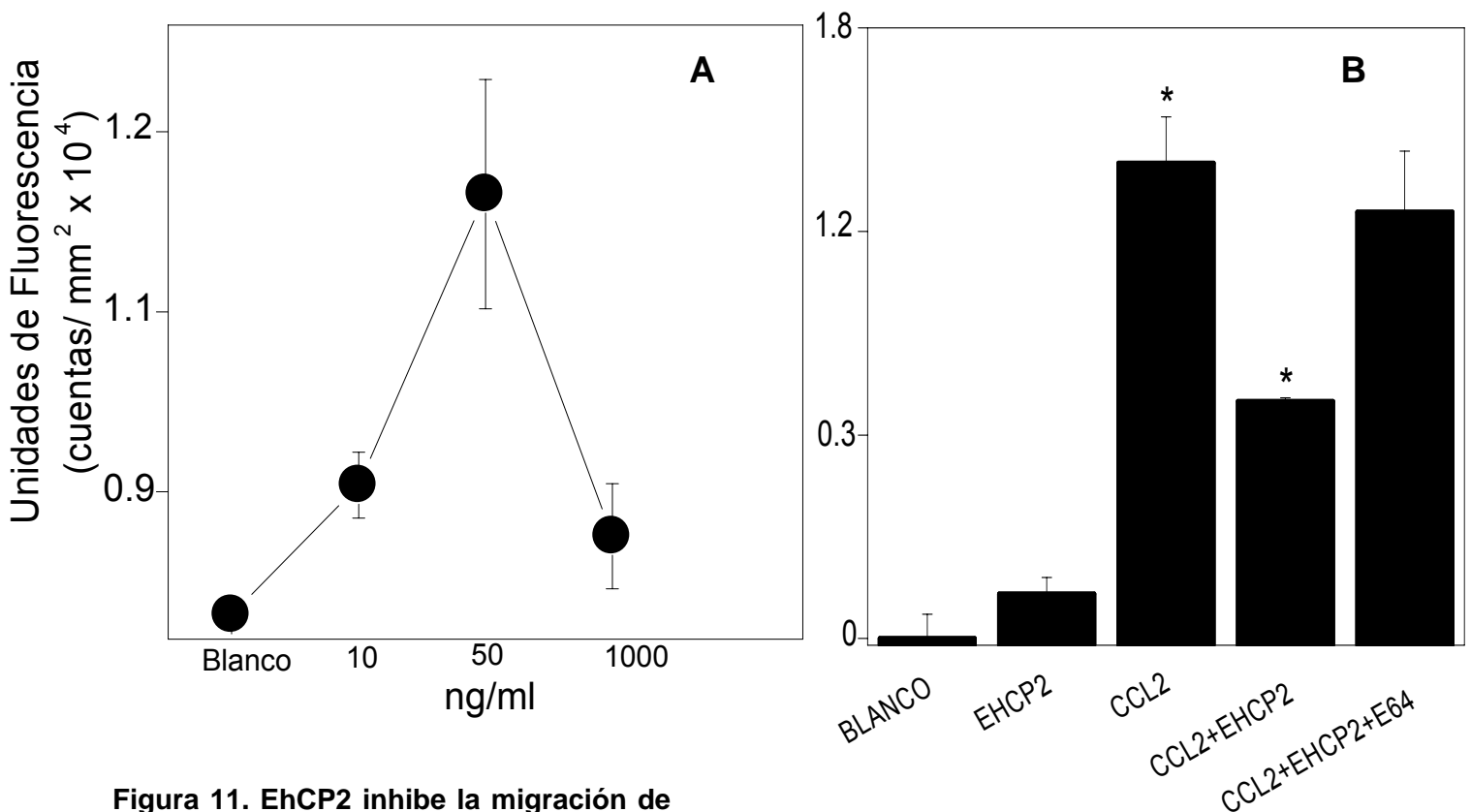


Figura 11. EhCP2 inhibe la migración de monocitos mediada CCL2

A. Respuesta quimiotáctica de las células monocíticas THP-1 a diferentes concentraciones de CCL2.

- B. Inhibición de la migración de las células monocíticas THP-1 mediada por la CCL2 (100 ng/ml), preincubada con EhCP2 (2.5 μ M). Los resultados se expresaron en media \pm error estándar. Controles: Blanco: HBSS y EhCP2 en HBSS*Diferencias significativas entre la migración inducida por CCL2 sin tratar y tratada con EhCP2 ($p < 0.05$, $n=9$).

EhCP2 induce la migración de neutrófilos humanos al actuar sobre CXCL8

La inducción de CXCL8 por las células epiteliales intestinales, y el aporte de neutrófilos al foco inflamatorio durante la infección por *E. histolytica*, es importante en la patogénesis de la amibiasis; por lo que se probó si la CXCL8 también era proteolizada por la EhCP2, y como era afectado el reclutamiento de los neutrófilos (Figura 12). Los neutrófilos aislados de sangre periférica humana respondieron al gradiente de CXCL8, como se muestra en la figura 12, para un gradiente con la CXCL8 de 77 aminoácidos. Los resultados muestran que contrariamente a lo que se había encontrado con las quimiocinas de la familia CC, la proteólisis de la CXCL8₁₋₇₇, por la EhCP2 indujo fuertemente la migración de los neutrófilos, cuando se uso la CXCL8₁₋₇₇, incluso más alto que la CXCL8₁₋₇₇ sin tratar con la EhCP2. Al comparar con la migración de los neutrófilos inducida por CXCL8 sin tratar con la EhCP2 se encontró que las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El uso de inhibidores para bloquear la actividad de la EhCP2 mostró una migración de neutrófilos parecida a la observada cuando se probó la CXCL8 sin tratar con la enzima amibiana (Figura 12 B). Los resultados fueron diferentes cuando la CXCL8 tenía sólo 72 aminoácidos debido a que la proteasa amibiana produjo la inhibición de la migración de los neutrófilos, como efecto de la incubación de la EhCP2 con la CXCL8₁₋₇₂, lo cual se observa en la figura 13. Al comparar la respuesta de migración de los neutrófilos ante la CXCL8 tratada con la EhCP2 y la respuesta ante la CXCL8 sin tratar se encontró que las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

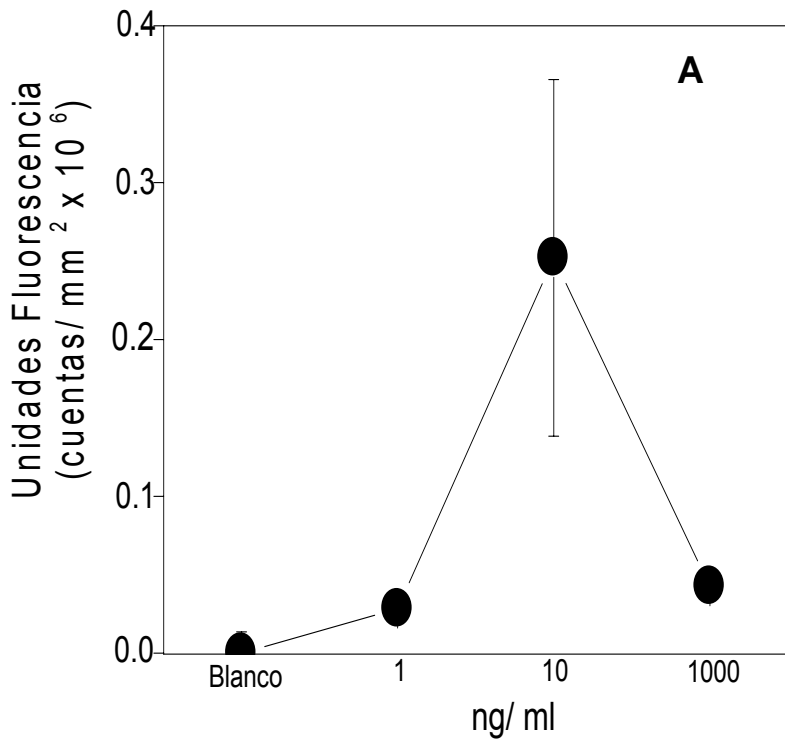
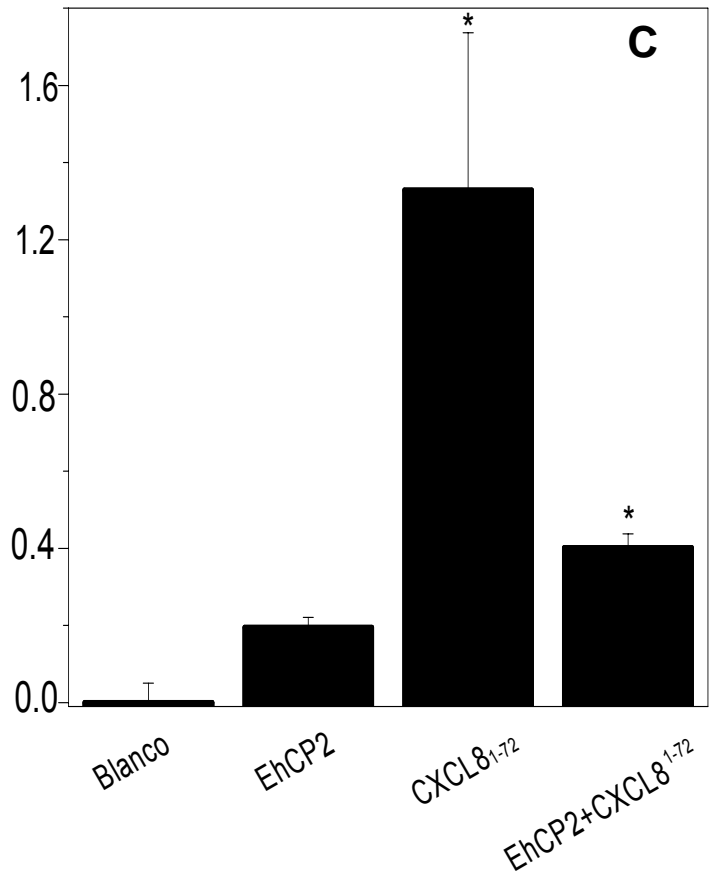
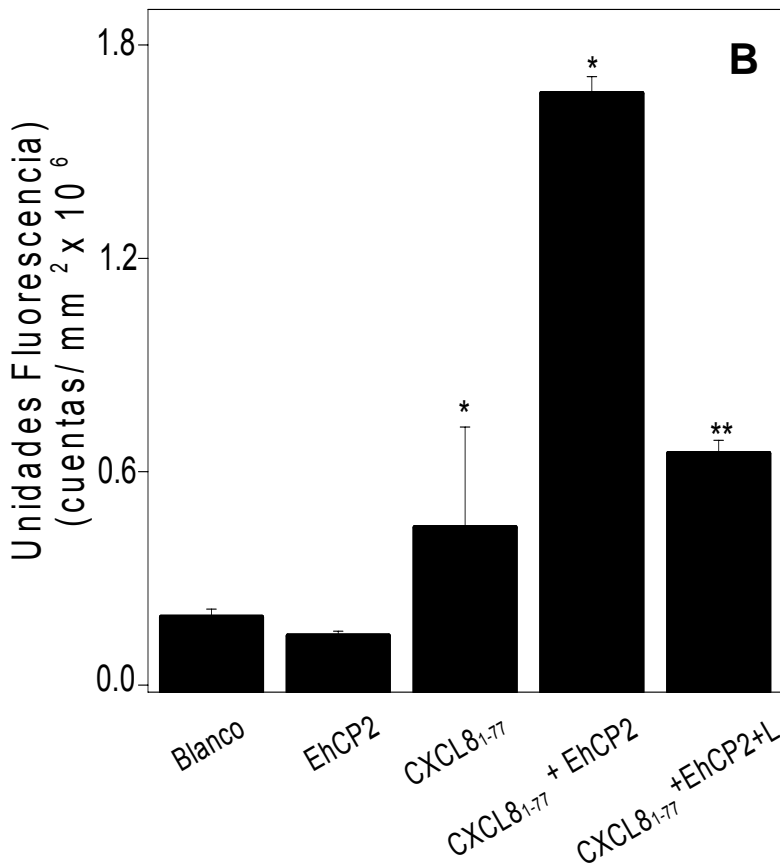


Figura 12. EhCP2 induce la migración de neutrófilos mediada por CXCL8₁₋₇₇ (IL-8).

- A. Respuesta quimiotáctica de los granulocitos aislados de sangre periférica humana a diferentes concentraciones de CXCL8₁₋₇₇.
- B. Potenciación de la migración de los granulocitos humanos mediada por la CXCL8₁₋₇₇ (100 ng/ml), tratada con la EhCP2 (2.5 μM), e inhibición de la actividad enzimática de EhCP2 con leupeptina (10 μM). Controles: Blanco: HBSS y EhCP2 en HBSS. *Diferencias significativas entre la migración inducida por CXCL8 sin tratar y tratada con EhCP2 ($p \leq 0.05$, $n = 9$).
- C. Inhibición de la actividad quimiotáctica de CXCL8₁₋₇₂ por EhCP2.



Discusión

En este estudio nosotros demostramos que la EhCP2 altera las actividades quimiotrayentes de las quimiocinas CCL2, CCL11 y CCL13, miembros de la subfamilia de las quimiocinas CC, y de CXCL8, un miembro muy representativo de las quimiocinas CXC.

Hallazgos de más de una década muestran que las quimiocinas pueden ser atacadas por diversas proteínas derivadas de patógenos que alteran su funcionamiento, y con ello la respuesta inflamatoria. Las proteínas derivadas de patógenos ejercen un amplio espectro de efectos contra el sistema inmunitario, así el grueso de estas proteínas han sido identificadas en virus e incluyen proteínas que mimetizan quimiocinas y sus receptores. Las bacterias y parásitos protozoarios o helmintos secretan enzimas capaces de modificar la estructura de las quimiocinas, y con ello sus funciones quimioatrayentes, y es posible que puedan también rasurar receptores de quimiocinas. Nosotros encontramos que la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* inhibe el reclutamiento de monocitos cuando actúa sobre las quimiocinas CCL2 y CCL13. Pero que puede también aumentar la migración de los granulocitos al actuar sobre CXCL8.

Nuestros resultados demuestran que la EhCP2 hace proteólisis CCL13 y CCL2, quimiocinas de la familia CC, en dos péptidos que provocan un efecto inhibitorio o antagonista sobre células monocíticas, aunque el análisis teórico de la proteólisis de la molécula muestra que podrían generarse al menos cinco péptidos. La proteólisis de CCL13, en al menos dos péptidos: uno de 3.9 kDa, 2.6 kDa aproximadamente, se traduce en la inhibición de la migración de los monocitos, una de las principales funciones de las quimiocinas de la familia CC. En este trabajo se analizó también el efecto de la EhCP2 sobre CXCL8₁₋₇₇, quimiocina de la familia CXC, y se encontró que la proteasa de cisteína amibiana trunca la molécula potenciando su actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos humanos.

La inhibición de la migración de los eosinófilos, regulada por CCL11, también fue propiciada por la proteólisis de CCL11 por metaloproteasas secretadas por *Necator americanus*, como lo hace la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* con las quimiocinas CC, CCL2 y CCL13 (Culley et al., 2000). Culley et al., (2000), propusieron

entonces la idea de que proteinasas provenientes de parásitos helmintos pueden provocar el manejo de la respuesta inflamatoria al inhibir el reclutamiento de eosinófilos que son importantes en la destrucción de estos parásitos (Chic y Acensué, 2002; Coger et al., 2000).

El efecto inhibitorio de la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* sobre la migración de los monocitos puede representar una estrategia que le permite a *E. histolytica* alterar el reclutamiento de monocitos, lo cual podría estar asociado con la regulación de la respuesta inflamatoria del hospedero. Hellberg et al (2001), encontró que el 30% de la actividad enzimática de los trofozoítos de *E. histolytica* se debe a la EhCP2, y está asociada con la destrucción de monocapas y la fagocitosis de eritrocitos. Este dato fortalece nuestra interpretación de que EhCP2 puede estar interviniendo en la alteración de la inflamación. Que et al (2002), demostraron la localización de EhCP2 en las membranas del trofozoíto y en membranas de los compartimentos endosomales cuando hay contacto con eritrocitos, y durante la fagocitosis de los mismos. Esta proteasa amibiana puede ser liberada extracelularmente lo cual apoya también la idea de que la EhCP2 pueda estar asociada a la invasión del hospedero. Sin embargo, Olivos-García et al. (2004), proponen que la liberación de la EhCP2 extracelularmente es muy baja, en el modelo de abscesos hepáticos en hamsters, aunque la encontraron asociada con respuesta inflamatoria más que con daño al hígado.

Asimismo, estudios realizados con otras proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica* demostraron que estas enzimas son capaces de modular la respuesta inmunitaria humoral y proinflamatoria (Que et al., 2003; Zhang et al., 2000). Que et al. (2003), encontraron que EhCP5 inactiva las funciones de la IL-18 (una citocina pro-inflamatoria), al actuar sobre la molécula inmadura (pro-IL18), haciendo proteólisis de la IL-18 inmadura y convirtiéndola en una IL-18 madura, lo cual origina la inhibición de la síntesis de INF- γ por las células T y asesinas naturales (NK), principales blancos de los efectos de esta citocina y con ello, *E. histolytica* modula la respuesta proinflamatoria y la activación de los macrófagos, que son la principal línea de defensa contra los trofozoítos del parásito (Denis y Chadee, 1988).

