

*Mecanismos de acción de hormonas  
esteroideas en la proliferación de  
Entamoeba histolytica y su papel durante  
la infección amibiana*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A  
BIOL. CLAUDIA CERVANTES REBOLLEDO

DIRECTOR DE TESIS  
DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ





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.

*Agradezco infinitamente a los integrantes de mi comité tutorial por su gran asesoría, apoyo y por la infinita paciencia que me tuvieron.*

*Dr. Julio César Carrero Sánchez  
Dr. Juan Pedro Laclette San Román  
Dr. Abraham Landa Piedra*

*"La gratitud es la memoria del corazón"  
(Jean Baptiste Massieu).*

# Dedicatoria

A mis padres por todo el amor y dedicación con el que me formaron, este logro es de ustedes y la vida es muy corta para agradecer todo su apoyo. Saben que los amo infinitamente y este trabajo es el fruto de sus consejos y enseñanzas que me guiarán por siempre.

A mi Vale eres el ángel que ilumina mi vida, gracias por darme el aliento que me impulsa a seguir adelante, por ti seguí adelante y por ti continuare en este camino.

A mis hermanas por ser mis amigas, confidentes y por nunca dejarme flaquear, gracias por su apoyo incondicional y le agradezco a Dios por haberme otorgado el privilegio de tenerlas a mi lado.

A mi abuelita, que es la base de todos mis logros.

## *Agradecimientos*

*Al Dr. Julio César Carrero Sánchez por ser mi guía en este camino que hoy concluye, por su gran apoyo y enseñanzas. Por ser un gran tutor que continuara formando excelentes estudiantes que serán su gran satisfacción y retribución.*

*Al Dr. Juan Pedro Laclette por abrirme las puertas de su laboratorio, por su gran apoyo y asesoría.*

*A los Dras. Emma Saavedra Lira, Cecilia Teresa Jiménez García, Bertha Espinoza Gutiérrez y el Dr. Ruy Pérez Montfort, por sus recomendaciones en el manuscrito que mejoraron considerablemente este trabajo de tesis.*

*A la M.C. Patricia de la Torre a nivel académico: por su gran ayuda en la enseñanza y realización de las diversas técnicas de biología molecular e inmunología que realice durante mi doctorado. A nivel personal: por su apoyo incondicional en los momentos difíciles, por sus invaluable consejos y principalmente por tu maravillosa amistad.*

*Al Dr. Jorge Morales Montor por su apoyo y asesoría.*

*A la Dra. Norma Moreno Mendoza y los integrantes de su laboratorio, Gil, Sandy, Chio, Caro y Vale, por recibirme como otra integrante más, por la paciencia que tuvieron en la enseñanza de las técnicas de manejo de tejidos y en las inmunohistoquímicas.*

*Al Dr. Alfonso Olivos y Mario Nequiz, integrantes del laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort, por proporcionarme las amibas, por sus enseñanzas y apoyo en la metodología de la infección experimental en hamsters, por sus consejos y la amistad que siempre me otorgaron.*

*A la Dra. Emma Saavedra Lira por su ayuda en la realización de los primeros experimentos, por sus consejos y comentarios que enriquecieron este trabajo.*

*A Guina, Josefina, Adolfo, Alfonso y demás integrantes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo y toda su gentileza.*

*Al Veterinario Gerardo Arrellín y la Sra. Josefina por sus enseñanzas en el manejo de los animales de laboratorio y en la realización de las gonadectomías.*

*A los integrantes del laboratorio Paty, Gaby, Raúl, Oscar, Yuliett y los que estuvieron durante mi estadía en el laboratorio, gracias por su compañerismo y amistad.*

*A mis amigos, auxiliares de laboratorio (Sra. Prima, Sra. Tere y etc.), secretarias (Blanquita, Azucena, Violeta, Eva, etc.) y todos aquellos que hicieron más sencilla mi estadía en el instituto, por que siempre estuvieron presentes cuando los necesite.*

*A todos mis profesores, sin excluir a ninguno por ser la base de mi formación.*

*A todos los que están y estuvieron a mi lado a lo largo de este camino que hoy culmina.*

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
I. RESUMEN .....	2
II. ABSTRACT .....	4
III. INTRODUCCIÓN .....	6
1. Amibiasis .....	
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	6
Morfología de <i>E. histolytica</i> .....	7
Ciclo de vida .....	10
1.2 Epidemiología .....	12
1.3 Patología .....	15
Amibiasis intestinal .....	15
Absceso hepático amibiano .....	18
1.4 Respuesta inmune a <i>E. histolytica</i> .....	21
Respuesta inmune celular .....	21
Respuesta inmune humoral .....	31
2. Los sistemas immuno-endocrino y las infecciones parasitarias .....	33
2.1 Factores endocrinos en el sistema inmunológico .....	33
2.2 Modulación immuno-endocrina en las infecciones parasitarias .....	35
2.3 Influencia hormonal en la infección por <i>E. histolytica</i> .....	42
3. Dehidroepiandrosterona (DHEA/S) y sus metabolitos .....	44
3.1 Mecanismos de acción de DHEA/DHEAS .....	46
3.2 Análogos de DHEA .....	49
IV. JUSTIFICACIÓN .....	51
V. HIPÓTESIS .....	52
VI. OBJETIVOS .....	52
Objetivos específicos .....	
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	53
1. Parásitos .....	53
2. Animales .....	53
3. Gonadectomía .....	53
4. Determinación de testosterona y estradiol .....	54
5. Inducción del AHA .....	54
6. Procesamiento del hígado para análisis histológico .....	55

7. Proliferación de esplenocitos .....	56
8. Inmunohistoquímica y análisis confocal .....	56
9. Tratamiento de trofozoítos con análogos de DHEA .....	58
10. Tratamiento de hámsteres con análogos de DHEA e inducción del AHA .....	58
11. Detección de las enzimas G6PDH y HMGCoA reductasa y su inhibición por DHEA .....	59
12. Análisis estadístico .....	60
<b>VIII. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
1. Efecto de la deficiencia de hormonas sexuales en el desarrollo del absceso hepático amibiano y sobre la respuesta inmune asociada a los abscesos hepáticos amibianos .....	61
1.1 Niveles de hormonas sexuales en hámsteres .....	61
1.2 Efecto de la deficiencia de hormonas en el desarrollo del AHA .....	64
1.3 Efecto de la deficiencia de hormonas en la proliferación celular in AHA .....	69
1.4 Modulación de la expresión de citocinas Th1, Th2 y Treg durante el desarrollo del AHA .....	71
2. Efecto de diferentes concentraciones de análogos de DHEA sobre la proliferación de los trofozoítos y el desarrollo del absceso hepático amibiano .....	77
2.1 Efecto de los análogos de DHEA sobre la proliferación de <i>E. histolytica</i> .....	77
2.2 Efecto de los análogos de DHEA, $\beta$ -AET y $\alpha$ -epi- Br, sobre el desarrollo del absceso hepático amibiano .....	81
3. Efecto de DHEA sobre la actividad de las enzimas G6PDH y 3- hidroxi-3metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCoA reductasa) .....	85
3.1 Caracterización cinética de la actividad de la HMGCoA reductasa y G6PDH en extracto de <i>E.</i> <i>histolytica</i> y su inhibición por DHEA .....	85
<b>IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>X. REFERENCIAS .....</b>	<b>100</b>
<b>APENDICE. Artículos publicados .....</b>	<b>111</b>