EhCP5 también altera la respuesta inflamatoria al ejercer su efecto sobre la pro-IL1- β , produciendo mayor cantidad de IL1- β -madura (una citocina pro-inflamatoria).

La IL1- β -madura está relacionada con la inducción de IL-8 (CXCL8), por las células epiteliales intestinales, y con el incremento en el reclutamiento de neutrófilos, que favorecen un estado inflamatorio adecuado para la invasión de los trofozoítos (Zhang et al., 2000; Seydel et al. 1997, Yu y Chadee, 1997, Eckman et al, 1995).

Otras proteasas de cisteína derivadas de otros parásitos también alteran la respuesta inmunitaria modificando los niveles de TGF- β , como la catepsina-B de *Leishmania mexicana* que activa el pro-TGF- β , una citocina antiinflamatoria, inhibiendo el funcionamiento de macrófagos, linfocitos T y otros leucocitos (Somanna et al., 2000; Gantt et al., 2003).

La inhibición del reclutamiento de células monocíticas THP-1 que se observó al tratar CCL13 con EhCP2 se debieron a los efectos directos de la enzima ambiente sobre la quimiocina al generar dos péptidos no funcionales y no por la presencia de enterotoxinas que pudieran estar asociadas a la enzima. Así, la EhCP2 tratada con polimixina B, un conocido neutralizador de lipopolisacáridos (Tsuzuki et al. 2001), provoca el mismo efecto inhibitorio, indicando indirectamente que la EhCP2 no está asociada a otras moléculas y que afecta directamente el funcionamiento de las quimiocinas.

Los efectos de la EhCP2 sobre CCL13 quedaron confirmados con el uso de inhibidores específicos para proteasas de cisteína. Previamente, nosotros confirmamos que leupeptina y E-64 inhiben la actividad de la enzima y bloquean la acción de la EhCP2 sobre el sustrato Z-Arg-Phe-AMC, evitando la degradación del mismo. Con el uso de estos inhibidores se encontró que hay una restauración considerable de la migración de monocitos, aunque estos inhibidores no son totalmente efectivos para abatir completamente la actividad de la enzima, lo cual podría estar asociado con la baja concentración que usamos de estos inhibidores, especialmente de E-64 (20 μ M). En el trabajo de Que et al. (2002), se mostró que E-64 bloqueó completamente la actividad enzimática de la EhCP2, usando una concentración de 100 μ M de este inhibidor en suspensión, y empleando el sustrato Z-Arg-Phe-AMC; pero esta concentración resultó perjudicial para las células THP-1 en nuestros ensayos de quimiotaxis, lo cual ocasionó una gran pérdida de viabilidad en estas células, por lo que esta concentración no pudo ser probada con las células monocíticas THP-1. Por otro

lado, las concentraciones bajas de E-64 no alcanzan a actuar totalmente sobre el sitio activo de la EhCP2, y está mantiene cierta actividad enzimática.

Es interesante señalar que el efecto inhibitor del reclutamiento de células monocíticas THP-1 propiciado por la proteólisis de CCL13 puede ser debido al efecto antagonista de los péptidos generados sobre el receptor CCR2, expresado por las células THP-1 (Phillips et al., 2005). Estudios realizados sobre células HEK-293 transfectadas con CCR2 mostraron que CCL13 se une a CCR2, un receptor acoplado a proteínas G, para inducir efectos como la quimiotaxis de monocitos (García et al., 1996; Godiska et al., 1997). No obstante, está reportado también que la ruptura de CCL13 y otras quimiocinas de la familia CC origina proteínas truncadas que actúan como antagonistas de los receptores de quimiocinas, lo cual podría explicar la inhibición de la quimiotaxis de las células monocíticas (Gong y Clark-Lewis, 1995; Reckless y Grainger, 1999). Consecuentemente, nuestros resultados advierten que la inhibición de la migración por la EhCP2 se debe en parte a la interacción de los péptidos generados de la proteólisis de CCL13 con CCRs. Sin embargo, no hay que descartar que la proteólisis de CCL13 por EhCP2 produzca péptidos que no puedan unirse al receptor por la pérdida de secuencias de aminoácidos importantes en el reconocimiento, y unión al receptor CCR2, lo cual también ocasionaría una reducción de la actividad quimiotáctica de esta quimiocina.

McQuibban et al. (2002) encontraron que varias metaloproteasas humanas, que cortan de 4 a 7 aminoácidos del extremo aminoterminal de las quimiocinas CCL2, CCL8 y CCL13, generan proteínas truncadas con efectos antagonistas de la actividad de estas quimiocinas. CCL13 truncada en los primeros 7 aminoácidos del extremo aminoterminal pierde el efecto quimiotáctico sobre los monocitos, lo cual es debido a que la quimiocina truncada puede unirse al receptor CCR2 y provocar, con ello, un efecto antagonista. Estos efectos se convirtieron en la reducción, *in vivo*, de la inflamación relacionada con el escaso reclutamiento de monocitos (McQuibban et al., 2000).

En nuestro caso, la proteasa de cisteína 2 de *E. histolytica* truncó CCL13 en dos péptidos no funcionales o antagonistas, y aunque no se analizó la unión de los péptidos de CCL13 generados por el corte de la EhCP2, basados en los datos teóricos

de la proteólisis de CCL13 por una enzima amibiana que reconoce residuos con arginina en el sustrato (Que et al., 2002), que prefiere la secuencia de dos residuos de arginina adyacentes o un residuo de arginina y un residuo de fenilalanina; nuestros resultados muestran que la CCL13 truncada en dos péptidos sin función quimiotáctica sobre las células monocíticas THP-1; es posible especular que el péptido con el extremo aminoterminal (17 aminoácidos, 3.9 kDa, aproximadamente), generado del corte de esta molécula en los aminoácidos arginina y fenilalanina, podría unirse al CCR2 y CCR1, receptores-CC expresados por las células monocíticas, ejerciendo un efecto antagonista sobre alguno de los mencionados receptores (Baggiolini y Moser., 1997; Clark-Lewis et al., 1995). La unión de CCL13 con algún receptor CC, posiblemente CCR2 expresado por las células monocíticas THP-1, fue demostrada con la pérdida de respuesta que tienen estas células al gradiente de CCL13 por efecto del tratamiento con la toxina pertussis, una toxina que inactiva la actividad de GTPasa de la subunidad α_i de la proteína G heterotrimerica (Alberts et al., 1994), lo cual impide la señalización que, entre otras funciones, lleva a la migración de los leucocitos.

El efecto antagonista de la CCL13 truncada por la EhCP2 fue dependiente del tiempo posiblemente debido a la extinción del sustrato (CCL13). Los análisis sobre el sustrato fluorescente Z-Phe-Arg-AMC mostraron que la enzima amibiana fue capaz de digerir el sustrato desde tiempos muy cortos y mantener la actividad enzimática sobre el sustrato hasta los 60 minutos. Molinari et al. (2000), mostraron también que metaloproteasas contenidas en los productos de secreción de *Taenia solium* presentaban mayor actividad enzimática a tiempos largos (entre 4 y 6 horas). El efecto de la EhCP2 sobre la actividad de CCL13 fue también dependiente de la concentración de la enzima y del sustrato, como ha sido observado en la cruzipaña y otras enzimas parasitarias, tales como catepsina de *Leishmania*, y metaloproteasas de helmintos (Molinari et al., 2000; Serveau et al., 1996).

Por otro lado, la EhCP2 actúa también sobre otras quimiocinas de la familia CC; tal como CCL2, que también fue cortada por la EhCP2 en dos péptidos uno de 4.1 kDa de 21 aminoácidos que conserva el extremo aminoterminal, y que posiblemente la enzima amibiana corta esta quimiocina en dos residuos de arginina contiguos que se encuentran en esta proteína y que son reconocidos por la proteasa amibiana. Este

péptido de 4.1 kDa podría estar relacionado con la unión a CCR2 o CCR1 sobre las células monocíticas THP-1, y con el efecto antagonista, que está asociado con la inhibición de la migración de los monocitos.

Hecho de que CCL13 y CCL2 hayan sido truncadas por EhCP2, y que éste efecto originó la pérdida de la actividad quimiotáctica de estas quimiocinas puede extrapolarse a la amibiasis, y nos lleva a proponer que *E. histolytica* es capaz de secretar varias proteasas de cisteína, incluyendo la EhCP2, que alteran el tráfico de monocitos al sitio de infección. Este efecto se debe a la degradación de algunos miembros de la familia CC, como la CCL13 y CCL2, que da origen a péptidos antagonistas que inhiben el reclutamiento de los monocitos, lo cual representa otro mecanismo de evasión de *E. histolytica* para modular el tráfico y los mecanismos efectores de los macrófagos, importantes en la destrucción de este parásito (Denis y Chadee, 1998). El péptido FILM de *E. histolytica* también inhibe la migración de los monocitos, y confirma que este parásito cuenta con varias herramientas para evadir los mecanismos efectores de los macrófagos, inhibiendo el tráfico de estas células (Kretschmer et al., 2001).

Aunque, en la amibiasis sólo se ha reportado la inducción de CXCL8 y CXCL2 (quimiocinas de la familia CXC), por el epitelio intestinal (Yu y Chadee, 1997), no se conoce aún el papel de la familia de las quimiocinas CC, y otras quimiocinas. Sin embargo, en el contexto de la respuesta inmunitaria contra *E. histolytica*, existe la alteración de la diferenciación de respuesta inmunitaria hacia un perfil T_H2 , y la inhibición del reclutamiento de monocitos también puede contribuir con el cambio de la respuesta inmunitaria, al degradar CCL2 una de las quimiocinas que favorece la respuesta T_H1 (Brenier et al., 2000).

No obstante, sería importante definir los mecanismos precisos de cómo ocurre la inhibición de la migración de los monocitos con los péptidos generados de las quimiocinas. La red de quimiocinas es importante en la regulación de la respuesta inflamatoria y sería indispensable conocer: ¿cuáles quimiocinas de la familia CC participan en el proceso inflamatorio durante la amibiasis, y cuál es el efecto directo de estas quimiocinas CC sobre el desarrollo de la respuesta inmune celular?, y ¿cómo el parásito está manipulando esta respuesta inflamatoria *in vivo*?

La modificación de la respuesta inflamatoria por las enzimas amibianas no sólo ocurre a nivel de las quimiocinas CC, sino también afecta las actividades de las quimiocinas CXC. En este estudio se encontró que CXCL8₁₋₇₇ al ser tratada con la EhCP2 induce una mayor migración de granulocitos humanos. La EhCP2 actúa sobre los 4 a 6 primeros residuos del extremo aminoterminal de CXCL8₁₋₇₇, en el cual se localiza la secuencia ERL que contiene un residuo de arginina (Van den Steen et al. 2000; Sajid y McKerrow, 2002); la pérdida de estos 4 ó 6 residuos del extremo aminoterminal de CXCL8₁₋₇₇ provocaron la potenciación de la actividad de la quimiocina, al exponer el motivo ELR de CXCL8. La migración de granulocitos humanos fue mayor cuando la CXCL8₁₋₇₇ fue cortada por la EhCP2, e inclusive la respuesta fue aún más alta que la de la CXCL8 sin cortar. Al parecer, EhCP2 potenció las funciones quimiotácticas de CXCL8₁₋₇₇, como lo hacen la trombina y la metaloproteasa-9 (MMP9), después que la CXCL8₁₋₇₇ es secretada por células epiteliales y macrófagos (Helbert et al., 1990). Similarmente, Van den Steen et al. (2000), reportaron la potenciación de las funciones de la CXCL8 cuando fue cortada por la β -gelatinasa; esta enzima corta 6 aminoácidos que incrementaron los niveles de calcio, y aumentó la migración de los granulocitos, todo esto comparado con la quimiocina intacta, estas observaciones están relacionadas con la inducción de una respuesta inflamatoria.

Aunque, los análisis teóricos mostraron que la proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* podría estar generando varios péptidos de la CXCL8₁₋₇₇, en los geles de poliacrilamina (16%), modificados para la separación de péptidos por encima de 1 kDa, que no se observaron, y esto nos lleva a pensar que la proteasa realizó cortes en el extremo aminoterminal de esta quimiocina, exponiendo la región ERL asociada con la interacción al receptor, y lo cual la convierte posiblemente en una CXCL8 de 72 aminoácidos que como demostramos fue capaz aumentar la actividad quimiotáctica de la CXCL8, esta molécula se ha reportado que tiene 10 veces más afinidad por los receptores CXCR1 y CXCR2, lo cual, potenció la activación de los neutrófilos, y provocó un mayor reclutamiento de estas células (van Damme et al., 1990; Hebert et al., 1990); y esto explica el aumento en la actividad quimiotáctica. Una convertasa de CXCL8 en sobrenadantes de fibroblastos que actúa bajo el estímulo de IL-1, y que convierte la CXCL8 de 77 aminoácidos en CXCL8 de 72 aminoácidos ha sido reportada

recientemente, confirmando que la conversión de la CXCL8 es importante en la actividad de esta quimiocina (Ohashi et al. 2003).

Un efecto similar fue observado con la IL-1 β , la cual es cortada por una proteasa de cisteína de *E. histolytica* (EhCP5), de su forma pro IL-1 β a su forma madura (m IL1 β). La actividad de enzima activadora de interleucinas (ICE), que se encontró en la EhCP5, hace que la IL1 β cortada induzca mayor cantidad de nitratos en células L929, y este hecho está relacionado con la inducción de CXCL8 (Zhang et al. 2000), y otros mediadores inflamatorios asociados al foco inflamatorio en la amibiasis.

La proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* potencia las funciones quimioatrácticas de la CXCL8 induciendo un mayor reclutamiento de neutrófilos. Estas observaciones coinciden con los hallazgos que se tienen de que los neutrófilos acompañan el proceso inflamatorio propiciado por la *E. histolytica* (Seydel et al. 1997, Yu y Chadee, 1997, Eckman et al, 1995). La presencia de neutrófilos está asociada al daño observado en la colitis amibiana y es posible que este parásito en este ambiente penetre la barrera epitelial e invada capas más profundas del intestino (Seydel et al. 1997).

Contrariamente a lo esperado, el corte de la CXCL8₁₋₇₂ por la EhCP2 originó péptidos que no inducen actividad migratoria, debido probablemente a que la EhCP2 puede estar eliminando la región ELR, región del aminoterminal que es importante en el reconocimiento al receptor y unión al receptor de quimiocina (Clark-Lewis et al., 1995; Loestcher y Clark-Lewis, 2001); lo cual origina la propuesta de que la EhCP2 también puede estar modulando el reclutamiento de granulocitos, primero potenciando la actividad de la CXCL8, y luego posiblemente inhibe el reclutamiento de granulocitos al actuar sobre CXCL8₁₋₇₂, provocando la pérdida de actividad quimiotáctica.

La inducción del reclutamiento de neutrófilos durante la infección por *E. histolytica* ha sido bien documentada (van Zandbergen et al., 2002; Shaio et al., 1995; Ryu et al., 2004; Rubio-Krömer et al., 1998). En este proceso inflamatorio la inducción de citocinas como la IL-1 β y de quimiocinas como CXCL8 y CXCL1 por las células epiteliales intestinales, resulta en el incremento del reclutamiento de neutrófilos al foco infeccioso (Seydel et al. 1997, Yu y Chadee, 1997). Es posible que CXCL8₁₋₇₇ generada por el contacto de los trofozoítos de *E. histolytica* con el epitelio intestinal sea

potenciada por las proteasas de cisteína para aumentar la migración de los neutrófilos, lo que propiciaría un foco inflamatorio que está asociado con la invasión de los trofozoítos de *E. histolytica*, y con el daño al hospedero (Stanley, 2003). En la amibiasis la infiltración de neutrófilos se ha visto que está relacionada con el daño intestinal (Seydel, et al. 1997). No obstante, parte de este circuito sería también que las proteasas de cisteína modifiquen el extremo aminoterminal de CXCL8, que podría ser abundantemente de 72 aminoácidos, y esto resulte en la pérdida de actividad de la molécula, lo cual conlleva posiblemente a la reducción de la inflamación, y al establecimiento de este parásito.

En otras parasitosis, también se ha encontrado la modulación de la respuesta proinflamatoria del hospedero en beneficio del parásito (Grensis y Entwistle, 1997; Falcone et al., 2001; Aliberti et al., 2003). Falcone et al. (2001), observó que proteínas derivadas de *A. suum* interaccionan con el receptor CXCR2 para activar las células RBL transfectadas con CXCR2, la activación influye en la movilización de calcio intracelular, y en una mayor producción de anión superóxido, es posible que la activación de este receptor esté relacionado a la desensibilización cruzada con el CXCR2 y que compita con la CXCL8, modificando la respuesta inflamatoria. Varios parásitos secretan proteínas que son capaces de unirse a los receptores para CXCL8: CXCR1 y CXCR2, eliminando la posibilidad de que CXCL8 se una a estos receptores. En el caso de *L. major*, proteínas derivadas del parásito tienen efectos quimiotácticos sobre neutrófilos humanos, lo cuáles sirven de barreras protectoras del ataque inmunitario a los trofozoítos de *L. major* al fagocitarlos (Laskay et al., 2003).