## ABREVIATURAS

<b>AHA</b> .....	Absceso hepático amibiano
<b>AR</b> .....	Receptor de andrógenos
<b>BSA</b> .....	Albumina
<b><math>\alpha</math>-epi-Br</b> .....	16- $\alpha$ -bromoepiandrosterona
<b>5<math>\alpha</math>-R</b> .....	5 $\alpha$ -reductasa
<b>3 <math>\beta</math>-HSD</b> .....	3 $\beta$ - hidroxiesteroide oxidoreductasa
<b>17<math>\beta</math>-HSD</b> .....	17 $\beta$ - hidroxiesteriode dehidrogenasa
<b>Con A</b> .....	Concanavalina A
<b>Cor</b> .....	Cortisol
<b>DHEA</b> .....	Dehidroepiandrosterona
<b>DHEAS</b> .....	Dehidroepiandrosterona sulfatada
<b>DHT</b> .....	Dihidrotestosterona
<b>E2</b> .....	Estradiol
<b>ER</b> .....	Receptor de estrógenos
<b>ERE</b> .....	Elemento de Respuesta a Esteroides
<b>FGdx+Infectado</b> .....	Falsa gonadectomía e infectado
<b>FILM</b> .....	Factor inhibidor de la locomoción de monocitos
<b>Gal-lectina</b> .....	Lectina específica de galactosa-N-acetil-D-galactosamina
<b>Gonadectomizado</b> .....	Gdx
<b>Gonadectomizados e infectado</b> .....	Gdx+Infectado
<b>G6PDH</b> .....	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>HMGCoA reductasa</b> .....	3-hidroxi-3metil-glutaril-coenzima A reductasa
<b>HPA</b> .....	Hipotálamo-pituitaria-adrenal
<b>HPG</b> .....	Hipotálamo-pituitaria-gonadal
<b>HST</b> .....	Hidroxiesteroide sulfotransferasa
<b>INF-<math>\gamma</math></b> .....	Interferón- $\gamma$
<b>iNOS</b> .....	Óxido nítrico sintetasa inducible
<b>MAC</b> .....	Complejo de ataque a la membrana
<b>MHC I y II</b> .....	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II
<b>NK</b> .....	Células asesinas naturales (natural killers)
<b>NKT</b> .....	Linfocitos T asesinos naturales (T Natural Killers)
<b>ON</b> .....	Óxido nítrico
<b>P4</b> .....	Progesterona
<b>P450<sub>scc</sub></b> .....	Citocromo P450 que rompe la cadena lateral del colesterol
<b>P450<sub>c17</sub></b> .....	Citocromo P450 con actividad de 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17, 20-liasa
<b>PGE2</b> .....	Prostaglandina E2
<b>PMN</b> .....	Polimorfonucleares
<b>ROS</b> .....	Especies reactivas de oxígeno
<b>SREHP</b> .....	Proteína rica en serina de <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>STS</b> .....	Esteroiide sulfatasa
<b>T4</b> .....	Testosterona
<b>TGF-<math>\beta</math></b> .....	Factor de crecimiento transformante- $\beta$ ,
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> .....	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>Treg</b> .....	T reguladoras



## I. RESUMEN

La frecuencia en que se presentan los abscesos hepáticos amibianos (AHA) en humanos es considerablemente mayor en hombres (7 a 10 veces más) que en mujeres, sugiriendo que las hormonas sexuales pueden tener un papel importante en esta infección parasitaria. En esta tesis se evaluó el efecto de la deficiencia de hormonas sexuales por gonadectomía en el desarrollo del absceso hepático amibiano (AHA) en hámsteres. Después de monitorear por un ensayo de unión a fluorescencia el decaimiento de estradiol en hembras y por un inmunoensayo enzimático el de testosterona en machos hasta niveles indetectables en el suero sanguíneo, los animales se infectaron intraportalmente con trofozoítos virulentos de *Entamoeba histolytica* y a los siete días post-infección los animales se sacrificaron. Los hámsteres gonadectomizados e infectados (Gdx+Infectados) mostraron una reducción del 50 % en machos y 15% en hembras en el desarrollo del AHA, en comparación con los animales controles no gonadectomizados que presentaron el 100 % de infección. La protección contra el desarrollo del AHA en hámsteres Gdx+infectados se debió a una reducción en el infiltrado inflamatorio y en la necrosis en los abscesos. Además, la evaluación de la respuesta a concanavalina A (Con A) de células de bazo de los hámsteres Gdx+infectados mostró una reducción en la proliferación de los esplenocitos con respecto al mismo tipo celular proveniente de animales infectados sin gonadectomía.

Debido a que el daño al tejido hepático en el AHA se ha asociado con una respuesta inflamatoria local tipo Th1, se evaluó por medio de inmunohistoquímica en cortes de hígado el perfil de citocinas asociado a esta respuesta inmune y a otras que también podrían estar participando (citocinas tipo Th2 y T reguladoras). Los animales infectados sin gonadectomización presentaron principalmente una respuesta tipo Th1 mientras que las hembras y machos gonadectomizados presentaron respuestas con perfiles de citocinas tipo Th2 y reguladoras, respectivamente. Estos resultados sugieren que la protección contra el

AHA por el déficit de hormonas, pudiera estar relacionada a una regulación negativa de la respuesta Th1 en el hígado durante la infección amibiana.

Por otro lado, anteriormente reportamos que la hormona adrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) afecta la proliferación de trofozoítos amibianos en cultivo y el desarrollo de la infección hepática en hámsteres. Por lo tanto, se evaluó el efecto de dos análogos de esta hormona, el  $\beta$ -AET y el 16- $\alpha$ -bromoepiandrosterona ( $\alpha$ -epi-Br) sobre la proliferación y el desarrollo del AHA. Los resultados mostraron que el tratamiento de trofozoítos en cultivo con  $\beta$ -AET afectó la proliferación solamente a concentraciones elevadas (50  $\mu$ g/ml) mientras que el análogo ( $\alpha$ -epi-Br) inhibió potentemente con una  $IC_{50}$  de 0.38  $\mu$ g/ml, similar al efecto descrito para la DHEA ( $IC_{50}$  de 0.3  $\mu$ g/ml). Además, el tratamiento de hámsteres con los análogos durante la infección experimental por *E. histolytica* mostró una inhibición total con  $\beta$ -AET y una reducción del 55.1% con  $\alpha$ -epi-Br en el desarrollo del AHA

Se ha reportado para células tumorales que el mecanismo anti-proliferativo de la DHEA se debe a la inhibición de la 3-hidroxi-3metil-glutaril-CoA reductasa (HMGC<sub>o</sub>A reductasa). Se pudo detectar una probable actividad de HMCC<sub>o</sub>A reductasa en extractos clarificados de trofozoítos de *E. histolytica*, la cual pudo inhibirse con DHEA con una  $IC_{50}$  de 0.089 mM. Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos anti-proliferativos de la DHEA sobre trofozoítos de *E. histolytica* en cultivo podría estar mediado por la inhibición de la actividad tipo HMGC<sub>o</sub>A reductasa, enzima limitante de la síntesis de colesterol, aunque esto queda por demostrarse experimentalmente.

## II. ABSTRACT

Incidence of amebic liver abscess (ALA) in human males is considerably higher than in females, suggesting a role for sex hormones in this parasite infection. We describe here the effect of hamster gonadectomy and the treatment with analogs of DHEA on the development of ALA. After monitoring the decrease of estradiol in females and testosterone in males to undetectable levels by ELISA and RIA in serum, hamsters were intraportally infected with *Entamoeba histolytica* trophozoites and euthanized seven days later. ALA was absent in 50% of male and 15% of female gonadectomized hamsters, in comparison with 100% infection in non-gonadectomized controls. This protection against ALA in gonadectomized hamsters was concomitant to a comparatively scarce inflammatory infiltrate and necrosis surrounding clusters of trophozoites in the liver tissue, as well as to a lack of response of spleen cells to concanavalin A, evaluated in proliferation assays. As tissue damage in ALA has been associated with a local inflammatory T helper 1 response (Th1), we determined the profile of response in hamsters by immunohistochemistry on liver sections. In contrast to strong Th1 responses in non gonadectomized animals, gonadectomized females and males exhibited Th2 and Th3 profiles of cytokines, respectively, suggesting that protection against ALA following gonadectomy, could be related to downregulation of liver Th1 response during amoebic infection.

On the other hand, the treatment of cultures with different doses of  $\beta$ -AET analog did not affect proliferation of trophozoites, except at the highest concentration (50  $\mu$ g/ml). By contrast, 16- $\alpha$ -bromoepiandrosterone analog ( $\alpha$ -epi-Br), significantly inhibited the growth of trophozoites in a dose dependent manner, similar to that described for DHEA. In addition, the treatment of hamsters with the DHEA analogs resulted in the total inhibition on the development of ALA with  $\beta$ -AET and in a reduction of 55,1% with  $\alpha$ -epi-Br. The effect of DHEA on a putative HMGCoAR activity detected in clarified extracts from *E. histolytica*

trophozoites was also carried out. DHEA inhibited the activity of this enzyme with an IC<sub>50</sub> of 0.089 mM. Our results suggest that DHEA might inhibits the *in vitro* growth of *E. histolytica* trophozoites by inhibiting this HMGR-like activity, a rate-limiting enzyme in mevalonic acid biosynthesis, a precursor of cholesterol necessary for cellular duplication.

### III. INTRODUCCIÓN

#### 1. Amibiasis

La Organización Mundial de la Salud define a la amibiasis: “como la condición de portar el parásito *Entamoeba histolytica*, con o sin manifestaciones clínicas” (WHO bulletin, 1969). Este parásito protozoario es capaz de invadir la mucosa intestinal, sin embargo, algunas veces puede diseminarse a otros órganos, principalmente el hígado. Es endémica en muchos países tropicales y subtropicales y se considera como la cuarta causa de muerte por enfermedades parasitarias alrededor del mundo (Anon, 1998).

##### 1.1 *Entamoeba histolytica*

Se considera a este parásito uno de los eucariontes más primitivos con un ciclo de vida simple, que oscila entre la fase infectiva o quiste y el trofozoíto o fase invasora. El humano y quizás otro primate, son los únicos hospederos naturales (Stanley, 2003).

*E. histolytica* fue descubierto por Losh en Leningrado en el año 1875. Este investigador encontró los trofozoítos en la materia fecal de un paciente con disentería, así como en las úlceras del colon cuando realizó la autopsia. Con el material que obtuvo inoculó a un perro por vía rectal, lo cual indujo disentería en el animal, pero desafortunadamente nunca correlacionó a las amibas como la causa de la colitis aguda. Posteriormente, los trabajos de Kartulis (1886), de Hlava (1887) y de Councilman (1891), aportaron las evidencias necesarias para demostrar que el parásito era el agente etiológico de la disentería amibiana y del absceso hepático (Romero y García, 2008<sup>a</sup>). En 1903, Schaudin le dio el nombre de *E. histolytica* e hizo la diferenciación entre ésta y *Entamoeba coli*. En 1913 Walker y Sellards infectaron voluntarios humanos de una prisión de Manila con quistes de ambos protozoarios, presentándose la amibiasis aguda únicamente en aquellos que habían sido infectados con *E.*

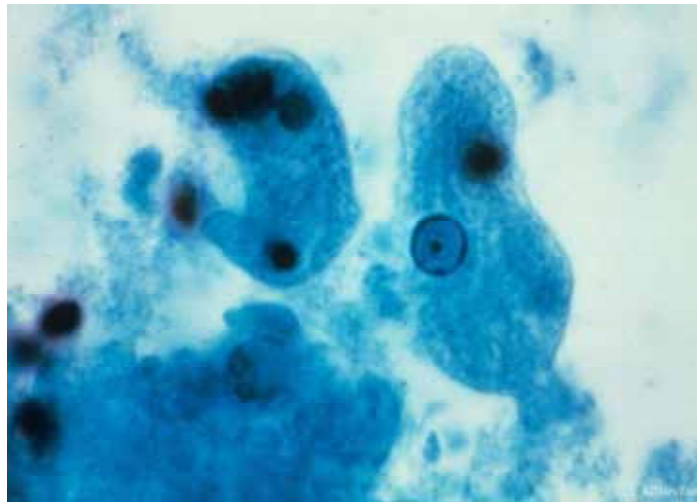
*histolytica* (Romero y García, 2008<sup>a</sup>). En el siglo pasado, Bekc y Dbrhlav cultivaron *in vitro* a *E. histolytica*. Diamond logró el cultivo axénico de trofozoítos, lo que permitió el avance en el estudio bioquímico, fisiológico e inmunológico del parásito (Romero y García, 2008<sup>a</sup>).

### **Morfología y biología de *E. histolytica***

Los **trofozoítos** habitan las criptas del colon ascendente en la luz del intestino grueso del hospedero y se observa en las materias fecales recién emitidas de los pacientes con disentería amibiana. Es la forma móvil e invasora del parásito cuyo diámetro varía de 10 a 60  $\mu\text{m}$ , es uninucleado, pleomórfico y se reproduce por fisión binaria (Fig. 1). El núcleo es esférico, vesiculoso sin posición fija en el endoplasma, de 5 a 7 micras de diámetro, con una membrana nuclear cuya cara interna está rodeada por cromatina empaquetada formando gránulos finos. En la parte central del núcleo hay un cariosoma y un endosoma central similar a un nucleolo. Sin embargo, la división nuclear se presenta sin cromosomas evidentes (Martínez-Palomo, 1987; Stanley, 2003). Estas características nucleares son sumamente importantes, pues son las que permiten la identificación taxonómica del protozoo.