Con todo lo anterior se propone un modelo en el que se resumen los hallazgos de este trabajo (Figura 14), en cual hay una modificación de la actividad quimiotáctica de las quimiocinas CC y CXC, lo cual podría significar que *Entamoeba histolytica* está modulando la respuesta inflamatoria por medio de las proteasas de cisteína que secreta este parásito durante el contacto con las células del hospedero. En este modelo, *E. histolytica* al unirse al epitelio intestinal dispara la secreción de las quimiocinas CXCL2, CXCL8, y CCL2, CCL13. La inducción de estas quimiocinas regula la migración de monocitos y neutrófilos, respectivamente; células que están involucradas en el ataque a los trofozoítos de *E. histolytica*. Sin embargo, los trofozoítos

de *E. histolytica*, que cuentan con varias estrategias de evasión de la respuesta inmunitaria, secretan proteasas de cisteína que contribuyen a la modulación de la respuesta inmunitaria humoral y con el daño al tejido del hospedero. Estas proteasas son capaces, según nuestros resultados, de generar formas truncadas de CCL2 y CCL13 no funcionales que inhiben la migración de monocitos. Adicionalmente, la digestión de CCL2 puede también alterar la diferenciación de los linfocitos T_H induciendo la polarización de la respuesta a un tipo T_{H2} . Esta observación coincide con los reportes que señalan la infiltración de eosinófilos en los focos inflamatorios durante la amibiasis. Las proteasas de cisteína también hacen proteólisis de CXCL8, pero la forma truncada de esta molécula tiene potenciada su actividad induciendo la migración de neutrófilos al foco inflamatorio. Por otro lado, los neutrófilos junto a las proteasas de cisteína pueden provocar la invasión de los trofozoítos de *E. histolytica*.

Conclusiones

Nuestra hipótesis de que la proteasa de cisteína 2 de *E. histolytica* estaba involucrada en la alteración de las funciones quimioatrayentes de las quimiocinas de la subfamilia CC y CXC quedó demostrada al encontrar que la EhCP2 actúa sobre las quimiocinas CCL2 y CCL13 generando péptidos que tienen actividad antagonista e inhiben la migración de los monocitos humanos. EhCP2 también actúa sobre CXCL8₁₋₇₇ potenciando la actividad de esta quimiocina, lo cual se tradujo en una mayor actividad migratoria. La proteólisis de las quimiocinas CC y CXC, generó moléculas truncadas que ejercieron un efecto antagonista sobre los receptores de las quimiocinas CC, y produjo una molécula agonista de los receptores CXC, a partir de CXCL8₍₁₋₇₇₎. Finalmente, La proteasa de cisteína-2 de *E. histolytica* podría estar implicada en la modulación de la respuesta proinflamatoria del hospedero y esta estrategia representa un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria.

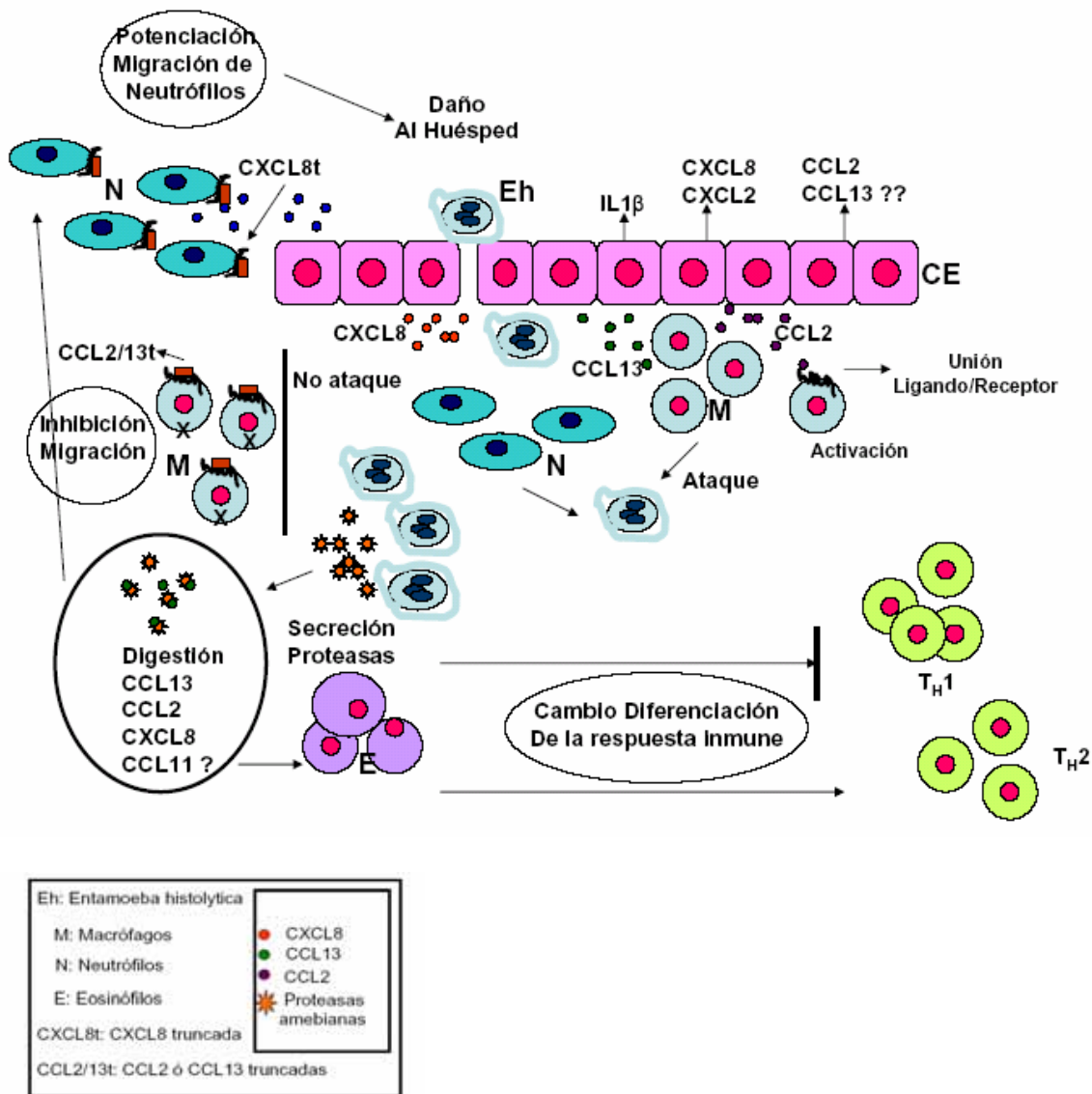


Figura 13: Modelo de evasión de la respuesta inmunitaria celular de *Entamoeba histolytica*.

Entamoeba histolytica al unirse al epitelio intestinal dispara la secreción de las quimiocinas CXCL2, CXCL8, CCL2 y CCL13 que inducen el reclutamiento de células monocíticas y neutrófilos al sitio de infección. Como parte de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria, *E. histolytica* secreta proteasas de cisteína que generan formas truncadas CCL2, CXCL8, lo cual podría estar participando en la modulación de la respuesta inflamatoria al modificar el tráfico de los leucocitos que responden a estas quimiocinas.

Perspectivas.

Este trabajo abre una línea de investigación en la cual se demostró que la proteasa de cisteína-2 de *Entamoeba histolytica*, un factor de patogenidad, fue capaz de modificar las funciones quimioatrayentes de las quimiocinas importantes proteínas que actúan como moléculas reguladoras del reclutamiento de leucocitos, y que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, y en la homeóstasis del sistema inmunitario. Al hacer modificaciones de las funciones quimioatrayentes de las quimiocinas por medio de la EhCP2, *E. histolytica* puede modular la respuesta inflamatoria orquestada en su contra, con beneficios, tales como la supervivencia y la invasión del hospedero. Sin embargo, el proyecto debe aún responder algunas preguntas como:

1. Los péptidos no funcionales producto de la proteólisis de las quimiocinas CC interaccionan con los receptores CC, expresados sobre las células monocíticas?. Para determinar esta interrogante, los péptidos provenientes del corte de CCL2 y CCL13 deben separarse y purificarse por cromatografía HPLC. La interacción de estos péptidos CCRs, expresados en líneas celulares, se debe probar marcando la quimiocina y sus péptidos con fluorocromos que permitan su detección, de tal manera que se pueda definir si los péptidos interaccionan o no con los receptores. Además, probar si estos péptidos son capaces de inhibir la inflamación en un modelo murino de cojinete plantar es muy importante para proponer nuevos fármacos antiinflamatorios
2. Las proteasas son liberadas al contacto con las células monocíticas THP-1, neutrófilos u otras células con las que *E. histolytica* establece algún contacto?. Determinar la colocalización de las proteasas de cisteína con las células monocíticas en un modelo murino usando anticuerpos específicos dirigidos a la EhCP2, u otra proteasa de cisteína; sería importante conocerlo durante la amibiasis. Además, en un modelo murino podríamos buscar la colocalización con las quimiocinas CC y CXC, y las proteasas de cisteína para determinar el efecto de estas proteasas sobre estas moléculas, lo cual nos ayudaría a conocer cuales son las quimiocinas CC fundamentales en la respuesta inflamatoria durante esta infección.

3. Son otras proteasas de cisteína de *E. histolytica* capaces de producir efectos sobre la actividad quimioatrayente de las quimiocinas?. Para eso se podrían probar la EhCP1 y EhCP5, que están directamente asociadas con el daño al hospedero.
4. Pueden las proteasas de cisteína de *E. histolytica* interferir con la integridad de los receptores de quimiocinas?. Aquí es importante probar si las proteasas de cisteína incubadas con las células directamente provoca efectos sobre la actividad quimiotáctica de las quimiocinas.
5. Por último, sería interesante conocer si en el genoma de *E. histolytica* existen genes que codifiquen para proteínas que mimeticen quimiocinas humanas, como ha sido reportado para los virus. Lo cual nos acercaría a pensar que el mimetismo de las quimiocinas y citocinas podría ser una estrategia de escape al sistema inmunitario que ha evolucionado en varios de los reinos. Además, de arrojar resultados sobre los mecanismos de evolución del sistema inmunitario del hospedero y los patógenos.

Referencias

- Abd-Alla MD, Jackson TFGH, Soong GC, Mazanec M, and Ravdin JI.** Identification of the *Entamoeba histolytica* Galactose-Inhibitable Lectin Epitopes Recognized by Human Immunoglobulin A Antibodies following Cure of Amebic Liver Abscess. *Infect. Immun* 72: 3974-3980, 2004.
- Aliberti JC, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS.** beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 67:4819-4826, 1999.
- Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM, and Sher A.** Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 4: 485-490, 2003.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD.** Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Inc. New York and London. Third Edition. 1994.
- Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG.** Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5:943-52, 2004.
- Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D.** Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* 28:777-785, 1998.
- Ankri S, F Padilla-Vaca, Stolarsky T, Kooles L, Katz U, and Mirelman D.** Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol Microbiol* 33: 327-337, 1999.
- Asgharpour A, Gilchrist C, Baba D, Hamano S, and Houpt E.** Resistance to Intestinal *Entamoeba histolytica* Infection Is Conferred by Innate Immunity and Gr-1⁺ Cells. *Infect. Immun* 73:4522-4529, 2005.
- Aurand-Lions M, Jhonson-Leger C and Imhof BA.** The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat Immunol*. 3: 116-118, 2002.
- Baggiolini M, and Moser B.** Blocking chemokine receptors. *J. Exp. Med* 186: 1189-1191, 1997.
- Baggiolini M.** Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250: 91-104, 2001.
- Barrios-Ceballos MP, Martinez-Gallardo NA, Anaya-Velazquez F, Mirelman D, Padilla-Vaca F.** A novel protease from *Entamoeba histolytica* homologous to members of the family S28 of serine proteases. *Exp Parasitol* 110:270-275, 2005.
- Barrón-González MP, Villareal-Treviño L, Verduzco-Martínez JA, Mata-Cárdenas BD, and Morales Vallarta MR.** *Entamoeba invadens*: In Vitro axenic encystation with a serum substitute. *Exp Parasitol* 110:318-321, 2005.
- Bartosik-Psujek H, and Stelmasiak Z.** The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *Eur J Neurol* 12: 49-54, 2005.
- Becker I, Pérez-Montfort R, Perez-Torres A, Rondan-Zarate A, Montfort I, and Pérez-Tamayo R.** *Entamoeba histolytica*: localization of a 30-kDa cysteine proteinase using a monoclonal antibody. *Exp Parasitol* 82:171-81, 1996.
- Becker I, Pérez-Tamayo R, Montfort I, Alvizouri AM, and Pérez-Montfort R.** *Entamoeba histolytica*: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp Parasitol* 67:268-80, 1988.
- Becker LC. Yin and Yang of MCP-1. *Circ. Res* 96: 812-814, 2005.
- Berkhout TA, Sarau HM, Moores K, White JR, Elshourbagy N, Appelbaum E, Reape RJ, Brawner M, Makwana J, Foley JJ, Schmidt DB, Imburgia C, McNulty D, Matthews J, O'Donnell K, O'Shannessy D, Scott M, Groot PH, and MacPhee C.** Cloning, in vitro expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemoattractant protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B. *J Biol Chem* 272:16404-16413. 1997.
- Bernal R, Martínez LG, Zepeda B, Hernández G, and Baer GM.** Determination of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its clinical correlation in pediatric patients. *Arch Med Res* 31: S55-56, 2000.
- Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S, Majumdar S.** Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis.* 185:1704-1708, 2002.
- Blackburn CC, and ME Selkirk.** Inactivation of platelet-activating factor by a putative acetylhydrolase from the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* 75: 41-46. 1992.
- Blessmann J, Ali IK, PA Nu, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, Clark CG, and Tannich E.** Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol* 41: 4745-4750, 2003.
- Boomker JM, de Leij LF, The TH, and Harmsen MC.** Viral chemokine-modulatory proteins: tools and targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:91-103, 2005.
- Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, and Mitolo V.** Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med.* 2:125-129, 2002.
- Brenier-Pinchart MP, Pelloux H, Derouich-Guergour D, and Ambroise-Thomas P.** Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* 17: 292-296, 2001.

Brenier-Pinchart MP, Pelloux H, Simon J, Ricard J, Bosson L, and Ambroise-Thomas P. *Toxoplasma gondii* induces the secretion of monocyte chemotactic protein-1 in human fibroblasts, in vitro. *Mol. Cell. Biochem* 209: 79-87, 2000.

Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, and Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell* 2:501-9, 2003.

Bruhn H, and Leippe M. Novel putative saposin-like proteins of *Entamoeba histolytica* different from amoebapores. *Biochim Biophys Acta* 1514: 14-20, 2001.

Bruserud O, Rynningen A, Wergeland L, Glenjen NI, Gjertsen BT. Osteoblasts increase proliferation and release of pro-angiogenic interleukin 8 by native human acute myelogenous leukemia blasts. *Haematologica*. 89:391-402, 2004.

Burns K, Martinon F, and Tschopp J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Curr Opin Immunol* 15:26-30, 2003.

Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutiérrez G, and Ortiz-Ortiz L. Seroprevalence of amebiasis in México. *Am J Trop Med Hyg* 50: 412-419, 1994.

Campbell D, and Chadee K. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: Modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitol Today*, 13: 184-190, 1997.

Carranza-Rosales P, Said-Fernández S, Ruiz-Ordóñez J, Villarreal-Treviño L, Verduzco-Martínez J, Cruz-Vega DE, and Morales-Vallarta M. Sequential changes occurring on the surface of *Entamoeba invadens* during encystation observed by scanning electron microscopy. *Arch Med Res* 31: S200-1, 2000.

Chakravorty SJ, Howie AJ, Girdlestone J, Gentle D, Savage CO. Potential role for monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4) in monocyte/macrophage recruitment in acute renal inflammation. *J Pathol*. 194:239-246, 2001.

Cheng XJ, Tsukamoto H, Kaneda Y, Tachibana H. Identification of the 150-kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica* as a galactose- and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin. *Parasitol Res* 84: 632-639, 1998.

Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, and Kunkel SL. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J. Immunol* 157:4602-4608, 1996.

Chiu BC, and Chensue SW. Chemokine responses in schistosomal antigen-elicited granuloma formation. *Parasite Immunol* 24: 285-94, 2002.

Christopherson K, and Hromas R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* 19: 388-396, 2001.

Clark CG and Ximénez C. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in a highly endemic rural population. *Arch Med Res* 31 S34-35, 2000.

Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, and Sykes BD. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 57: 703-711, 1995.

Coelho AL, Hgoaboan CM and Kunkel ST. Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 2005. in press.

Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, and Strieter RM. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like. *J Immunol* 167:623-627, 2001.

Comenford I, and Nibbs RJB. Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors?. *Immunol Letters* 96:163-174, 2005.

Cooper PJ, Beck LA, Espinel I, Deyampert NM, Hartnell A, Jose PJ, Paredes W, Guderian RH, and Nutman TB. Eotaxin and RANTES expression by the dermal endothelium is associated with eosinophil infiltration after ivermectin treatment of onchocerciasis. *Clin Immunol* 95:51-61, 2000.

Coudrier E, Amblard F, Zimmer C, Roux P, Olivo-Marin JC, Rigotherier MC, Guillen N. Myosin II and the Gal-GalNAc lectin play a crucial role in tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 7:19-27, 2005.

Culley FJ, Brown A, Conroy D, Sabroe IM, Pritchard DI, and Williams TJ. Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo. *J Immunol* 165: 6447-6453, 2000.

Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, and Baggiolini M. The neutrophils-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and Leukotriene release by interleukin-3-primed basophils *J Exp Med* 170: 1787-1792, 1989.

Daig R, Rogler G, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Gross V, Schölmerich J, and Andus T. Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut* 46: 350-358, 2000.

D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, and Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J Immunol Methods* 273: 3-13, 2003.

De Gendt CM, De Clerck LS, Bridts CH, and Stevens WJ. The use of calcein acetomethylester (AM)-labelled polymorphonuclear cells in a polycarbonate filter chemotaxis assay. *Clin Chim Acta* 249: 189-195, 1996.

Del Río L, Butcher BA, Bennouna S, Hiény Sara, Sher A, and Denkers EY. *Toxoplasma gondii* Triggers Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent IL-12 and Chemokine Ligand 2 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) Responses Using Distinct Parasite Molecules and Host Receptors. *J Immunol*, 172:6954-6960, 2004.

Denis M, and Chadee K. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun* 57: 1750-1756, 1989.

DePaolo RW, Lathan R, Rollins BJ, and Karpus WJ. The Chemokine CCL2 Is Required for Control of Murine Gastric *Salmonella enterica* Infection. *Infect. Immun* 73: 6514-6522, 2005.

deSchoolmeester ML, Little MC, Rollins BJ, and Else KJ. Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection. *J Immunol* 170: 4693-4700, 2003.

Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* Nov 100:13561-13566, 2003.

Dodson JM, PW Lenkowski Jr, Eubanks AC, Jackson TF, Napodano J, Lyerly DM, Lockhart LA, Mann BJ, and Petri WA Jr. Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *J Infect Dis* 179: 460-466, 1999.

Dürr M, and Peschel A. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun* 70:6515-17, 2002.

Eckmann L, SL Reed, Smith JR, and Kagnoff MF. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 96: 1269-1279, 1995.

Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 48: 17-21. 2001.

Espinosa-Cantellano M, and Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13: 318-331, 2000.

Falcone FH, Loke P, Zang X, MacDonald AS, Maizels, RM, and Allen JE. A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection. *J Immunol* 167: 5348-5354, 2001.

Falcone FH, Rossi AG, Sharkey R, Brown AP, Pritchard DI, and Maizels RM. *Ascaris suum*-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway. *Infect Immun* 69: 4007-4018, 2001.

Fitzgerald R C, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, and Farthing MJG. Diversity in the esophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 50:451-459, 2002.

Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Goldman TL, Recker TJ, Miller MA, and Wilson ME. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 170: 2613-2620, 2003.

García G, Godot V, and Humbert M. New chemokine targets for asthma therapy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 5: 155-60, 2005.

García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martinez-Lopez MC, Arroyo R, Gonzalez-Robles A, and Orozco E. *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol* 33:556-68, 1999.

García-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, and Luster AD. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 157: 5613-5626, 1996.

García-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, and Luster AD. Human eotaxin is a specific chemottractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Med.* 2: 449-456, 1996.

Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, Montalvo G, Bruno A, Maserati R, Bisoffi Z, and Scaglia M. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 67: 123-127, 2002.

Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Schweickart VL, Trong HL, and Gray PW. Monocyte chemotactic protein-4: tissue-specific expression and signaling through CC chemokine receptor-2. *J Leukoc Biol* 61: 353-360, 1997.

Gong JH, and Clark-Lewis I. Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues. *J Exp Med* 181: 631-640, 1995.

Grancis RK, and Entwistle GM. Production of an interferon-gamma homologue by an intestinal nematode: functionally significant or interesting artefact?. *Parasitology* 115: S101-106, 1997.

Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, and Doe WF. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol* 59: 804-812, 1996.

Gu L, Rutledge B, Fiorillo J, Ernst C, Grewal I, Flavell R, Gladue R, and Rollins B. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 62:577-580, 1997.

Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, Giedlin MA, Mullenbach G, and Tekamp-Olson P. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol* 155:1428-1433, 1995.

Haque R, Mondal D, Kirkpatrick BD, Akther S, Farr BM, Sack RB, and Petri WA Jr. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 69:398-405, 2003.

Haringman JJ, Ludikhuizen J, and Tak PP. Chemokines in joint disease: the key to inflammation?. *Ann. Rheum. Dis* 63:1186–1194, 2004.

Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, and McKerrow JH. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 58:17-24, 1993.

Hebert CA, Lusinskas FW, Kiely JM, Luis EA, Darbonne WC, Bennett GL, Liu CC, Obin MS, Gimbrone MA Jr, and JB Baker. Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J. Immunol* 145:3033-3040, 1990.

Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Luger N, Domschke W, Binion DG. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 278:8508-8515, 2003.

Hellberg A, Nickel R, Lotter H, Tannich E, and Bruchhaus I. Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbos. *Cell Microbiol* 3:13-20, 2001.

Hellberg A, Nowak N, Leippe M, Tannich E, and Bruchhaus I. Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Purif* 24: 131-137, 2002.

Holmes, WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, and Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253: 1278-1280, 1991

Huffnagle GB, Strieter RM, Standiford TJ, McDonald RA, Burdick MD, Kunkel SL, and Toews GB. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary Cryptococcus neoformans infection. *J Immunol* 155:4790-4797, 1995.

Huston CD, Haque R, and Petri WA Jr. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Expert Rev Mol Med* 1999: 1-11, 1999.

Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amoebic colitis. *TRENDS Parasitol* 20: 23-26, 2004.

Imhof BA, and Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol.* 4: 432-444, 2004.

Jacobs T, Bruchhaus I, Dandekar T, Tannich E, and Leippe M. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* 27:269-76, 1998.

Kalayci O, Sonna LA, Woodruff PG, Camargo Jr CA, Luster AD, and Lilly CM. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma. *J Asthma*; 41: 27-33, 2004.

Kelsall BL, and Ravdin JI. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 168:1319-22, 1993.

Klemba M, and Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 71: 275-305, 2002.

Klok AM, Luyendijk L, Zaal MJW, Rothova A, Hack CE, and Kijlstra A. Elevated serum IL-8 levels are associated with disease activity in idiopathic intermediate uveitis. *Br J Ophthalmol* 82:871-874, 1998.

Kretschmer RR, Rico G, and Giménez JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 112: 201-209, 2001.

Krupa A, Kato H, Matthay MA., and Kurdowska AK. Proinflammatory activity of anti-IL-8 autoantibody:IL-8 complexes in alveolar edema fluid from patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:1105-1113, 2004.

Kunkel EJ, and Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nature Reviews Immunol.* 3:822-829, 2003.

Lacroix-Lamande S, Mancassola R, Naciri M, and Laurent F. Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 70: 2090-2099, 2002.

Lalani AS, Barret JW, and McFadden G. Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunol Today* 21:100-106, 2000.

Lamkhioued B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S, Nakamura H, Jedrzkiewicz S, Wagner L, Renzi P, Allakhverdi M, Lilly C, Hamid Q, and Luster AD. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 723-732, 2000.

Laskay T, van Zandbergen G, and Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 11: 210-214, 2003.

Laurent F, Eckmann L, Savidge TC, Morgan G, Theodos C, Naciri M, and Kagnoff MF. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect Immun* 65: 5067-5073, 1997.

Lauwaet T, Oliveira MJ, Callewaert B, De Bruyne G, Saelens X, Ankri S, Vandenabeele P, Mirelman D, Mareel M, and Leroy A. Proteolysis of enteric cell villin by *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases. *J Biol Chem* 278:22650-22656, 2003.

Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today* 13: 178-183, 1997.

Leippe M, Bruhn H, Hecht O, and Grotzinger J. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amebopore A. *TRENDS Parasitol.* 21: 5- 7, 2004.

León G, Fiori C, Das P, Moreno M, Tovar R, Sánchez-Salas JL, Muñoz ML. Electron probe analysis and biochemical characterization of electron-dense granules secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 85:233-42, 1997.

Leroy A, Lauwaet T, Oliveira M, De Bruyne G, Bracha R, Ankri S, Katz U, Mirelman D, and Mareel M. Disturbance of tight junctions by *Entamoeba histolytica*: resistant vertebrate cell types and incompetent trophozoites. *Arch Med Res* 31: S218-220, 2000.

Li E, Yang WG, Zhang T, and Stanley SL Jr. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect Immun* 63: 4150-4153, 1995.

Li H, Chunsong H, Guobin C, Qiuping Z, Qun L, Xiaolian Z, Baojun H, Linjie Z, Junyan L, Mingshen J, and Jinqun T. Highly up-regulated CXCR3 expression on eosinophils in mice infected with *Schistosoma japonicum*. *Immunology* 111: 107-117, 2004.

Li QJ, Yao M, Wong W, Parpura V, Martins-Green M. The N- and C-terminal peptides of hIL8/CXCL8 are ligands for hCXCR1 and hCXCR2. *FASEB J.* 18:776-778, 2004.

Lin SN, Ayada K, Zhao Y, Yokota K, Takenaka R, Okada H, Kan R, Hayashi S, Mizuno M, Hirai Y, Fujinami Y, and Oguma K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces production of the pro-inflammatory cytokine IL8 in monocytic cells. *J Med Microbiol* 54:225-233, 2005.

Liston A, and McColl S. Subversion of the chemokine world by microbial pathogens. *Bioessays* 25: 478-488, 2003.

Liu C, Ueno T, Kuse S, Saito F, Nitta T, Piali L, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Hollander GA, Takahama Y. The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* 105:31-9, 2005.

Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, and Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391: 344-345, 1998.

Loetscher P, and Clark-Lewis. Agonist and antagonist activities of chemokine. *J Leukoc Biol* 69:881-884, 2001.

Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 129-135, 2002.

Maizels RM, Gomez-Escobar N, Gregory WF, Murray J, and Zang X. Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol* 31: 889-898, 2001.

Mannheimer SB, Hariprashad J, Stoeckle MY, Murray HW. Induction of macrophage antiprotozoal activity by monocyte chemoattractant and activating factor. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14:59-61, 1996.

Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, and Oppenheim JJ. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1485-1490, 1988.

McCarthy JS, Peacock D, Trown K, Bade P, Petri WA Jr, and Currie BJ. Endemic invasive amoebiasis in northern Australia. *Med J Aust* 177: 570, 2002.

McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, and Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase a cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289: 1202-1206, 2000.

McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, and Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100: 1160-1167, 2002.

Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, and Scharfstein J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 52:175-84, 1992.

Menozzi F, Pethe K, Bifani P, Soncin F, Brennan M, and Loch C. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol* 43: 1379-1386, 2002.

Meyer-Hoffert U, Lezcano-Meza D, Bartels J, Montes-Vizuet AR, Schroder JM, and Teran LM. Th2- and to a lesser extent Th1-type cytokines upregulate the production of both CXC (IL-8 and gro-alpha) and CC (RANTES, eotaxin, eotaxin-2, MCP-3 and MCP-4) chemokines in human airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 131: 264-271, 2003.

Middleton J, AM Patterson, Gardner L, Schmutz C, and Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100: 3853-3860, 2002.

Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, and Schröder JM. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J. Immunol* 160: 60, 1998.

Molinari JL, Mejia H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P. *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol* 94:133-42, 2000.

Moncada D, Keller K, and Chadee K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect Immun* 71: 838-844, 2003.

Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Polverini PJ, and Strieter RM. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. *Angiogenesis* 2:123-134, 1998.

Morohashi, H, Miyawaki T, Nomura H, Kuno K, Murakami S, Matsushima K, and Mukaida N. Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells. *J Leukoc Biol* 57: 180-187, 1995.

Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25:75-84, 2004.

Mukaida, N, Harada A, Yasumoto K, and Matsushima K. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8), and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol Immunol* 36: 773-789, 1992.

Mukaida N., Harada A, and Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cyt Growth Fact Rev* 9: 9-23, 1998.

Mukaida, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 72: 391-398, 2000.

Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L566-577, 2003.

Murdoch C, and Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95: 3032-3043, 2000.

Murphy, PM, and Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253: 1280-1283, 1991

Nakagawa, H, Hatakeyama S, Ikesue A, and Miyai H. Generation of interleukin-8 by plasmin from AVLPR-interleukin-8, the human fibroblast-derived neutrophil chemotactic factor. *FEBS Lett* 282: 412-414, 1991.

Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, García-Zepeda EA, Yamaguchi K, Lilly CM. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L1288-302, 2001.

Nattakom S, Serrato P, Bright T, Anaya A, Stubbers S, and Verghese A. Amebic liver abscesses masquerading as pyemic abscesses. *Clin Infect Dis* 33:E145-147, 2001.

Navarro-García F, Chavez-Duenas L, Tsutsumi V, Posadas del Río F, and López-Revilla R. *Entamoeba histolytica*: increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. *Exp Parasitol* 80:361-72, 1995.

Navarro-García F, López-Revilla R, Vega-López MA, Dominguez-Robles MC, Enriquez-Rincon F, and Tsutsumi V. Intragastric immunization of rats with *Entamoeba histolytica* trophozoites induces cecal mucosal IgE, eosinophilic infiltration, and type I hypersensitivity. *Clin Immunol Immunopathol* 82:221-229, 1997.

Needham M, Sturgess N, Cerillo G, Green I, Warburton H, Wilson R, Martin L, Barratt D, Anderson M, Reilly C, and Hollis M. Monocyte chemoattractant protein-1: receptor interactions and calcium signaling mechanisms. *J Leukoc Biol* 60: 793-803, 1996.

Nickel R, Ott C, Dandekar T, Leippe M. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *Eur J Biochem* 265:1002-1007, 1999.

Nickel R, Stern R, and Leippe M. Evidence That Hyaluronidase Is Not Involved in Tissue Invasion of the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 68: 3053-3055, 2000.

Ocadiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas LI, Ortega-Lopez J, Garcia-Perez RM, Sanchez T, Castillo-Juarez BA, Garcia-Rivera G, Rodriguez MA. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence.

Ohashi K, Sano E, Nakata T, and Naruto M. Possible identity of IL8 converting enzyme in human fibroblasts as a cysteine protease. *Int Immunopharmacol* 3:609-614, 2003.

Ohl L, Bernhardt G, Pabst O and Forster R. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Semin Immunol.* 15:249-55, 2003.

Olivos-García A, González-Canto A, López-Vancell R, García de León MdelC, Tello E, Nequiz-Avendano M, Montfort I, and Pérez-Tamayo R. Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters. *Parasitol Res* 90: 212-220, 2003.

O'Neill SM, Mills KH, and Dalton, JP. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses Bordetella pertussis-specific interferon-gamma production in vivo. *Parasite Immunol* 23: 541-547, 2001.

Padilla-Vaca F, Ankri S, Bracha R, Koole LA, and Mirelman D. Down regulation of *Entamoeba histolytica* virulence by monoxenic cultivation with Escherichia coli O55 is related to a decrease in expression of the light (35-kilodalton) subunit of the Gal/GalNAc lectin. *Infect Immun* 67: 2096-2102, 1999.

Padrines, M, Wolf M, Walz A, and Baggiolini M. Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett* 352: 231-235, 1994.

Paoletti S, Petkovic V, Sebastiani S, Danelon G, Uguccioni M, and Geber B. A rich chemokine environment strongly leukocyte migration and activities. *Blood* 105: 3405-3412, 2005.

Pastrana DV, Raghavan N, FitzGerald P, Eisinger SW, Metz C, Bucala R, Schleimer RP, Bickel C, and Scott AL. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun* 66: 5955-5963, 1998.

Pérez-Montfort R, Engelmayer J, Ostoa-Saloma P, Gutiérrez-Kobeh L, Cabrerra N, and Becker I. Proteolytic activity in extracts of *Entamoeba invadens* and *E. histolytica*: A comparative study. *Acta Protozoologica* 33:213-218, 1994.

Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velazquez-Medina L, Montfort I, Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 26:87-97, 1987.

Petering H, Höchstetter R, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, and Elsner J. Cutting Edge: Detection of mCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. *J. Immunol* 160: 555,1998.

Petri WA Jr, Haque R, Lyerly D, and Vines RR. Revisiting amebiasis. *Trends Parasitol* 17: 65, 2001.

Petri WA Jr. Pathogenesis of amebiasis. *Curr Opin Microbiol* 5: 443-447, 2002.

Pivarcsi A, and Homey B. Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease.. *Curr Allergy Asthma Rep* 5: 284-290, 2005.

Proost P, Wuys A, and Van Damme J. Human monocyte chemotactic proteins-2 and-3 and functional comparison with MCP-1. *J Leukol Biol*, 1996.

Phillip R J, Lutz Marin and Premack B. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokinereceptor-2 during monocyte maturation, *J Inflammation*, 2:1-14, 2005.

Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* 2:0726-0729, 2004.

Que X, and Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 13: 196-206, 2000.

Que X, Brinen LS, Perkins P, Herdman S, Hirata K, Torian BE, Rubin H, McKerrow J H, and Reed SL Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 119: 23-32, 2002.

Que X, Kim SH, Sajid M, Eckmann L, Dinarello C, McKerrow JH, and Reed SL. A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18. *Infect Immun* 71: 1274-1280, 2003.

Ramiro M, Moran P, Olvera H, Curiel O, Gonzalez E, Ramos F, Melendro EI, and Ximenez C. Reincidence of amebic liver abscess: a case report. *Arch Med Res* 31: S1-3, 2000.