En el citoplasma se puede diferenciar el ectoplasma, que es claro y retráctil, separado del endoplasma que contiene abundantes vacuolas, lo que le confiere una apariencia granular y oscura. Las vacuolas contienen detritos o bacterias que fueron ingeridos por la amiba y, en el caso de pacientes con amibiasis, se pueden observar eritrocitos endocitados en varios estados de desintegración. En el endoplasma, además del núcleo, se pueden observar organelos como el retículo endoplásmico, los ribosomas, polirribosomas y cuando se utilizan tinciones específicas para ADN, es posible identificar un cuerpo de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro correspondiente a un remanente de mitocondria o mitocondrión (Sogin y cols., 1989). El citoesqueleto está constituido por microfilamentos que generalmente se

encuentran adyacentes a la membrana plasmática en los sitios de unión de la amiba con el epitelio intestinal en donde se forman canales fagocíticos. La membrana plasmática de 10 nm de ancho es similar a la de la mayoría de las células, con proteínas embebidas en una bicapa lipídica y rica en carbohidratos. A pesar de que el trofozoíto posee un citoesqueleto poco organizado es extremadamente móvil; la fuente para el constante movimiento se origina de la conversión anaerobia de la glucosa a etanol, acetato y CO<sub>2</sub> (Saavedra y Pérez, 1996). Este movimiento es mediado por la emisión de pseudópodos, protusiones citoplasmáticas que se pueden formar en cualquier punto de la superficie. El ectoplasma fluye para formar el pseudópodo, seguido del endoplasma. Al desplazarse la amiba presenta en la parte posterior una región llamada uroide. En esta región, por un mecanismo poco conocido, la amiba acumula ligandos como anticuerpos, bacterias, etc. para después desprenderlos de la amiba sin causarle ningún problema, fenómeno conocido como capping (Calderón y cols., 1980).



**Figura 1. Trofozoíto de *E. histolytica*.** Se aprecia el núcleo con el cariosoma central y la cromatina periférica (<http://astmh.org/slidelibrary/index>).

A través de mecanismos aún desconocidos, los trofozoítos se pueden condensar y formar masas redondas u ovaladas con una pared muy delgada denominados quistes inmaduros o **prequistes**. El prequiste es hialino, su forma inmadura es más pequeña que los trofozoítos y más grandes que los quistes maduros. Se distinguen por que presentan un solo núcleo y aún no desarrollan la pared de quitina. El citoplasma generalmente contiene depósitos de glicógeno y ocasionalmente se observan cuerpos de cromatina. La morfología nuclear generalmente es confusa en esta etapa (Cevallos, 2002). Los prequistes tienen un par de divisiones nucleares con la producción de cuatro núcleos que dan lugar al quiste maduro.

El **quiste** es la forma infectante y de resistencia de *E. histolytica*; mide entre 5 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro de forma redonda u ovalada, con una pared refráctil lisa de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor (Fig. 2). Contiene gránulos finos, cuerpos cromatoides y una masa difusa de glucógeno. La principal característica estructural del quiste maduro es la presencia de una capa de recubrimiento de quitina que le confiere resistencia al medio ambiente y a la acción de los jugos gástricos a su paso por el estómago, dentro de lo que es el ciclo de vida de este parásito.



**Figura 2. Quiste maduro de *E. histolytica*.** Se aprecian dos de sus cuatro núcleos y la pared del quiste ya constituida. Quiste teñido con MIF (<http://astmh.org/slidelibrary/index>).

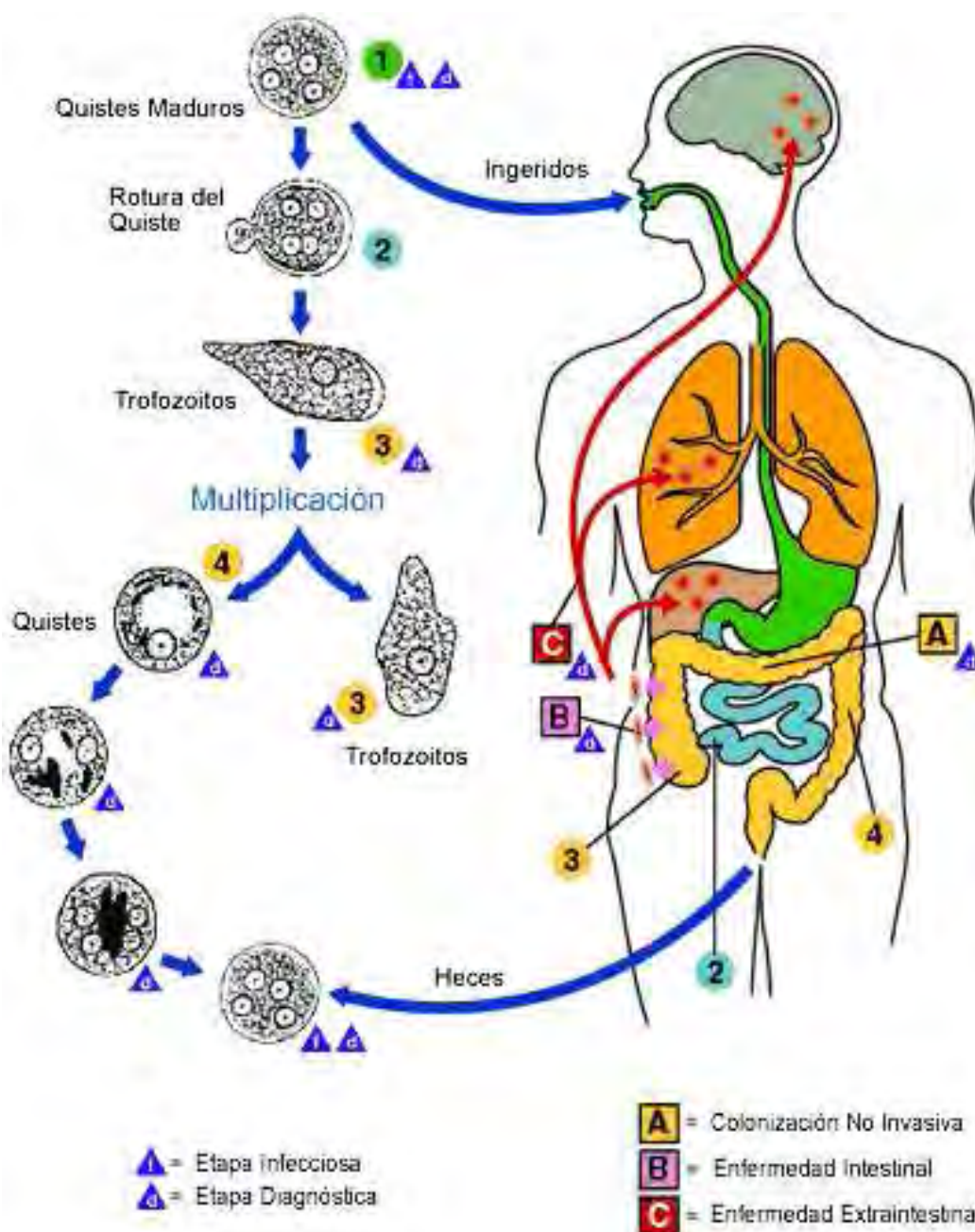


## Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. histolytica* es sencillo y presenta ciertas peculiaridades, entre las que destaca que no presenta un estado sexual, reservorios, ni hospedero intermediario y no existen vectores (Fig. 1).

La infección comienza con la ingestión de comida o agua contaminada con quistes maduros provenientes de materia fecal de humano. Gracias a su cubierta de quitina, los quistes ingeridos son capaces de resistir el efecto de los jugos gástricos hasta alcanzar la parte baja del intestino delgado, en donde pierden su cubierta liberando una amiba tetranucleada que duplica sus núcleos; después el citoplasma se fragmenta formando ocho pequeñas amebas, llamadas amébulas metaquísticas, las cuales al migrar al intestino grueso se transforman en trofozoítos maduros que se adhieren a la mucosa intestinal y la colonizan.

Cuando los trofozoítos invaden el colon comienzan a alimentarse de bacterias y restos celulares, se reproducen por fisión binaria y a diferencia de *Entamoeba dispar* que vive como comensal, los trofozoítos de *E. histolytica* dañan la superficie del epitelio intestinal y penetra la mucosa, lo cual resulta en la amibiasis intestinal o disentería amibiana. En pocos casos, esta invasión epitelial va secundada por la migración de trofozoítos a través de la vena porta hacia el hígado, resultando en el desarrollo del absceso hepático amibiano (AHA). No obstante, en contadas ocasiones *E. histolytica* puede llegar a invadir cualquier otro órgano del ser humano, como pulmón, piel e incluso cerebro. En cualquier caso los trofozoítos que alcanzan la parte baja del intestino grueso se enquistan en un proceso estimulado por condiciones luminales poco conocidas y finalmente son arrojados en las heces. Dependiendo de las condiciones ambientales, los quistes pueden permanecer viables a la intemperie por semanas o meses; al ser ingeridos nuevamente el ciclo de vida se completa (OMS, 1997; Ravdin, 1995).



**Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.** La infección comienza con la ingestión de quistes maduros (1) en agua o comida contaminada con materia fecal humana. Los quistes descienden hasta alcanzar la parte baja del intestino delgado (A), en donde terminan su proceso de desenquistamiento (2), que concluye con la liberación de una ameba tetranucleada que duplica sus núcleos para posteriormente fragmentar su citoplasma formándose ocho pequeñas amebas que migran al intestino grueso en donde se adhieren a la mucosa intestinal y la colonizan (3), ocasionando la enfermedad intestinal (B). En algunos casos, la invasión intestinal va secundada por la migración de trofozoitos a otros órganos (C), principalmente el hígado, resultando en el desarrollo del AHA. Para completar el ciclo los trofozoitos que están en la luz intestinal pueden enquistarse (4), y finalmente los nuevos quistes salen con las heces al medio ambiente. Tomado de la sección de Amibiasis del CDC, Atlanta 1999.

## 1.2 Epidemiología

La amibiasis es una enfermedad cosmopolita que prevalece en áreas con condiciones higiénicas deficientes, donde el hacinamiento, la deposición inadecuada de excretas y la contaminación del agua y comida favorecen su transmisión (OMS, 1997). Se estima que alrededor del 10% de la población presenta síntomas de la enfermedad, causando alrededor de 100,000 muertes anuales (Anon, 1997; Haque y cols., 2003; Ali y cols., 2008). A nivel mundial la amibiasis es una de las infecciones más frecuentes en el hombre, catalogándola como la cuarta causa de muerte por parásitos protozoarios, después de la malaria, tripanosomiasis Africana y leishmaniasis (Anon, 1998).

Aunque todas las muertes por *E. histolytica* son debidas a la enfermedad invasiva, los valores de prevalencia de este parásito pueden ser sobreestimados, debido a la inadecuada separación entre la especie patógena (*E. histolytica*) y la no patógena (*E. dispar*) (Diamond y Clark, 1993). Además, estudios recientes sugieren que las infecciones con *E. moshkovskii*, una especie idéntica morfológicamente, son comunes en algunas áreas endémicas para *E. histolytica* (Ali y cols., 2003; Khairnar y cols., 2007; Fotedar y cols., 2007) y por lo tanto, pueden contribuir en las estimaciones de prevalencia. La utilización de métodos de biología molecular en áreas endémicas para la caracterización de la especie de *Entamoeba* infectante, permite realizar cálculos más precisos en cuanto a las frecuencias de la infección por las diferentes especies en áreas geográficas específicas. Hasta este momento, solo la especie *E. histolytica* se ha identificado como capaz de producir sintomatología en el hospedero, y se calcula que solo uno de cuatro infectados desarrollan signos de la enfermedad (Haque y cols., 2006; Blessmann y cols., 2003). A pesar de estos datos, las infecciones por *E. histolytica* son tan frecuentes que en algunas regiones de los países subdesarrollados la prevalencia puede alcanzar tasas tan altas como del 50%, catalogándola como uno de los principales problemas de salud pública (Ali y cols., 2008; Tabla 1 y 2).

En el caso de México, en el año de 1996 se reportaron 1.3 millones de casos de amibiasis intestinal, sin embargo en esta evaluación se incluyeron infecciones por *E. dispar*. Estos datos son consistentes con aquellos estudios serológicos que indican que más del 8% de la población Mexicana ha presentado amibiasis invasiva, y con aquellos que reportan que ocurren entre 10 000 a 30 000 muertes anuales en nuestro país (Caballero-Salcedo y cols., 1994; Conde-Bonfil y De la Mora-Zerpa, 1992), lo cual ubica a la amibiasis entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad por parásitos en nuestro país (PAHO, 1998; Stanley, 2003).

**Tabla 1**  
**Prevalencia de la amibiasis intestinal** (Modificado de Ali y cols., 2008)

Método diagnostico	de Ciudad	Población estudiada	Prevalencia	
<b>Microscopia</b>	Corea	Personas discapacitadas	1.8	
	Tailandia	Instituciones para discapacitados	7.1	
	Líbano	Población general	2.3	
	Franja de Gaza, Palestina	Niños de 6-11 años	7.0	
	Camboya	Niños escolares	0.8	
	Etiopia	Niños escolares y prisioneros	27.6	
	Etiopia	Pacientes con SIDA	10.3	
	Irán	Población en general	1.4	
	Tanzania	Adultos en la región de Kilimanjaro	8.7	
	México	Población Rural	12.8	
	Brasil	Población urbana pobre	5.8	
	Brasil	Aldeas	21.0	
	Egipto	Pacientes hospitalizados	16.2	
	Australia	Referencia de laboratorio	2.9	
	Libia	Niños y neonatos	36.6	
	India	Hospital	11.7	
	India	Infectados-VIH/ no infectados	17.5/3.0	
	Turquía	Pacientes hospitalizados	5.3	
	<b>Análisis Isoenzimas</b>	de Sudáfrica	Semi-rural	1.0Eh, 9.0 Ed
		de Reino Unido	Hombres homosexuales	20 Ed, no Eh
Seychelles		Población general	2.6 Eh, 12.8 Ed	
Ecuador		Niños escolares	Ed es 3.7 más	

abundante que Eh

<b>Detección de anticuerpos por ELISA</b>	México	Población general	8.4 Eh
	Bangladesh	Niños en preescolar en Mirpur	7.6 Eh
	México	Región de Puebla	6.4 Eh
<b>Detección de antígenos por ELISA</b>	Tanzania	Adultos en la región de Kilimanjaro	0.8 Eh, 7.4 Ed
	Bangladesh	Niños urbanos hospitalizados	4.2 Eh
		Niños asintomáticos de poblaciones urbanas	4.3 Eh
		Niños asintomáticos de aldeas rurales	1.0 Eh
	Sudáfrica	Pacientes hospitalizados	1.8.8 Eh, 25.3 Ed
	Egipto	Niños escolares	2.1 Eh, 8.5 Ed
	Arabia Saudita	Pacientes hospitalizados	9 Eh
	Tanzania	Pacientes hospitalizados	2.7 Eh
		Infectados-VIH	4 Eh
<b>PCR</b>	Vietnam	Adultos asintomáticos	11.2 Eh
	Etiopia	Niños escolares, prisioneros e infectados-VIH	Solo Ed
	Irán	Población general	Ed 11.7 más común que Eh
	Brasil	Población urbana pobre	Solo Ed
		Aldeas	0.8 Eh, 8.7 Ed
	Franja de Gaza, Palestina	Pacientes hospitalizados	69.9 Eh, 22.8 Ed, 7.6 Eh+Ed
	México	Población rural	5.4 Eh, 48.6 Ed, 16.2 mixtas
	Nicaragua	Pacientes con diarrea	1.5 Eh, 7.5 Ed
	Italia	Referencia de laboratorio	5.6 Eh, 8.3 Ed
	Australia	Referencia de laboratorio	5.6 Eh, 70.8 Ed, 61.8 Em
	India	Hospital	3.5 Eh 9.3 Ed, 1.9 Em
			5 Ed, 13 Em
	Tanzania	Infectados- VIH	5 Ed, 13 Em