Ramos F, Moran P, Gonzalez E, Garcia G, Ramiro M, Gomez A, de Leon Mdel C, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. *Exp Parasitol* 110:327-30, 2005.

Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García De León MDC, Melendro EI, Valadez A, and Ximénez Cecilia. High prevalence rate of *Entamoeba Histolytica* asymptomatic infection in a rural mexican community. *Am J Trop Med Hyg* 73: 87-91, 2005.

Ramos F, Valdez E, Moran P, Gonzalez E, Padilla G, Gómez A, Ramiro M, Melendro EI, Muñoz O, Reckless J, and Grainger DJ. Identification of oligopeptide sequences which inhibit migration induced by a wide range of chemokines. *Biochem J* 340: 803-811,1999.

Randolph GJ, Angeli V, and Swartz MA. Dendritic-Cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Rev Immunol* 5: 617-628, 2005.

Reckless J, Grainger DJ. Identification of oligopeptide sequences which inhibit migration induced by a wide range of chemokines. *Biochem J* 340:803-811. 1999.

Reed SL, Ember JA, Herdman DS, DiScipio RG, Hugli TE, and Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol* 155: 266-2674, 1995.

Riahi Y, and Ankri S. Involvement of serine proteinases during encystation of *Entamoeba invadens*. *Arch Med Res* 31: S187-189, 2000.

Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* 201:1761-1769, 2005.

Rockett KA, Playfair JH, Ashall F, Targett GA, Angliker H, and Shaw E. Inhibition of intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by proteinase inhibitors. *FEBS Lett* 259:257-259,1990.

Rodríguez-Sosa M, LE Rosas, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, and Terrazas LI. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 71: 1247-1254, 2003.

Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 90: 909-928, 1997.

Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, and Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 25: 201-219, 2004.

Rosenkilde MM, Schwartz TW. The chemokine system -a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* 112:481-495, 2004.

Rossi D and Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18: 217-242, 2000.

Rot A, and von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22:891-928, 2004.

Rot A. In situ binding assay for studying chemokine interactions with endothelial cells. *J Immunol Methods* 273: 63-71, 2003.

Roy S, Kabir M, Mondal D, Karim I, Ali M., Petri Jr WA., and Haque R. Real-Time-PCR Assay for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. *J. Clin. Microbiol* 43: 2168-2172, 2005.

Rubio de Krömer MT, Krömer M, Lüersen K, and Brattig NW. Detection of a chemotactic factor for neutrophils in extracts of female *Onchocerca volvulus*. *Acta Trop* 71: 45-56, 1998.

Ruiz de Gopegui E, Serra T, Leyes M, Delibes C, Salva F, and Pérez JL. Amoebic liver abscess: observations in seven patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22:526-528, 2004.

Ryu JS, Kang JH, Jung SY, Shin MH, Kim JM, Park H, and Min DY. Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 72: 1326-1332, 2004.

Sajid M, and McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 120:1-21, 2002.

Sallusto F, Lanzavecchia A, and Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19: 568-574, 1998.

Sallusto F, Mackay CR, and Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18: 593-620, 2000.

Sánchez-Guillen CM, Velazquez-Rojas M, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Pérez-Fuentes R, Martínez-Munguía J, and Talamas-Rohana P. Seroprevalence of anti-*Entamoeba histolytica* antibodies by IHA and ELISA assays in blood donors from Puebla, México. *Arch Med Res* 31: S53-4, 2000.

Savage SA, Abnet CC, Mark SD, Qiao YL, Dong ZW, Dawsey SM, Taylor PR, and Chanock. SJ. Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:2251-2257, 2004.

Schägger H, and Jagow G. Tricine-Sodium Dodecyl-Polyacrilamide gel electrophoresis for the separation in the range from 1 to 100 KDa. *Anal Biochem* 166: 368-379, 1987.

Schroder JM. The monocyte-derived neutrophils activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophils araquidonate-5-lipoxygenase, but not release of cellular araquidonate. *J Exp Med* 170: 847-863, 1989.

Segeer S., Nelson PJ, and Schlöndorff D. Chemokines, Chemokine Receptors, and Renal Disease: From Basic Science To Pathophysiologic and Therapeutic Studies. *J. Am. Soc. Nephrol*; 11:152-176, 2000.

Seguin R, Mann BJ, Keller K, and Chadee K. Identification of the galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor-alpha production by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12175-12179, 1995.

Serrano-Luna JJ, Negrete E, Reyes M, de la Garza M. *Entamoeba histolytica* HM1: IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp Parasitol* 89:71-77, 1998.

Serveau C, Lalmanach G, Juliano M, Scharfstein A, Juliano JL, and Gauthier F. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. *Biochem J* 313: 951-956, 1996.

Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJB, and. Murphy TF. Airway Inflammation and Etiology of Acute Exacerbations of Chronic Bronchitis. *Chest* 118:1557-1565, 2000.

Seydel KB, Li E, Swanson PE, and Stanley SL Jr. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun* 65: 1631-1639, 1997.

Shaio MF, Lin PR, Liu JY, and Yang KD. Generation of Interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. *Infect Immun* 63:3864-3870, 1995.

Sheikine Y and Hansson GK. Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med* 36: 98-118, 2004.

Shin MH, and Lee SY. Proteolytic activity of cysteine protease in excretory-secretory product of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae pivotally regulates IL-8 production of human eosinophils. *Parasite Immunol* 22: 529-533, 2000.

Sim S, Al Kim K, Yong TS, Park SJ, and Im KI. Ultrastructural observación of human neutrophils during apoptotic cell death triggered by *Entamoeba histolytica*. *Korean J Parasitol* 42:205-208, 2004.

Somanna A, Mundodi V, and Gedamu L. Funtional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor β . *J Biol Chem* 277: 25305-25312, 2002.

Sparkman L, and Boggaram V. Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: 764-773, 2004.

Spinella S, Levavasseur E, Petek F, Rigotherier MC. Purification and biochemical characterization of a novel cysteine protease of *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem.* 266:170-80, 1999.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multisept paradigm. *Cell* 76: 301-314, 1994.

Stanley SL Jr, Zhang T, Rubin D, Li E. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* 63:1587-1590, 1995.

Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 361: 1025-1034, 2003.

Stein JV and Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* 116:1-12, 2005.

Stellato C, Collins P, Ponath PD, Soler D, Newman W, La Rosa G, Li H, White J, Schwiebert LM., Bickel, Liu CM, Bochner BS., Williams T, and Schleimer RP. Production of the novel c-c chemokine mCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other c-c chemokines. *J. Clin. Invest* 99: 926, 1997.

Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005.

Struyf S, Van Collie E, Paemen L, Put W, Lenaerts JP, Proost P, Opendakker G, and Van Damme J. Synergistic induction of MCP-1 and -2 by IL-1 β and interferons in fibroblasts and epithelial cells. *J Leukoc Biol* 63: 364-372, 1998.

Suzuki H, Prado GN, Wilkinson N, and Navarro J. The N terminus of interleukin-8 (IL-8) receptor confers high affinity binding to human IL-8. *J. Biol. Chem* 269:18263-18266, 1994.

Talamas-Rohana P, Schlie-Guzmán MA, Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL. T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect Immun* 63:3953-3958, 1995.

Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol* 85:1801-1813, 2004.

Tan TH, Edgerton SA, Kumari R, McAlister MS, Roe SM, Nagl S, Pearl LH, Selkirk ME, Bianco AE, Totty NF, Engwerda C, Gray CA, Meyer DJ, and Rowe SM. Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Biochem J* 357: 373-383, 2001.

Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun.* 70:6524-6533, 2002.

Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, and Reed SL. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *J Infect Dis* 177: 508-511, 1998.

Traynor TR, Herring AC, Dorf ME, Kuziel WA, Toews Galen B, and Huffnagle GB. Differential Roles of CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemotactic Protein-1 and CCR2 in the Development of T1 Immunity. *J Immunol* 168: 4659-4666, 2002.

Trettel F, Di Bartolomeo S, Lauro C, Catalano M, Ciotti MT, Limatola C. Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J Biol Chem.* 278:40980-40988, 2003.

Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, and Kodama M. Lipopolysaccharide: Neutrolization by polymixina B shuts down the signaling pathway of nuclear factor κ B peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J Surg Res*, 100:127-134, 2001.

Uehara S, Grinberg A, Farber JM, and Love PE. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* 168:2811-9, 2002.

Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 200:493-505, 2004.

Van Buul JD, and Hordijk PL. Signaling in leukocyte tranendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 24: 824-833, 2004.

Van Coillie E, van Damme J, and Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:61-86, 1999.

Van Damme J, Decock B, Conings R, Lenaerts JP, Opdenakker G, Billiau A. The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin 8. *Eur J Immunol.* 19:1189-1194, 1989.

Van Damme J, Rampart M, Conings R, Decock B, Van Osselaer N, Willems J, Billiau A. The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH2-terminally processed forms. *Eur J Immunol* 20:2113-2118, 1990.

Van Damme J, Rampart M, Conings R, Decock B, Van Osselaer N, Willems J, Billiau A. The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH2-terminally processed forms. *Eur J Immunol* 20:2113-2118, 1990.

van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, and Laskay T. Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun* 70: 4177-4184, 2002.

Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Kappes JC, Lima MF. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun* 66:4690-4695, 1998.

von Adrian UH. Immunological adhesion and homing molecules. *Encyclopedia of Life Sciences.* 2001.

Votta BJ, White JR, Dodds RA, James IE, Connor JR, Lee-Rykaczewski E, Eichman CF, Kumar S, Lark MW, and Gowen M. CKbeta-8 [CCL23], a novel CC chemokine, is chemotactic for human osteoclast precursors and is expressed in bone tissues. *J Cell Physiol* 183: 196-207, 2000.

Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, McKerrow JH. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of Giardia. *Cell* 89:437-44, 1997.

WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. México City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull* 18:13-14, 1997.

Wong MM, and Fish EN. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 15: 5-14, 2003.

Woodworth BA, Joseph K, Kaplan AP, and Schlosser RJ. Alterations in eotaxin, monocyte chemoattractant protein-4, interleukin-5, and interleukin-13 after systemic steroid treatment for nasal polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131: 585-589, 2004.

Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Nakada T, Takahashi Y. Molecular expression and characterization of a homologue of host cytokine macrophage migration inhibitory factor from *Trichinella* spp. *J Parasitol* 89:507-15, 2003.

Yamamoto H, Nagata M, and Sakamoto Y. CC chemokines and transmigration of eosinophils in the presence of vascular cell adhesion molecule 1. *Ann Allergy Asthma Immunol* 94: 292-300, 2005.

Yamashiro S, Kamohara H, and Yoshimura T. MCP-1 is selectively expressed in the late phase by cytokine-stimulated human neutrophils: TNF-alpha plays a role in maximal MCP-1 mRNA expression. *J Leukoc Biol* 65:671-679, 1999.

Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74:448-455, 2003.

Yoshimura T, Robinson EA, Appella E, Matsushima K, Showalter SD, Skeel A, Leonard EJ. Three forms of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) distinguished by different lengths of the amino-terminal sequence. *Mol Immunol* 26:87-93, 1989.

Yu Y, and Chadee K. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology* 112: 1536-1547, 1997.

Zang X, Taylor P, Wang JM, Meyer DJ, Scott AL, Walkinshaw MD, Maizels RM. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity and crystal structure. *J Biol Chem* 277: 44261-44267, 2002.

Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, and Stanley, Jr SL. Expression of Amoebapores Is Required for Full Expression of *Entamoeba histolytica* Virulence in Amebic Liver Abscess but Is Not Necessary for the Induction of Inflammation or Tissue Damage in Amebic Colitis. *Infect. Immun* 72: 678-683, 2004.

Zhang ZL, Wang L, Seydel KB, Li E, Ankri S, Mirelman D, and Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 37: 542-548, 2000.

Zlotnik A, and Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127, 2000.

Anexos

Artículo de investigación. Pertuz Belloso S, Ostoa Saloma P, Benítez I, Soldevilla G, Olivos A, and García-Zepeda E. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol* 26:237-241, 2004.

Artículo de Revisión. Pertuz-Belloso SB, Flores-Romo L. Mini-revisión: Papel de la respuesta inmunitaria celular en la resolución de la amibiasis. *Bioquímica*. 29: 91-98, 2004.

Enlaces en internet

www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/A-F/Amebiasis/body_Amebiasis_page1.html.

<http://martin.parasitology.m.mcgill.ca/jimspage/biol/Ameoba.html>

<http://us.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl>

<http://delphi.phys.univ-tours.fr/protysis/cutter.html>

Entamoeba histolytica cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines

S. PERTUZ BELLOSO,¹ P. OSTOA SALOMA,¹ I. BENITEZ,¹ G. SOLDEVILA,¹ A. OLIVOS² & E. GARCÍA-ZEPEDA¹

¹Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, ²Department of Experimental Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México

SUMMARY

Human amoebiasis is a disease produced by infection with the protozoan *Entamoeba histolytica* currently affecting many millions of people worldwide. Amoebic colitis is the most common clinical manifestation. Host protective immunity involves participation of both humoral and cellular responses. However, the mechanisms involved in immune evasion are not clear and remain under investigation. One of these mechanisms could be associated with the ability of parasite proteases to modulate or interfere with the inflammation process, which is initiated by expression of pro-inflammatory cytokines such as chemokines. To further clarify the potential role of cysteine proteases in modulating chemokine-mediated functions, we have analysed the ability of *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) to have an effect on the chemotaxis of leucocytes by chemokine cleavage. We find that EhCP2 is capable of cleaving chemokines CCL2, CCL13 and CXCL8, and the resulting proteolysis products modulate the chemotaxis of leucocytes when compared to that induced by intact chemokine. Thus, the extracellular activity of the cysteine proteases affects chemokine-mediated responses and could be considered as part of the mechanisms used by *Entamoeba histolytica* to circumvent the host immune responses.

Keywords amoebiasis, chemokines, cysteine proteases, cytokine, leucocytes

INTRODUCTION

Human amoebiasis is caused by the protozoan *Entamoeba histolytica* and affects up to 50 million people worldwide. More than 50 000 people die every year of amoebiasis, making it one of the leading causes of death from protozoan diseases. *Entamoeba histolytica* infection has two main clinical manifestations, intestinal or amoebic colitis and extra-intestinal amoebic liver abscess. Amoebic colitis is initiated by trophozoite invasion of intestinal mucosa, accompanied by an inflammatory process associated with host tissue destruction. This mucosal invasion is followed by disruption of the epithelial barrier as a result of degradation of the extracellular matrix by parasite proteases that allow the parasites to gain access to the liver via portal circulation, establishing an infection that causes liver abscess. As a result, an inflammatory response is induced, accompanied by the expression of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α , COX-2 and nitric oxide synthase, as well as chemokines (1,2). Chemokines have been recognized as important regulators not only as chemoattractants but also in homeostasis, development, leucocyte activation, and in host defence (3). These cytokines may have an important role either in the recruitment of protective effector cells or in the exacerbation of the inflammatory process.

Evidence exists showing that cysteine proteases derived from *E. histolytica* are important in the regulation of inflammation and pathology observed in experimental amoebiasis. Cysteine proteases can cleave extracellular matrix proteins like collagen, elastin, fibrinogen and colonic mucin, and may also interfere with the immune response by degrading anaphilotoxins C3a and C5a, as well as IgG, and IgA (4). The proteolytic activity seen *in vitro* and in experimental animal models has clearly been associated with cysteine proteases EhCP1, 2 and 5, which are the most abundant, although differentially expressed between *Entamoeba* isolates (5). EhCP2 has been recently reported to contribute to intestinal damage and to a lesser extent to liver abscess formation (6,7).

Correspondence: E. García-Zepeda, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CU 04510, México, D.F., México (e-mail: garciaze@servidor.unam.mx).

Accepted for publication: 29 July 2004

Few data have emerged regarding the action of pathogen-derived proteases on cytokine activities. Recently, the effect of *E. histolytica* proteases on the biological activities of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 was analysed. It was found that pro-IL-1 β was cleaved by EhCPs and converted into mature IL-1 β , which retained its biological activity. In contrast, when the effect of EhCP5 protease on IL-18 was analysed, the cleavage of pro-IL-18 generated smaller fragments with reduced biological functions (8). In addition, the proteolytic effect of a *Necator americanus* metalloprotease on a CC chemokine was analysed. It was found that this metalloprotease reduced the biological activities of CCL11 but not of CXCL8 chemokines (9), suggesting a certain specificity in the recognition of the cleavage motif in their NH₂-terminus.

METHODS, RESULTS AND DISCUSSION

To further clarify the potential role of *E. histolytica* EhCP2 in regulating chemokine-mediated leucocyte recruitment, we initially focused our analysis on CCL2, 13 and CXCL8 chemokines. CCL2 activates monocytes and lymphocytes expressing the CCR2 chemokine receptor. It has also been involved in the development of inflammatory diseases and may have an important role in Th1–Th2 polarization (10). CCL13 has broad chemotactic activities acting on chemokine receptors CCR1, 2 and 3 expressed in monocytes, lymphocytes and eosinophils. Furthermore, CCL13 has been implicated in the development of inflammatory diseases such as asthma, atherosclerosis and renal disease (11). CXCL8 activates granulocytes and monocytes expressing CXCR1 and 2 receptors. Some CCL chemokines are basally expressed in the intestine, whereas others are induced in certain intestinal pathologies after cytokine stimulation (12). Recently, analysis of a murine model of human amoebiasis, showed a differential chemokine gene expression in the infected gut compared to other intestinal pathogens (13). Altogether, these findings suggest a potential role of chemokines as regulators of inflammation during amoebic infection in the gut.