**Tabla 2**  
**Prevalencia de AHA** (Modificado de Ali y cols., 2008)

<b>Región y/o ciudad</b>	<b>Origen</b>	<b>Periodo</b>	<b>No. de casos AHA</b>	<b>No. de casos por año AHA</b>
Hue, Vietnam	Registros del hospital central	1990-1998	2031	225.7
San Francisco, USA	Historias médicas	1979-1994	56	3.5
México y Sureste de África	Búsqueda bibliográfica	1929-1997	5642	81.8
Bangkok, Tailandia	Hospital Memorial Chulalongkorn King	1992-2001	62 (23 VIH <sup>+</sup> )	6.2
Bordeaux, Francia	Hospital universitario de Bordeaux	1995-1999	20 (18 VIH <sup>+</sup> )	4
Palma de Mallorca, España	Hospital Universitario Son Dureta	1991-2001	7 (2 VIH <sup>+</sup> )	0.6
Seúl, Corea del Sur	Hospital Universitario Nacional de Seúl	1990-2005	31 (10 VIH <sup>+</sup> )	1.9
Sonora, México	4 hospitales de Hermosillo	200-2005	319	53.2
Taipei, Taiwán	Hospital Universitario Nacional de Taiwán	1994-2005	40 (40 VIH <sup>+</sup> )	3.3

### 1.3 Patología

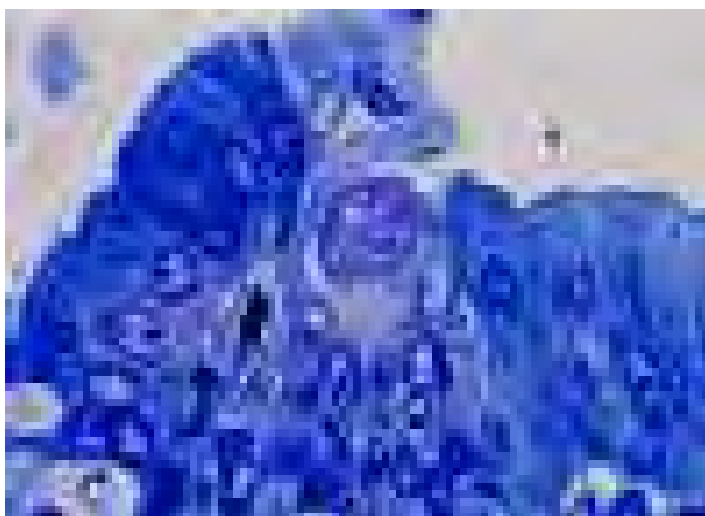
El nombre *E. histolytica* deriva de la capacidad que tiene este parásito de destruir casi todos los tejidos del ser humano, como la mucosa intestinal, el hígado y en menor grado, cerebro, piel, cartílago y hueso.

#### Amibiasis intestinal

La amibiasis intestinal es la forma sintomática más frecuente de la enfermedad, ocasionada por la invasión de la mucosa colónica por trofozoítos de *E. histolytica*. Esta se presenta con dolor abdominal agudo, evacuaciones constantes o diarrea que puede ir acompañada de moco y sangre, tenesmo y fiebre. En algunas ocasiones forman úlceras de 3-

5 nm que con frecuencia están en el ciego, el recto, el colon y ocasionalmente involucra al íleon en su parte final.

Los cambios microscópicos de la colitis amibiana se han estudiado en especímenes de biopsia rectal humana. En los estadios iniciales, los trofozoítos producen lesiones no específicas caracterizadas por engrosamiento de la mucosa, debido a la hiperplasia glandular y al edema estromal. Se observa mediana a moderada infiltración de neutrófilos dentro y alrededor de los capilares y en algunas ocasiones también se han observado debajo de la superficie del epitelio. Agregados de linfocitos muestran hiperplasia reactiva con numerosas células histiocíticas y las amibas se presentan en pequeño número en la superficie del tejido dañado. Cuando la lesión progresa, ocurre una depresión mucopénica debida a la pérdida de mucinas en la superficie y en las células del epitelio glandular, con disminución en la altura del epitelio de columnar a cuboidal. Es en este momento cuando se observa un gran infiltrado de neutrófilos, además de células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos y linfocitos, y las células amibianas pueden estar presentes en mayor número en la superficie luminal, pero son particularmente abundantes adyacentes a los sitios de lisis epitelial. La invasión de la mucosa colónica y cecal por *E. histolytica* comienza en el epitelio interglandular, formándose la lesión invasiva temprana con la ulceración superficial (Fig. 4). Dependiendo de la extensión del daño, las lesiones pueden ser pequeños focos interglandulares de microinvasión, con poco tejido necrótico y células de respuesta inflamatoria, o largas áreas de ulceración superficial donde los agregados amibianos son separados del tejido sano por una fina zona de necrosis y neutrófilos. La infiltración celular en torno de las amibas invasoras conduce a una rápida lisis de células inflamatorias y necrosis del tejido (Prathap y cols., 1970).



**Figura 4. Amibiasis experimental intestinal en cobayo.** Se observa un trofozoítos en el proceso de invasión a través del epitelio glandular. Un largo pseudópodo es extendido por el parásito durante la penetración. Sección semidelgada teñida con azul de toluidina.

En la lesión invasiva tardía se observa una ulceración profunda con la forma de cuello de botella, la cual fue descrita en 1891 por Councilman y Lafleur (Fig. 5). Esta úlcera se extiende profundamente dentro de una larga área de la submucosa, que parece ser particularmente susceptible a la acción lítica del parásito, produciendo abundantes microhemorragias. Esto explica el hallazgo de amibas hematófagas en muestras de materia fecal o en las raspaduras rectales, siendo la mejor indicación de la naturaleza amébrica de un caso de disentería o diarrea con sangre. Un espeso exudado que contiene material proteínico, glóbulos rojos y filamentos de fibrina es observado en el piso de la úlcera, donde grupos de amibas son identificados especialmente en las capas más profundas. Una profunda zona eosinofílica de necrosis fibrinoide separa el exudado de la subyacente submucosa viable. Este último es edematoso, hiperémico y mayoritariamente infiltrado por células plasmáticas.





**Figura 5. Histopatología de una típica úlcera de la amibiasis intestinal con forma de cuello de botella. Obtenida del CDC.**

Los neutrófilos son abundantes solamente en el borde de la úlcera y algunos linfocitos y macrófagos están presentes, pero los eosinófilos son raros. La presencia de amibas viables en la capa interna del músculo de la pared colónica en la ausencia de daño del tejido se ha reportado en tejido cercano (Masliah y Pérez-Tamayo, 1984). Finalmente, se observa la pérdida de la mucosa y submucosa con la formación de tejido de granulación y no es apreciable la delimitación del borde de la úlcera, y las amibas no se encuentran dentro del tejido, pero ocasionalmente están presentes en la superficie de daño (Prathap y cols., 1970).