First, we determined the proteolytic activity on CCL chemokines by SDS-PAGE and Western blotting analysis. EhCP2 was obtained from axenically cultivated *E. histolytica* isolate HM-1:IMSS and purified using molecular filtration as described (7). CCL13 (100 ng) was incubated with pre-activated EhCP2 (5 μ M) at different time points and the mixture was then subjected to electrophoretic analysis (Figure 1a). Proteins of lower molecular weight (3–6 kDa) than that of CCL13 (9 kDa) were detected in the SDS-PAGE gels as early as 15 min and up to 180 min incubation. Figure 1(b) (left panel) shows the electrophoretic analysis of CCL13 incubated for 15 min with EhCP2 (5 μ M) (lane 2), compared with undigested CCL13 (lane 1) or with EhCP2 inhibited with protease inhibitor E64 (lane 3). In parallel (Figure 1b,

right panel), the same samples were analysed by immunoblotting analysis using a polyclonal anti-CCL13 antibody. Low molecular weight proteins (< 9 kDa) were identified (lane 5) and compared with undigested CCL13 and protease inhibition controls (lanes 4 and 6, respectively).

To evaluate the functional responses induced after proteolytic cleavage of CCL13, we performed chemotaxis assays of calcein-AM labelled THP-1 monocytic cells using modified Boyden chambers, as previously described (11). We determined the effect of varying EhCP2 concentrations (0.5–5.0 μ M) on the chemotaxis assay using CCL13 at the concentration that gives the maximum response (100 ng/mL). As shown, there was a proportional decrease in the migration of THP-1 cells exposed to proteolysed CCL13, compared to intact CCL13 (100 ng/mL) (Figure 1c). Next, we determined the effect of the incubation time of CCL13 (100 ng/mL) with EhCP2 (5 μ M) (Figure 1d). It was determined that after as little as 5 min (data not shown) and up to 180 min incubation there was a decrease in the migration of THP-1 cells in response to digested CCL13. The decrease in chemotaxis was greater than 50% when compared to that observed with intact CCL13. To evaluate the specificity of this effect, EhCP2 (5 μ M) was preincubated with specific inhibitor E64 (20 nM) for 30 min, and then the mixture was subjected to chemotaxis, as before. This treatment induced a 90% recovery of the chemotaxis compared to that observed with intact CCL13. In addition, the effect of EhCP2 on fMLP (10⁻⁶ M), a chemotactic factor for leucocytes, was tested. Our results showed that there was no effect on the chemotaxis mediated by fMLP on mononuclear cells, suggesting that EhCP2 acts on specific amino acid sequences that are not present on fMLP (data not shown). To investigate whether the proteolytic effect was specific for this chemokine or if it may also affect other CCL chemokine members, we tested EhCP2 protease activity on CCL2. In Figure 1(f) is shown the result of the chemotaxis assay using CCL2 (100 ng/mL) after incubation with EhCP2 (5 μ M). There was a reduction of chemotaxis (about 50%), which again was almost recovered after inhibition of EhCP2 with E64.

The proteolytic effect of EhCP2 on CXCL8 by SDS PAGE electrophoresis analysis and chemotaxis assays was also evaluated. We analysed two forms of the chemokine CXCL8: the mature form CXCL8 (1–72 aa), and a variant form of CXCL8 (1–77 aa) that has an additional 5 aa residues in the N-terminal sequence and is less active. CXCL8 (1–77) (500 ng) was incubated with EhCP2 (5 μ M) at different time points. This mixture was then subjected to SDS-PAGE and analysed by silver staining. In Figure 2(a) is shown the effect of digestion of CXCL8 (1–77) with EhCP2 after 15 min incubation (lane 2) compared to undigested CXCL8 (lane 1). Low molecular weight proteins were detected, ranging from 3 to 6 kDa. Figure 2(b) shows the analysis by immunoblotting

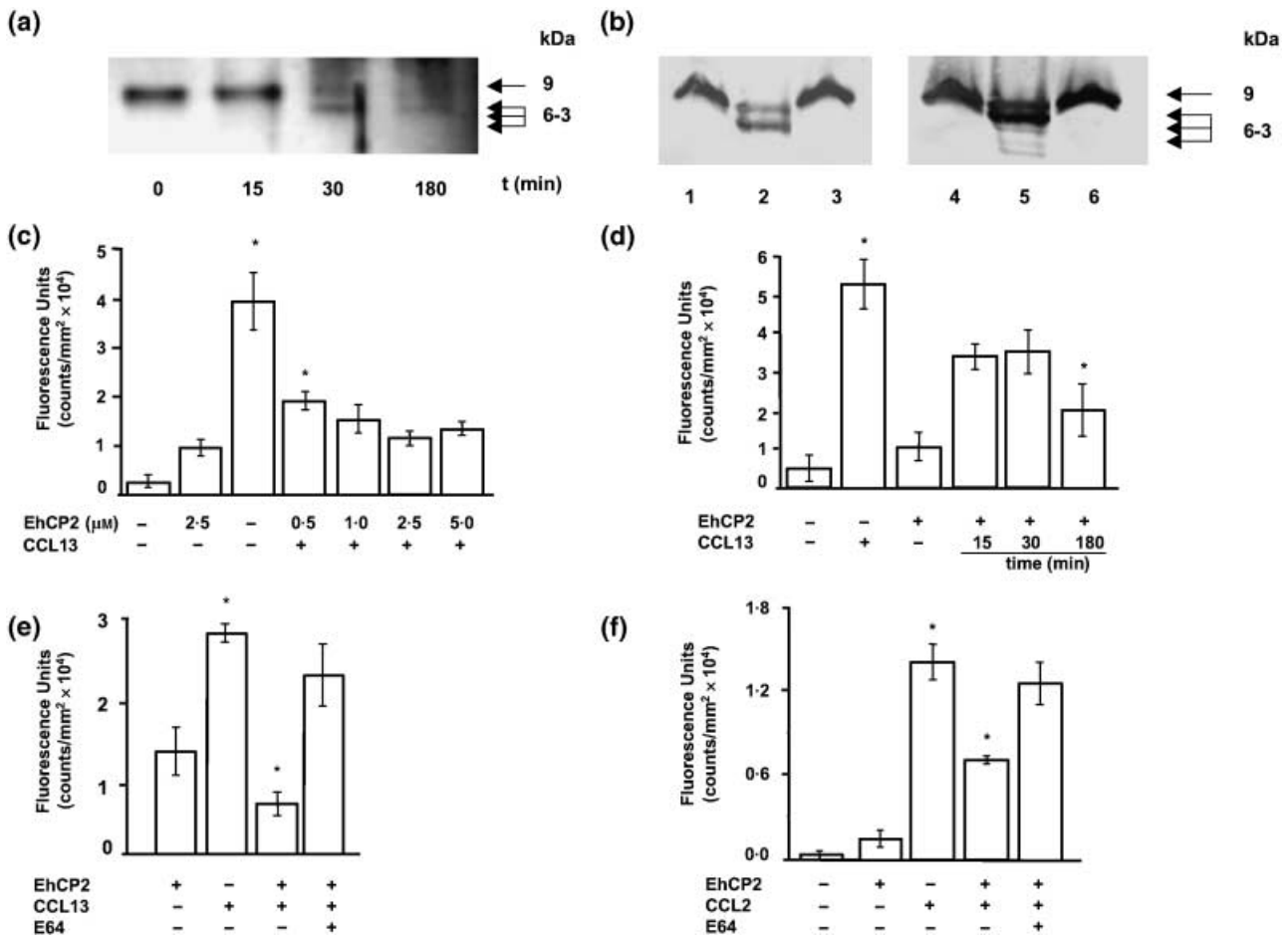


Figure 1 Analysis of the EhCP2 proteolytic activity on CC chemokines. (a) Analysis by SDS-PAGE. CCL13 (500 ng/mL) was incubated with 5 μM EhCP2 at 37°C at different time points: 0, 15, 30 and 180 min incubation. (b) Proteolysed chemokine products were separated by SDS-PAGE (lanes 1–3) and analysed by Western blotting (lanes 4–6) using an anti-CCL13 polyclonal antibody. Lanes 1 and 4: CCL13; lanes 2 and 5: CCL13 plus 5 μM EhCP2 (15 min incubation); lanes 3 and 6: CCL13 plus EhCP2 plus 10 mM protease inhibitor. (c) Analysis of the proteolytic effect of EhCP2 on CCL13-mediated chemotaxis of THP-1 monocytic cells. CCL13 (100 ng/mL) was incubated with different concentrations of EhCP2 (0.5–5 μM) and subjected to chemotaxis assays. Number of migrating cells is represented as counts of fluorescence per mm² (CNT/mm²). (d) Effect of incubation time. CCL13 (100 ng/mL) was incubated with EhCP2 (5 μM) for 0, 15, 30 and 180 min at 37°C, subjected to chemotaxis assays and analysed as above. (e) EhCP2 (5 μM) was preincubated with protease inhibitor E64 (20 nM) and analysed as in (c). (f) Effect of EhCP2 on CCL2-mediated chemotaxis. CCL2 (100 ng/mL) was incubated with EhCP2 (5 μM) for 60 min at 37°C and subjected to chemotaxis assays. As a control, EhCP2 was incubated with protease inhibitor E64 (20 nM). The data represent the mean of triplicate wells of a representative experiment (out of a total of three) ± standard error (statistical analysis was performed using one-way ANOVA test, asterisks indicate *P* < 0.01).

of the CXCL8 digested products at different time points (0, 5, 15, 60 min) separated by SDS-PAGE, blotted and probed with a polyclonal anti-CXCL8 antibody. In lanes 4–6, a number of low molecular weight proteins (3–6 kDa) were detected as compared with undigested CXCL8 (lane 3). Polyclonal antibody anti-CXCL8 did not cross-react with EhCP2 (data not shown). When we tested the effect of EhCP2 (5 μM) on CXCL8 (1–72)-mediated chemotaxis on granulocytes, there was a reduction (< 75%) compared with intact CXCL8 (Figure 2c). As before, chemotaxis was recovered by inhibiting EhCP2 activity with E64 (20 nM). In contrast,

EhCP2 had an additive effect on CXCL8 (1–77) mediated chemotaxis, showing an increase (< 100%) in the chemotaxis of granulocytes after digestion of CXCL8 with EhCP2, when compared with undigested CXCL8 (Figure 2d).

Proteolytic cleavage by EhCP2 leads to reduced amounts of biologically active chemokines, which could be considered as one of the regulatory mechanisms used by the pathogen to decrease leucocyte recruitment and probably activation. This is supported by our data, which show that cleavage of CCL2, CCL13 and CXCL8 leads to impaired chemotactic responses. Potential EhCP2 substrates must have at least an

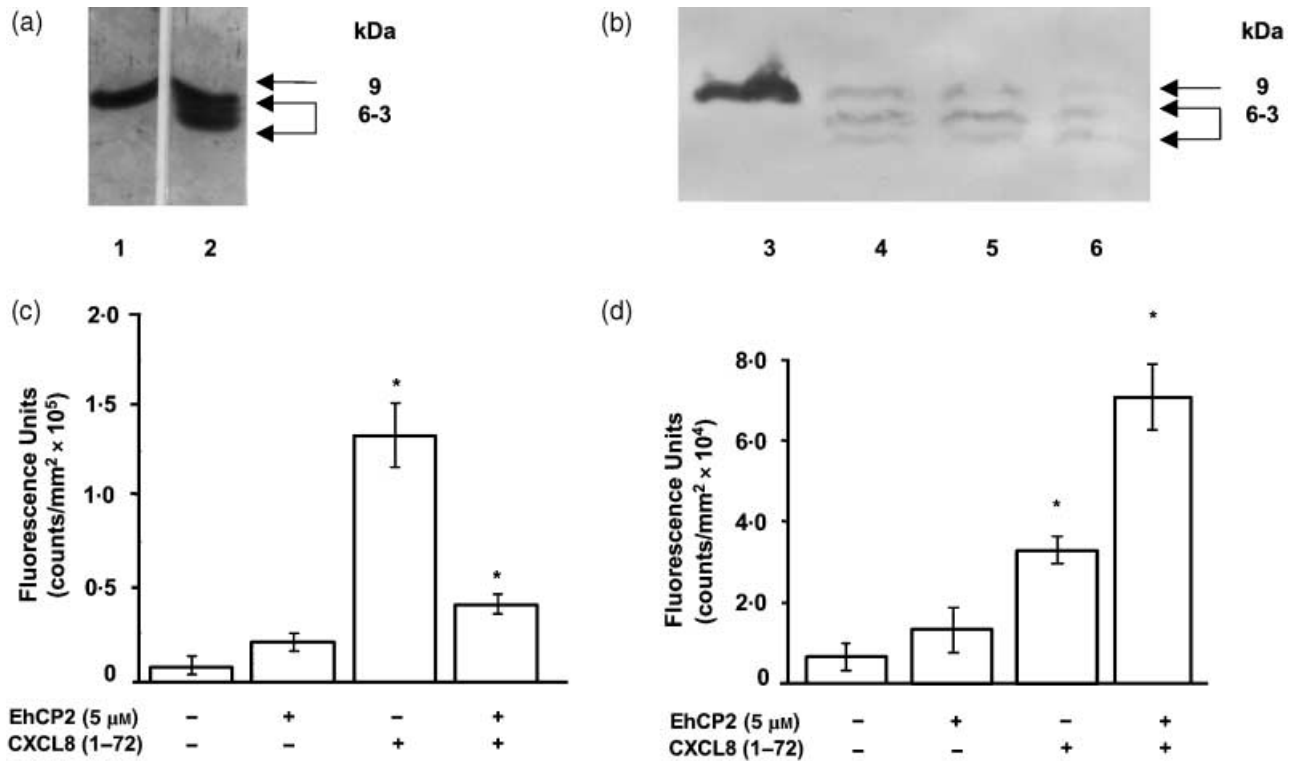


Figure 2 Analysis of EhCP2 proteolytic cleavage on CXCL8. (a) Analysis by SDS-PAGE: lane 1, CXCL8 (500 ng); lane 2, EhCP2 (5 μM) plus CXCL8. (b) Analysis by Western blotting (lanes 3–6) using an anti-CXCL8 polyclonal antibody. Lane 3: CXCL8; lane 4: CXCL8 plus EhCP2, 5 min incubation; lane 5, 15 min and lane 6, 60 min. (c) Analysis of the proteolytic effect of EhCP2 on CXCL8 (1–72) mediated chemotaxis. CXCL8 (100 ng/mL) was incubated with EhCP2 for 60 min and subjected to chemotaxis assays using granulocytic cells. As a control, EhCP2 was incubated with protease inhibitor E64 (20 nM). (d) Analysis of CXCL8 (1–77) mediated chemotaxis as above. Number of migrating cells is represented as counts of fluorescence per mm² (CNT/mm²).

accessible arginine residue at P₁. All chemokines tested in this report have several potential cleavage sites (e.g. CXCL8 has an Arg⁶). Furthermore, it has been widely demonstrated that the Glu⁴-Leu⁵-Arg⁶ (ELR) motif in CXCL-8 is important in maintaining its biological functions. Therefore, truncated forms of CXCL-8, which are missing this motif, have reduced activities such as chemotaxis and receptor binding. Interestingly, cleavage of CXCL8 (1–77) resulted in an increased chemotactic response. This is in agreement with previous reports showing that CXCL8 requires processing to enhance its biological responses. MMPs like gelatinase B, could be in part responsible for this processing *in vivo* (13). In this context, truncated forms of CXCL8 (1–77) could be more active in recruiting cells and may favour the pro-inflammatory microenvironment necessary for *E. histolytica* mediated intestinal damage.

It has been suggested that *E. histolytica* cysteine proteases make an important contribution to gut inflammation, since they are released in great amounts during epithelial invasion, leading to pro-inflammatory cytokine and other damage mediators. Although there is still some controversy on

whether EhCP2 participates directly in the development of liver tissue damage, its overall contribution remains to be clarified. Our results suggest that EhCP2 and other cysteine proteases (currently under investigation) may have an important role in regulating the development of inflammation through proteolytic cleavage of chemokines. This proteolytic activity could interfere with leucocyte recruitment by altering specific chemokine gradients, or by the generation of chemokine receptor antagonists. Therefore, this effect should be considered as part of the complex anti-inflammatory mechanisms displayed by *E. histolytica* during mucosal invasion and liver abscess formation. Moreover, detailed analysis of chemokine cleavage by parasite proteases should be also taken into consideration when searching for novel anti-inflammatory therapeutics.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge technical support of Marcela Ramirez. SP is a recipient of a DGEP-UNAM PhD scholarship. This work is supported in part by a CONACYT grant 33365-N (EGZ).