### **Absceso hepático amibiano**

Como se menciona anteriormente *E. histolytica* puede infectar varios órganos, siendo el AHA la forma más frecuente de amibiasis extraintestinal y la causa de la mayoría de los casos letales por la infección con este parásito (Fig. 6); esta condición resulta de la

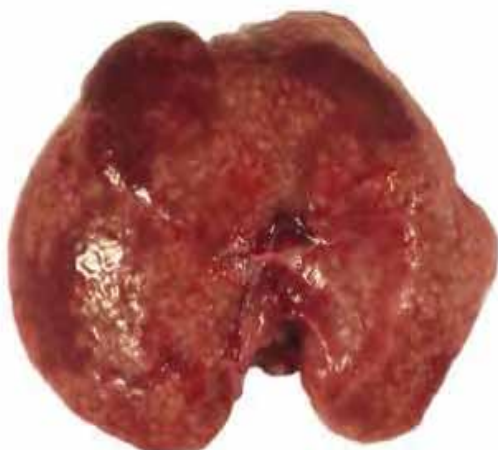
migración de trofozoítos del colon al hígado a través de la circulación portal. Se ha reportado que esta patología es 10 veces más común en adultos y en ellos se presenta de 10 a 7 veces más en hombres que en mujeres, dependiendo de la edad (Blessmann y cols., 2002; Hughes, 2000). Además existen estudios que señalan una posible relación entre el AHA y la frecuencia de ciertos haplotipos en algunos grupos étnicos (Arrellano y cols., 1991; Arrellano y cols., 1992; Arrellano y cols., 1996).

Cuando se diagnostica a los pacientes con AHA, aproximadamente el 20% ya tiene un historial de disentería previa y alrededor del 10% presenta disentería en ese momento. Entre los síntomas más comunes del AHA se encuentran: i) dolor localizado en la región del absceso. El dolor es intenso y constante, dispersándose a la región escapular y el hombro; ii) fiebre con variaciones desde 38 °C hasta 40 °C que permanecen por períodos de días; iii) se pueden presentar otros síntomas como anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y fatiga. Por otro lado, en los cortes histológicos de abscesos de pacientes con AHA se observa que el parénquima hepático es completamente sustituido por restos necróticos de hepatocitos con la presencia de escasos trofozoítos y células inflamatorias (OMS, 1997). Las lesiones son únicas y muchas de ellas se localizan en el lóbulo derecho en la región posterior, externa y superior (Hughes y Petri, 2000). En casos extremos, la formación de un AHA de grandes dimensiones puede llegar a perforar la cavidad peritoneal, pericárdica y pleural. Cuando se perfora el diafragma, la infección amibiana llega a invadir el parénquima pulmonar o los bronquios, resultando en la formación de abscesos en pulmones, e incluso, en algunos casos, esta diseminación puede alcanzar órganos tan distantes como el cerebro. Estos casos ocurren con muy poca frecuencia, así como aquellos en los que se han encontrado trofozoítos en tejidos como piel y las mucosas asociadas a los órganos genitales (Abuabara y cols., 1982).

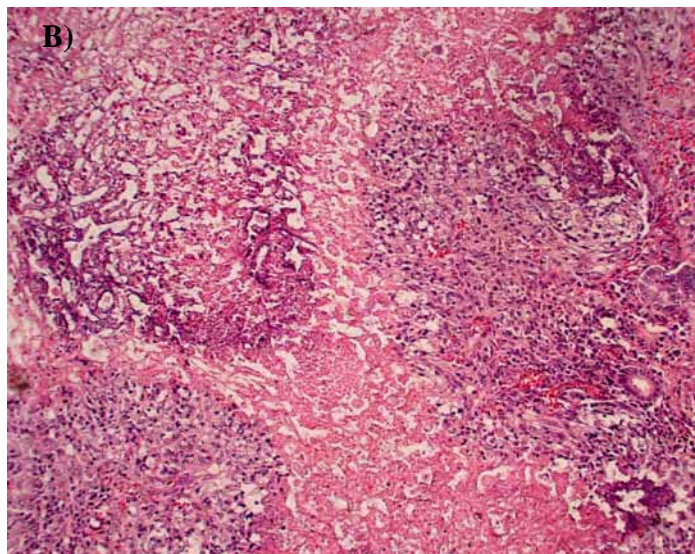
En las biopsias examinadas de pacientes con AHA se observa que *E. histolytica* puede inducir una pobre respuesta celular. Sin embargo, se ignora si esto se puede

generalizar para todos los casos en humanos o simplemente se debe a una incipiente respuesta y lo que en verdad ocurre ha escapado de su detección en las series de biopsias examinadas (Martínez-Palomo, 1987). En este sentido, la utilización de modelos animales ha permitido establecer los eventos celulares que siguen a la infección hepática por *E. histolytica*. Los hámsteres son los animales más empleados como modelo experimental para reproducir la amibiasis hepática, mediante la inoculación directa al hígado o intra-portal de trofozoítos axénicos, produciendo abscesos caracterizados por necrosis y reacción inflamatoria en el 80% de la superficie del hígado (Tanimoto y cols., 1973). Análisis microscópicos han mostrado que a las pocas horas de la llegada de la amiba a los sinusoides hepáticos, se produce una reacción inflamatoria de tipo agudo, donde predominan los polimorfonucleares (PMN), alrededor de la amiba; posteriormente aparecen cambios necróticos y degenerativos de los hepatocitos cercanos a las lesiones. Las lesiones van aumentando paulatinamente de tamaño y se van haciendo más irregulares, los PMN tienen lisis progresiva por acción del parásito y de los numerosos macrófagos, se incrementa la necrosis del tejido hepático y las lesiones tienden a dar origen a granulomas con centros necróticos (Chadee y Meerovitch, 1984; Tsutsumi y cols., 1984; Shibayama-Salas y cols., 1992). El contacto directo de los trofozoítos con los hepatocitos es poco común, lo que sugiere que la destrucción de los hepatocitos es ocasionada por los productos líticos de los PMN y macrófagos lisados por los trofozoítos (Tanimoto y cols., 1973; Tsutsumi y cols., 1984).

A)



B)



portalmente, con  $5 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica*. Se observan múltiples abscesos diseminados en gran parte del hígado y B) Corte histológico de hígado con absceso. Se observa destrucción del tejido hepático, infiltrado inflamatorio y trofozoítos alrededor de la lesión. Tinción H. E. 20X (Cervantes-Rebolledo y cols., 2009).

#### 1.4 Respuesta inmune a *E. histolytica*

##### Respuesta Inmune Celular

Toda relación hospedero parásito se basa en una serie de interacciones entre los mecanismos de defensa del hospedero y las estrategias de sobrevivencia del parásito. En el momento del establecimiento de *E. histolytica* en el intestino del hospedero, el parásito se encuentra con una serie de defensas del sistema innato del hospedero que incluyen a la barrera intestinal, compuesta por la mucosa y las células epiteliales, los fagocitos, granulocitos y los componentes líticos del suero (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Sin embargo, la amiba es capaz de desarrollar estrategias complejas para evadir las defensas del hospedero para facilitar su sobrevivencia y permanencia.