REFERENCES

- 1 Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 2003; **361** (9362): 1025–1034.
- 2 Stanley SL. Pathophysiology of amoebiasis. *Trends Parasitol* 2001; **17**: 280–285.
- 3 Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; **338**: 436–445.
- 4 Klemba M & Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 275–305.
- 5 Bruchhaus I *et al.* The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 501–509.
- 6 Hellberg A *et al.* Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction *in vitro* but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol* 2001; **3**: 13–20.
- 7 Olivos-Garcia A *et al.* Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters. *Parasitol Res* 2003; **90**: 212–220.
- 8 Que X *et al.* A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18. *Infect Immun* 2003; **71**: 1274–1280.
- 9 Culley FJ *et al.* Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2000; **165**: 6447–6453.
- 10 Gu L *et al.* Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000; **404** (6776): 407–411.
- 11 Garcia-Zepeda EA *et al.* Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 1996; **157**: 5613–5626.
- 12 Futagami S *et al.* Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) released from *Helicobacter pylori* stimulated gastric epithelial cells induces cyclooxygenase 2 expression and activation in T cells. *Gut* 2003; **52**: 1257–1264.
- 13 Van den Steen PE *et al.* Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000; **96**: 2673–2681.

Mini-revisión: Papel de la respuesta inmune celular en la resolución de la amibiasis

Silvana B. Pertuz-Belloso,* Leopoldo Flores-Romo**

RESUMEN

La respuesta inmune desarrollada durante la infección por *Entamoeba histolytica* no ha sido completamente determinada. La inmunidad mediada por células se ha asociado a la resolución de la amibiasis, principalmente por neutrófilos y macrófagos. La generación de mediadores de oxígeno por macrófagos es uno de los principales mecanismos de ataque contra este parásito. Otras células del sistema inmune, tales como los eosinófilos se han relacionado con la limitación de la infección. La generación de citocinas y quimiocinas por parte de macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células epiteliales no sólo dirige la migración de las células que están encargadas de destruir al parásito, sino que también orquesta la respuesta inmune que llevará a la efectiva resolución de la infección. Hasta el momento, no está clara la respuesta inmune que efectivamente ataca a este parásito y que contribuye a resolver la amibiasis, esto es debido en parte a la variabilidad de los modelos usados, por lo que el objetivo de esta revisión es concluir cuál es el papel de la respuesta inmune celular desarrollada durante la amibiasis que contribuye a controlar la infección.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, inmunidad, citocinas, factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (INF), interleucina-1 (IL-1), amibiasis.

ABSTRACT

The immune response effective against *Entamoeba histolytica* has not been completely described. Cell-mediated immunity has been linked to resistance to amebiasis. Neutrophils and macrophages are the cells involved in the destruction of *Entamoeba histolytica*. Generation of oxygen mediators by macrophages has been documented as a destruction mechanism for *Entamoeba histolytica*. Other cells from the immune system, such as eosinophils, have also been linked to the resistance of infection. Generation of cytokines and chemokines by macrophages, neutrophils, lymphocytes and epithelial cells not only guide the migration of cells charged with destroying the parasite, but also arrange for the immune response that will lead to an effective resolution of infection. In this sense, we cannot conclude about the cellular immunity against this parasite because the results are subject to the variability of the models used. The objective of this review is to conclude which is the cellular immunity response that contributes to solve the infection by *Entamoeba histolytica*.

Key words: *Entamoeba histolytica*, neutrophils, macrophages, eosinophils, immunity, cytokines, tumor necrosis factor (TNF), interferon (INF), interleukine-1 (IL-1), amebiasis.

Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

* Candidato a Doctor del Programa de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Campus-CU.

** Dr. Titular 3B. Departamento de Patología Experimental. CINVESTAV.

Correspondencia:

M. en C. Silvana B. Pertuz-Belloso. Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Interior, Ciudad Universitaria. Apartado Postal: 04510, e-mail: spertuz@hotmail.com.

Recibido: 15-04-2004

Aceptado: 06-08-2004

Lista de abreviaturas

SCID: ratones con inmunodeficiencia severa combinada; SCID-HU-INT: ratones con inmunodeficiencia severa combinada con trasplante de intestino humano; INF- γ : interferón gamma; TNF: factor de necrosis tumoral; MLIF: factor de inhibición de la locomoción de monocitos; T_H2: linfocitos T cooperadores del sub-tipo 2; T_H1: linfocitos T cooperadores del sub-tipo 1; IL-4: interleucina-4; IL-13: interleucina-13; IL-10: interleucina-10; IL-5: interleucina-5; IL-12: interleucina-12; IL-1 β : interleucina-1 β ; IL-2: interleucina-2; CXCL-8: IL-8, quimiocina de 8 de la familia CXC; CXCL-1: GRO α , quimiocina 1 de la familia CXC; iNOS: sintetasa inducible de óxido nítrico; NO₂: óxido nítrico.

INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una infección causada por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) y representa un problema de salud pública en todo el mundo. Existen entre 40 a 50 millones de individuos infectados y cerca de 100,000 personas afectadas por este parásito mueren por año.^{1,2} En países del tercer mundo la seroprevalencia de *E. histolytica* es alta, por ejemplo, en Sudáfrica alcanza el 10%, en áreas endémicas³ y en el norte de Ecuador, 23 de 32 sujetos en edad escolar presentaban altos títulos de anticuerpos contra *E. histolytica*.⁴ En México, la amibiasis tiene una prevalencia considerable tanto en ciudades como en zonas rurales; en la ciudad de Puebla se encontró que el 7% de los individuos con síntomas de desorden intestinal estaban infectados con *E. histolytica*;⁵ en zonas rurales, la prevalencia de este parásito es más alta, como se muestra en estudios realizados en el Estado de Morelos (19%) y Chiapas (51 %).^{6,7}

La amibiasis es frecuentemente una infección gastrointestinal, pero manifestaciones extra-intestinales pueden ocurrir.¹ Así, una de las manifestaciones intestinales más frecuentes es la colitis amibiana, en la cual, el síntoma más común es la diarrea con sangre y moco. Aunque, poco frecuente, la manifestación extra-intestinal más agresiva es el absceso hepático que generalmente afecta a pacientes con amibiasis intestinal sin síntomas. Abscesos respiratorios o cerebrales ocurren en muy baja frecuencia como producto de complicaciones de los abscesos hepáticos.

Durante esta parasitosis se genera una respuesta inmune humoral y celular que limita la infección en individuos inmunocompetentes.^{5,8,9} Esta respuesta inmune orquestada durante la infección por *E. histolytica* ha sido estudiada por más de una década con la idea de producir vacunas que protejan efectivamente a la población expuesta en áreas endémicas.¹⁰⁻¹⁴ Todos estos estudios han originado un panorama de la respuesta inmune generada durante la amibiasis, en la cual los neutrófilos parecen ser importantes en la respuesta inicial ante este patógeno y en la resolución de la infección,¹⁵ aunque otros grupos celulares también se han relacionado con la efectiva resolución de la misma. Los macrófagos, por ejemplo, se han asociado con la destrucción directa de los trofozoítos de *E. histolytica* a través de mecanismos que incluyen la generación de intermediarios de oxígeno;¹⁶ junto con los neutrófilos, los macrófagos son considerados como parte de la principal respuesta inmune celular contra este parásito. No obstante, es difícil establecer cuáles son las células del sistema inmune que contribuyen a la resolución de la amibiasis debido a

la variabilidad de los modelos usados para responder esta pregunta, por lo que, el objetivo de esta revisión es concluir qué papel juega la respuesta inmune celular en la resolución de esta parasitosis.

NEUTRÓFILOS EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA *E. histolytica*

El papel de los neutrófilos en la resolución de la infección por *E. histolytica* fue descrito por Seydel y cols. (1997),¹⁷ quienes inoculando amebas directamente en el parénquima hepático de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) y bloqueando los neutrófilos con el anticuerpo RB6-8C5, encontraron que los abscesos hepáticos fueron mayores en los ratones SCID sin neutrófilos que con ellos, los ratones sin neutrófilos no tenían ni células inflamatorias ni grandes áreas necróticas, lo cual indicaba que los neutrófilos estaban participando en la respuesta celular contra *E. histolytica*. La importancia de los neutrófilos en la resistencia a la amibiasis fue también observada por Velázquez y cols. (1998)¹⁸ en abscesos hepáticos provocados en ratones BALB/c; el bloqueo de neutrófilos, usando el anticuerpo RB6-8C5 mostró también que la lesión hepática es mayor en ratones sin neutrófilos, los ratones normales presentaron inflamación del parénquima hepático, mientras que la inflamación fue muy escasa en los ratones sin neutrófilos.

En la amibiasis intestinal provocada en ratones C3H/HeJ inoculados con *E. histolytica* se demostró también la presencia de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria contra este parásito, pero no fue definido el papel directo de estas células en la destrucción del parásito.¹⁹ En un modelo murino que simula la colitis amibiana humana (SCID-HU-INT), en el cual fracciones del intestino humano son trasplantadas en el lomo de un ratón SCID, se observa el reclutamiento de neutrófilos durante la infección con trofozoítos de *E. histolytica*, relacionando directamente los neutrófilos con la inflamación intestinal al observar la reducción de la inflamación cuando se bloquearon los neutrófilos.^{20,21} No obstante, esta respuesta inflamatoria producida por los neutrófilos pudiera estar relacionada con el daño al epitelio intestinal favoreciendo la invasión del parásito a otros sitios. Un resultado contradictorio es proporcionado por Rivero-Nava y cols. (2002)²² en otro modelo de amibiasis intestinal en ratones BALB/c, en donde se encontró que los ratones sin neutrófilos presentaban lesiones y el parásito era eliminado, al igual que en los ratones, con neutrófilos; por lo que hace suponer que otras células están también participando en la resistencia de

E. histolytica, creando una controversia en cuanto a la participación de los neutrófilos en la resolución de la amibiasis.

Por otro lado, se ha propuesto que los neutrófilos activados son capaces de actuar eficientemente contra *E. histolytica*. La participación del interferón gamma (INF- γ) en la activación de los neutrófilos fue dada en un modelo de ratones sin receptor para esta molécula (SCID-C.B-17); estos ratones presentaban mayores abscesos hepáticos que los ratones normales.²³ Los neutrófilos activados son capaces de eliminar trofozoítos de *Entamoeba histolytica* a través de mecanismos como la producción de óxido nítrico (NO₂) y otros intermediarios de oxígeno; en un modelo murino, en el cual el gen para la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS) no se expresa, los abscesos hepáticos eran de mayor tamaño que los observados en los ratones normales. Adicionalmente, ratones infectados con *E. histolytica* expresan altos niveles de la iNOS que aquellos no infectados,²⁴ demostrando así, el papel que juegan el NO₂ y otros mediadores de oxígeno en la defensa inmune contra este parásito.

En resumen se puede decir que los neutrófilos juegan un papel muy importante en la resistencia a la amibiasis debido a que hay suficientes argumentos que apuntan a la interacción de estas células directamente con *E. histolytica* contribuyendo en buena parte a la resolución de la infección. Sin embargo, se ha señalado también que estas células están asociadas al daño observado en las lesiones amibianas y posiblemente contribuyan a la dispersión del parásito a capas más profundas del tejido intestinal.¹

MACRÓFAGOS EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA *E. histolytica*

Se ha señalado la importancia que tienen los macrófagos como células que eliminan directamente a *E. histolytica*. *In vitro* se encontró que monocitos aislados de sangre periférica humana activados con antígenos amibianos eran capaces de eliminar más del 40% de los trofozoítos de *E. histolytica*;²⁵ sin embargo, *in vivo* en un modelo de amibiasis invasiva murina, se encontró que los macrófagos formaban parte del infiltrado inflamatorio pero no contribuían de manera directa con la limitación de la infección.²⁶

No obstante, en la literatura se ha mencionado que los macrófagos son células que limitan esta parasitosis atacando a los trofozoítos de *E. histolytica* por medio de la producción de mediadores de oxígeno. La liberación de especies reactivas de oxígeno

(EROs) como mecanismo de destrucción de *E. histolytica* ha sido bien documentada²⁷⁻³⁰ y confirma la importancia que tienen estas células en la respuesta inmune contra este parásito. Así, Denis y Chadee (1988),³¹ encontraron en un modelo de amibiasis invasiva en gerbos (*Meriones unguiculatus*), que los macrófagos provenientes de estos animales no eran capaces de eliminar trofozoítos de *E. histolytica* debido a una falla en la generación de mediadores de oxígeno en comparación con los macrófagos que provenían de gerbos sin amibiasis. *In vitro* se encontró que monocitos de sangre periférica de individuos normales expuestos a los trofozoítos de *E. histolytica* eran capaces de aumentar la producción de EROs y de destruir los trofozoítos, mostrando con ello que los macrófagos son células efectoras importantes en la resistencia a la parasitosis.

Otro factor relacionado con la eliminación de los trofozoítos de *E. histolytica* por los macrófagos es la inducción de citocinas. La inducción de interleucinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), está asociada a la destrucción de los trofozoítos de *E. histolytica*. Wang y cols. (1992)³² encontraron que los macrófagos provenientes de abscesos hepáticos tenían disminuida la inducción de esta citocina y estos macrófagos eran incapaces de eliminar los trofozoítos del parásito.

En otros trabajos se demuestra la participación del factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- α) e INF- γ en la activación de los macrófagos. La activación de los macrófagos se traduce en un incremento de las EROs y en una mayor destrucción de los trofozoítos de *E. histolytica*; por ejemplo, cuando se bloquea el TNF- α con anticuerpos específicos hay una reducción en los valores de NO₂, impidiendo con ello la eliminación de trofozoítos por los macrófagos. Estas dos interleucinas potencian la expresión de la sintetasa inducible del óxido nítrico de los macrófagos y por lo tanto la producción de NO₂.^{33,34}

La importancia que tienen los macrófagos en la respuesta inmune contra *E. histolytica* ha sido evidenciada también por los mecanismos de adaptación que tiene este parásito para evadir la respuesta inmune. Un ejemplo lo constituye el factor de inhibición de la locomoción de monocitos (MLIF), un péptido antiinflamatorio que impide el reclutamiento de los macrófagos, así *E. histolytica* detiene el reclutamiento de los macrófagos al sitio de infección,³⁵ evitando con ello la acción destructiva de estas células que, como se ha venido mencionando, constituyen una de las principales células efectoras para la resistencia en la amibiasis.

En general se puede establecer que los macrófagos son células efectoras que contribuyen a la resistencia en la amibiasis, como quedó establecido en los diferentes modelos de estudio. No obstante, los macrófagos actúan también como células que desencadenan la respuesta inmune al generar o inducir citocinas que juegan un papel importante en la activación de otras células, tales como los linfocitos T cooperadores (CD4⁺), células que se encargan de orquestar la respuesta inmune adaptativa contra *E. histolytica*.

LINFOCITOS T EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA *E. histolytica*

La participación de los linfocitos T en la resolución de la amibiasis ha sido controversial, ya que *in vivo* en modelos murinos se señala que estas células directamente no limitan la infección; en cambio *in vitro*, los linfocitos provenientes de humanos con abscesos hepáticos son capaces de eliminar trofozoítos de *E. histolytica*.

Las poblaciones de linfocitos T pueden ser de dos tipos: las células T CD8⁺ y las células T CD4⁺. En la amibiasis, los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ se han relacionado con la destrucción de trofozoítos de *E. histolytica*; *in vitro*, linfocitos purificados y activados con fitohemaglutinina eran capaces de destruir trofozoítos de este parásito.³⁶ Similarmente, los linfocitos T CD4⁺, provenientes de pacientes con abscesos hepáticos amibianos fueron también capaces de eliminar trofozoítos;^{37,38} sin embargo, en modelos murinos de abscesos hepáticos los linfocitos T CD4⁺ no parecen ser importantes en la resistencia a la parasitosis, pero se encuentran formando parte de los infiltrados inflamatorios en las lesiones amibianas. En ratones C3H/HeJ inoculados intestinalmente con trofozoítos de *E. histolytica* se encontró que la población de células T CD4⁺ es alta durante la infección y está asociada a una respuesta de tipo 2 de células T cooperadoras (T_H2), en la cual se observa la presencia de eosinófilos y células cebadas, no obstante, estas células no atacan directamente al parásito. Posiblemente, este parásito inhiba la producción de citocinas del perfil T_H1, por los linfocitos T del subtipo CD4⁺, desviando la respuesta inmune hacia T_H2 caracterizada por el reclutamiento de eosinófilos que no parecen ser importantes en la destrucción del parásito. Estas observaciones quedan confirmadas en un modelo murino de colitis amibiana, en el cual, la liberación de las interleucinas 4 (IL-4) y 13 (IL-13) por los linfocitos T CD4⁺ induce la infiltración de células cebadas, aumentando la inflamación del colon; el efecto con-

trario fue visto cuando se eliminaron con anticuerpos las poblaciones de los linfocitos T CD4⁺.³⁹ En este mismo estudio se encontró que los ratones con los linfocitos T CD4⁺ bloqueados tienen menor carga parasitaria que los que tienen los linfocitos T CD4⁺, estos hallazgos pueden indicar que la respuesta T_H2 pueda ser beneficiosa para este parásito; una respuesta de tipo T_H2 fue también inducida ante la lectina-220 KDa de *E. histolytica*, caracterizada por la liberación de IL-4 e interleucina-10 (IL-10) por los linfocitos T CD4⁺.⁴⁰

En resumen los linfocitos T CD4⁺ juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune que conlleva a la destrucción de *E. histolytica*, los reportes señalan que *E. histolytica* dirige la respuesta inmune hacia un perfil T_H2 que no parece afectar este parásito, sino que favorece su invasión y sobrevivencia.

EOSINÓFILOS EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA *E. histolytica*

Los estudios que asocian a los eosinófilos con la destrucción de *E. histolytica* son más limitados y menos concluyentes. En investigaciones realizadas *in vitro* por López y cols. (1992),⁴¹ se muestra que los eosinófilos aislados de sangre periférica de donantes normales, activados con suero inmune contra proteínas amibianas, eliminaban efectivamente trofozoítos de *E. histolytica*. *In vivo*, se reporta que los gerbos (*Meriones unguiculatus*) con eosinofilia tenían abscesos hepáticos más pequeños que los que no la tenían, mostrando con ello que los eosinófilos juegan un papel importante en la eliminación de los trofozoítos de *E. histolytica*.⁴²

En la amibiasis intestinal murina, los eosinófilos forman parte del infiltrado inflamatorio observado durante la infección, pero no están asociados a la limitación de la infección;⁴³ por otro lado, estas células fueron observadas en la lámina propia de la cripta intestinal en ratas inoculadas intestinalmente con *E. histolytica*,⁴⁴ pero tampoco en este modelo de amibiasis intestinal se encontró relación entre los eosinófilos y la resolución de la infección. Así mismo, en estudios realizados *in vitro* muestran que los trofozoítos de *E. histolytica* son resistentes a la degranulación de los eosinófilos,⁴⁵ confirmando lo expresado anteriormente.

Con base en lo anterior se puede decir que los eosinófilos no parecen estar asociados con el ataque directo a los trofozoítos de *E. histolytica* ni tampoco a la resistencia de la amibiasis, al menos en modelos murinos intestinales; pero no hay que descartar que bajo condiciones de activación con antígenos de otros

parásitos, en una coinfección, los eosinófilos puedan limitar esta parasitosis.

EL EFECTO DE LAS CITOCINAS Y EL PAPEL DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *E. histolytica*

El papel de las citocinas es importante en la regulación de la respuesta inmune celular contra *E. histolytica*. Como ha sido mencionado ya, ciertas citocinas juegan un papel importante en la activación de los macrófagos, neutrófilos y linfocitos T. La producción de un determinado perfil de citocinas durante una respuesta parasitaria dirige la respuesta inmune, lo cual origina reclutamiento, activación y proliferación de células como macrófagos o neutrófilos, que en el caso de la amibiasis son las células efectoras contra este parásito.⁴⁵ El efecto de TNF- α e INF- γ en la activación de macrófagos y neutrófilos se traduce en la inducción de iNOS y por ende en la producción de mediadores de oxígeno que son parte del mecanismo de destrucción de *E. histolytica*.^{25,27-30} La inducción de IL-4, IL-10 e IL-13, también ha sido reportada y juegan un papel importante en el reclutamiento de tipos celulares como eosinófilos y células cebadas, aunque el papel directo de estas células en la resistencia a la amibiasis no ha sido bien establecido.^{19,40}

Según y cols. (1997),⁴⁶ usando macrófagos aislados de la médula ósea de ratones BALB/c activados con INF- γ e incubados con la adhesina N-acetil-galactosamina de *E. histolytica*, encontraron que había alta expresión de TNF α , con un consecuente aumento de NO₂ y un incremento en la destrucción del parásito.

En lesiones intestinales producidas por la inoculación de *E. histolytica* en ratones SCID-HU-INT, se encontró que la inducción de TNF- α es importante para la regulación de la inflamación al propiciar la generación de las interleucinas-1 β (IL-1 β) y de la quimiocina CXCL-8, ambas encargadas del reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, respectivamente.⁴⁷

Citocinas, tales como IL-2, IL-4 y TNF- α son producidas por linfocitos hepáticos y células esplénicas durante el curso de la infección en gerbos (*Meriones unguiculatus*) con abscesos hepáticos.⁴⁸ Este perfil de citocinas conduce a una respuesta de tipo T_H1 favoreciendo la activación de los macrófagos que llevarán a cabo la destrucción de *E. histolytica*. Pero también se ha reportado la inducción de las IL-4 e IL-10 durante la infección por *E. histolytica*, las cuales están asociadas con una respuesta T_H2, pudiendo ser el producto de una alteración de la respuesta T_H1, como un meca-

nismo de *E. histolytica* para evitar esta respuesta que es la que controla esta parasitosis.⁴⁰ Otra interleucina que induce una respuesta del tipo T_H1 es IL-12, describiéndose que los mensajeros de las subunidades 40 y 35 de esta interleucina fueron inducidos por macrófagos en respuesta a la adhesina lectina-N acetil-galactosamina de *E. histolytica*. Una inhibición de la expresión del mensajero de la subunidad IL-12 p40 fue observada cuando los macrófagos se incubaron con suero proveniente de pacientes con abscesos hepáticos amibianos, por lo que la inhibición de esta interleucina pudiera constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune al impedir la inducción y la activación de macrófagos.⁴⁹

Un gran productor de citocinas es el epitelio intestinal con el que interacciona *E. histolytica* a través de la adhesina N-acetil-galactosamina.⁵⁰ En el modelo SCID-HU-INT se estableció que hay expresión de ARN mensajero de IL-1 β , IL-6 y las quimiocinas CXCL-1 y CXCL-8 por las células epiteliales intestinales durante la infección por trofozoítos de este parásito.^{51,52} En líneas celulares epiteliales, también se encontró la acumulación del mensajero del CXCL-8 al contacto con proteínas de *E. histolytica*.⁵³ La inducción de CXCL-8 y de otras quimiocinas por las células epiteliales es de gran importancia en la regulación del reclutamiento celular, como fue observado con CXCL-8 que genera la migración de neutrófilos que están involucrados en la resistencia a *E. histolytica*.⁵⁴

CONCLUSIONES

La respuesta inmune celular contra *E. histolytica* generada por el huésped depende básicamente de la participación de los macrófagos y neutrófilos, estas células a través de mecanismos de liberación de mediadores de oxígeno son capaces de eliminar los trofozoítos de *E. histolytica* y evitar la invasión amibiana (Figura 1).

La participación de los linfocitos T CD4⁺ es menos clara, pero sin duda son una pieza clave en la polarización de la respuesta inmune durante la infección. Esta labor la llevan a cabo los linfocitos mediante la inducción de citocinas que contribuyen al reclutamiento de células que juegan un papel importante en la destrucción de los trofozoítos de este parásito (Figura 1).

Cabe señalar que varios tipos celulares importantes en el modelo intestinal de amibiasis no parecen tener importancia en un modelo hepático de la misma.

Muy importante en todo este escenario es la inducción de quimiocinas y citocinas por las células epite-

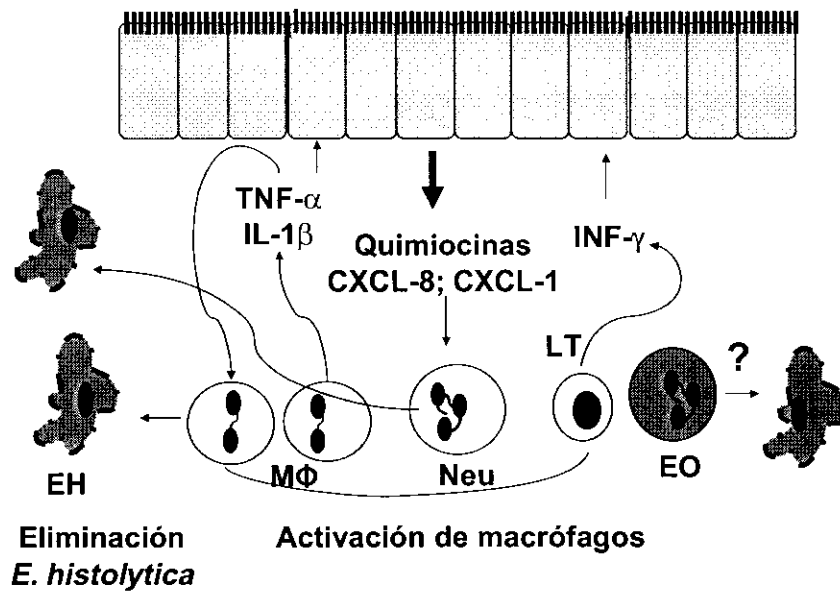


Figura 1. Respuesta celular inmune inducida por *Entamoeba histolytica*. La interacción de *E. histolytica* con el epitelio intestinal origina la producción de citocinas y quimiocinas, como IL-1 β y CXCL-8, estas citocinas y quimiocinas regulan el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos al sitio de infección; ambos tipos celulares involucrados en la destrucción de *E. histolytica*; a su vez, la producción de TNF- α no sólo activa a los macrófagos sino que influye sobre la activación de las células epiteliales. Los linfocitos T modulan la respuesta inmune al generar un perfil de citocinas que inducen la activación de los macrófagos y neutrófilos. Adicionalmente, la producción de INF- γ por los linfocitos T está relacionada con la activación de células epiteliales. Por último, los eosinófilos se señalan como posibles células que también participan en la destrucción de este parásito.

M ϕ : macrófagos, Neu: neutrófilos, EO: eosinófilos, LT: linfocitos T, EH: trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

liales, con las cuales entran en contacto los patógenos y las células del sistema inmune.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGE) de la Universidad Nacional Autónoma de México por el financiamiento otorgado para realizar esta investigación documental y a los árbitros de la Revista Bioquímica por las observaciones realizadas para mejorar esta revisión.

REFERENCIAS

1. Stanley Jr S. Amoebiasis. *Lancet* 2003; 361: 1025-1034.
2. Petri WA, Haque R, Lyerly D, Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitology Today* 2000; 16: 320-321.
3. Jackson T, Reddy S, Fincham J, Abd-Alla M, Welles S, Ravdin J. A comparison of cross-sectional and longitudinal seroepidemiological assessments of *Entamoeba*-infected population in South Africa. *Arch Med Res* 2000; 31(Suppl): S36-S37.
4. Gatti S, Swierczynski J, Cevini C, Bruno A, Anselmi M, Bisoffi Z, et al. Incidence of amebic infection in a village of Northern Ecuador. *Arch Med Res* 2000; 31(Suppl): S38-S40.
5. Sánchez-Guillén MC, Pérez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, Ruiz-Argüelles A, et al. Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 731-737.
6. Ramos F, Valdez E, Morán P, González E, Padilla G, Gómez A, Ramiro M, et al. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in a highly endemic rural population. *Arch Med Res* 2000; 31(Suppl): S34-S35.
7. Morales-Espinoza EM, Sánchez-Pérez HJ, García-Gil MM, Vargas-Morales G, Méndez-Sánchez JD, Pérez-Ramírez M. Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico. *Salud Publica Mex* 2003; 45: 379-388.
8. Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, et al. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4745-4750.
9. Abd-Alla M, Wahib A, Ravdin J. Comparison of antigen-capture ELISA to stool-culture methods for the detection of

- asymptomatic *Entamoeba* species infection in Kafer Daoud, Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 579-582.
10. Beving DE, Soong CJ, Ravdin JI. Oral immunization with a recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has *in vitro* adherence inhibition activity. *Infect Immun* 1996; 64: 1473-1476.
 11. Zhang T, Li E, Stanley SL. Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response. *Infect Immun* 1995; 63: 1349-1355.
 12. Zhang T, Stanley SL. Oral immunization with an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* expressing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein induces an antiamebic immune response and protects gerbils from amebic liver abscess. *Infect Immun* 1996; 64: 1526-1531.
 13. Huston CD, Petri WA. Host-pathogen interaction in amebiasis and progress in vaccine development. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 601-614.
 14. Houghton E, Barroso L, Lockhart L, Wright R, Cramer C, Lyerly D, et al. Prevention of intestinal amebiasis by vaccination with the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin. *Vaccine* 2004; 22: 612-618.
 15. Stanley S, Reed S. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1049-G1054.
 16. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 318-331.
 17. Seydel K, Zhang T, Stanley JR. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997; 65: 3951-3953.
 18. Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderon J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol* 1998; 20: 255-262.
 19. Ghosh P, Ventura J, Gupta S, Serrano J, Tsutsumi V, Ortiz-Ortiz L. Experimental amebiasis: Immunohistochemical study of immune cell populations. *J Eukaryot Microbiol* 2000; 47: 395-399.
 20. Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL Jr. Human intestinal epithelial cells produce pro-inflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun* 1997; 65: 1631-1639.
 21. Seydel KB, Li E, Zhang Z, Stanley SL Jr. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. *Gastroenterology* 1998; 115: 1446-1453.
 22. Rivero-Nava L, Aguirre-García J, Shibayama-Salas M, Hernández-Pando R, Tsutsumi V, Calderon J. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice. *J Exp Parasitol* 2002; 10: 183-192.
 23. Seydel K, Smith S, Stanley SL Jr. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in murine model of disease. *Infect Immun* 2000; 68: 400-402.
 24. Jarrillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp Parasitol* 2002; 101: 40-56.
 25. Salata R, Murray H, Rubin B, Ravdin J. The role of interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 72-78.
 26. Jarrillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. Participation of neutrophils, macrophages and endothelial cells in the amebic liver lesion in the mouse. *Arch Med Res* 2000; 31(Suppl): S101-S103.
 27. García MI, Rocha LM, Ramírez A, Santos JI. Macrophage colony-stimulating factor enhances the respiratory burst of human monocytes in response to *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 1992; 23: 139-140.
 28. Murray HW, Aley SB, Scott WA. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates. *Mol Biochem Parasitol* 1981; 3: 381-391.
 29. Ghadirian F, Somerfield SD, Kongshavn PAL. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants. *Infect Immun* 1986; 51: 263-267.
 30. Morán P, Rico G, Ramiro M, Olvera H, Ramos F, González E, et al. Defective production of reactive oxygen intermediates (ROI) in a patient with recurrent amebic liver abscess. *Am J Med Hyg* 2002; 67: 632-635.
 31. Denis M, Chadee K. *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun* 1988; 56: 3126-3131.
 32. Wang W, Keller K, Chadee K. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 3169-3174.
 33. Denis M, Chadee K. Cytokine activation of murine macrophages for *in vitro* killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun* 1989; 57: 1750-1756.
 34. Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun* 1994; 62: 1534-1541.
 35. Kretschmer R, Rico G, Giménez JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 112: 201-209.
 36. Salata RA, Cox JG, Ravdin JL. The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoeba by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunol* 1987; 9: 249-261.
 37. Salata RA, Martínez-Palomo A, Murray HW, Conales L, Treviño N, Segovia E, et al. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune mechanisms effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 1986; 136: 2633-2639.
 38. Vohra H, Kaur U, Sharma AK, Bhatta V, Bhasin D. Effective human defense against *E. histolytica*: high amoebicidal activity of lymphocytes and monocytes in amoebic liver abscess patients until 3 months follow-up. *Parasitol Int* 2003; 2: 193-202.
 39. Houghton ER, Glembocki DJ, Obrig TG, Moskaluk CA, Lockhart LA, Whight RL, et al. The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2002; 169: 4496-4503.
 40. Talámas-Rohana P, Schlie-Guzmán MA, Hernández-Ramírez V, Rosales-Encina JL. T-Cell suppression and selective *in vivo* activation of TH2 subpopulation by *Entamoeba histolytica* 220-Kilodalton lectin. *Infect Immun* 1995; 63: 3953-3958.
 41. López OM, Arellano J, Kretschmer R. The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. *Parasite Immunol* 1992; 14: 579-586.
 42. López-Osuna M, Velázquez JR, Kretschmer RR. Does the eosinophil have a protective role in amebiasis? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 237-240.
 43. Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1988; 130: 112-119.
 44. Navarro-García F, Lopez RR, Vega LM, Domínguez RM, Enriquez RF, Tsutsumi V. Intragastric immunization of rats

- with *Entamoeba histolytica* trophozoites induces cecal mucosal IgE, eosinophilic infiltration and type hypersensitivity. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82: 221-229.
45. Kasper LL, Buzoni-Gatel D. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun* 2001; 69: 1-8.
 46. Séguin R, Mann B, Keller K, Chadee K. TNF- α -stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infect Immun* 1997; 65: 2522-2527.
 47. Zhang Z, Mahajan S, Zhang X, Stanley SL Jr. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse-human intestinal xenograft model of disease. *Infect Immun* 2003; 71: 5355-5359.
 48. Campbell D, Chadee K. IL-2, IL4, and TNF- α responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J Infect Dis* 1997; 175: 1176-1183.
 49. Campbell D, Mann B, Chadee K. A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages. *Eur J Immunol* 2000; 30: 423-430.
 50. Flores-Romo L, Estrada-García T, Shibayama-Salas M, Campos-Rodríguez R, Bacon K, et al. *In vitro* *Entamoeba histolytica* adhesion to human endothelium: a comparison using two strains of different virulence. *Parasitol Res* 1997; 83: 397-400.
 51. Seydel K, Li E, Swanson P, Stanley S. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model amebiasis. *Infect Immun* 1997; 65: 1631-1639.
 52. Yu Yi, Chadee K. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology* 1997; 112: 1536-1547.
 53. Eckman L, Reed S, Smith J, Kagnoff M. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically interleukin-1 α . *J Clin Invest* 1995; 96: 1269-1279.
 54. Dwinell MB, Johanesen P, Smith J. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. *Surgery* 2003; 133: 601-607.

Enlaces en internet

www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/A-F/Amebiasis/body_Amebiasis_page1.html.

<http://martin.parasitology.m.mcgill.ca/jimspage/biol/Ameoba.html>

<http://us.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl>

<http://delphi.phys.univ-tours.fr/protysis/cutter.html>