Durante la invasión de la mucosa intestinal los trofozoítos tienen que atravesar una gruesa capa de mucinas altamente glicosiladas que recubren el epitelio intestinal (110-160 mm). Experimentos *in vitro*, han mostrado que las proteasas de cisteína con las que cuenta la amiba pueden degradar la mucina MUC2, la cual es el mayor componente estructural de la mucosa colónica (Lidell y cols., 2006; Moncada y cols., 2003). Al atravesar esta barrera, los trofozoítos interactúan con las células del epitelio a través de sus moléculas de adhesión, de las cuales, la lectina específica de galactosa-N-acetil-D-galactosamina (Gal-lectina) es la más importante (Guerrant y cols., 1981). Debido a que la adherencia a las células del hospedero es un factor crítico en la patogénesis de la enfermedad intestinal y el absceso hepático amibiano, se ha descrito que la Gal-lectina presenta un papel muy importante en las primeras interacciones que se establecen con las células del hospedero. En ese sentido se ha demostrado que la Gal-lectina presenta una gran capacidad inmunogénica y puede inducir la producción de una gran cantidad de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (Sharma y cols., 2005). En células dendríticas se ha observado que la interacción directa con la Gal-lectina induce su activación y la secreción de citocinas tipo Th1, las cuales se han asociado con protección en animales infectados (Ivory y Chadee, 2007). Además en experimentos *in vitro*, utilizando células epiteliales y leucocitos de humano se encontró que el contacto de los trofozoítos a través de la Gal-lectina con las células del hospedero induce apoptosis en estas últimas.

Al continuar el proceso invasivo de la amiba, el epitelio responde iniciando una respuesta inflamatoria con liberación de IL-1 $\alpha$ , que es inducida a su forma activa por las proteasa de cisteína, algunas de ellas provenientes del parásito (Sharma y cols., 2005). Además de la liberación de esta citocina, la interacción de moléculas de superficie o solubles derivadas del parásito con las células del hospedero causa la liberación en el epitelio de citocinas y quimiocinas, tales como CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL3, CCL5, IL-6,

factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos, interferón (INF)- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Espinosa y Martínez, 2000). Además, se liberan mediadores intracelulares como la ciclooxigenasa-2 y la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), todos mediados por la activación del factor de transcripción NF-kB (Espinosa y Martínez, 2000). En conjunto, tanto citocinas y quimiocinas inducen hiperplasia glandular y migración de leucocitos a la submucosa, contribuyendo al proceso inflamatorio. En el análisis histológico de biopsias humanas de tejido que está comenzando el proceso de ulceración, se observa una moderada infiltración de neutrófilos acompañados por linfocitos agregados con macrófagos y células dendríticas en la submucosa. Sin embargo, un incremento en el número de neutrófilos, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos y células T se observa en el progreso de la infección (Espinosa y Martínez, 2000).

Por otro lado, se ha observado que la movilidad es esencial para la invasión del tejido intestinal por *E. histolytica*, y probablemente este movimiento puede ser inducido por moléculas quimioatrayentes del hospedero, como el TNF- $\alpha$ , el cual se ha observado que *in vitro* atrae a los trofozoítos (Blasquez y cols., 2006). Además, se ha involucrado a esta citocina en la amplificación de la respuesta inflamatoria hacia *E. histolytica* (Zhang y cols., 2003). En estudios *in vitro*, se ha observado que la estimulación de macrófagos con TNF $\alpha$  induce la producción de óxido nítrico el cual es citotóxico para los trofozoítos amibianos. INF- $\gamma$  es otra citocina que estimula en macrófagos la producción de óxido nítrico y TNF- $\alpha$ , al estar en contacto con trofozoítos completos o con proteínas amibianas (Wang y cols., 1992). En un estudio prospectivo en niños realizado en Bangladesh, se ha encontrado que la producción de INF- $\gamma$  se correlaciona con el estado nutricional y con la posible susceptibilidad a presentar una amibiasis sintomática (Haque y cols., 2007).

Debido a que los neutrófilos predominan en el reclutamiento a la submucosa y en la invasión del tejido hepático durante la infección por *E. histolytica*, el papel que pueden

presentar en la resolución de la infección se ha evaluado ampliamente. En estudios *in vitro*, se ha observado que los neutrófilos de humano son capaces de matar a los trofozoítos cuando son activados previamente con INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, IL-4 y antígenos amibianos. En la infección con modelos murinos la depleción de neutrófilos con anticuerpos neutralizantes anti-Gr-1 resulta en un aumento de la patología cecal en los aislados susceptibles en comparación con los resistentes, mientras que en modelos de baja susceptibilidad a la infección, la ausencia de neutrófilos favorecen la formación de granulomas; no obstante, estos ratones resuelven la infección similar a los animales que no fueron depletados de neutrófilos (Rivero-Nava y cols., 2002; Asgharpour y cols., 2005); estos resultados sugieren un papel protector de los neutrófilos en la amibiasis intestinal. Sin embargo, los PMN no parecen ser críticos para la resolución de la infección por *E. histolytica*, debido a que los animales son capaces de controlarla. Son diversos los mecanismos por los que los trofozoítos pueden interferir con el funcionamiento apropiado de los neutrófilos. La interrupción de las actividades de la NADPH oxidasa, podría inhibir el estallido respiratorio en neutrófilos y de esta manera resistir el estrés oxidativo (Arbo y cols., 1990; Sim y cols., 2005). La peroxiredoxina, una proteína de superficie de 29 kDa, le confiere a la amiba resistencia a las especies reactivas de oxígeno, lo que se ha asociado con la virulencia amibiana (Bruchhaus y cols., 1997; Choi y cols., 2005; Davis y cols., 2006). Por otra parte, se ha reportado que *E. histolytica* puede inducir la apoptosis de neutrófilos por activación de ERK1/2 y mediado por los especies reactivas de oxígeno (ROS) generados por la actividad de la NADPH oxidasa (Sim y cols., 2005). Además, la destrucción de neutrófilos por *E. histolytica* resulta en la liberación de peptidasas líticas y oxidasas citotóxicas, que conducen al daño de las células del hospedero (Guo y cols., 2007).

Por otro lado, se ha documentado en pacientes y modelos animales la función de los macrófagos como células efectoras durante la infección amibiana. Se ha observado que al

igual que los neutrófilos, los monocitos de humanos, así como los macrófagos de ratón provenientes de peritoneo, de bazo y de medula ósea, son capaces de matar a los trofozoítos después de la estimulación con citocinas (Lin y cols., 1994; Ghadirian y Denis, 1992<sup>a,b</sup>). Además, diferentes componentes de los trofozoítos son reconocidos por macrófagos vía señalización de TLR-2 y TLR-4 (Maldonado-Bernal y cols., 2005). Una sobre-expresión de TLR-2 se observa en macrófagos expuestos a la Gal-lectina de *E. histolytica*, resultando en la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citocinas proinflamatorias (Kammanadiminti y cols., 2004). Además, macrófagos que carecen de TLR-2 y TLR-4 muestran una respuesta deficiente hacia los lipopeptidoglicanos de *E. histolytica*, sugiriendo que ambos receptores son esenciales para el reconocimiento y la inducción de la respuesta en macrófagos (Maldonado-Bernal y cols., 2005). También se ha observado que el óxido nítrico (ON), un mediador citotóxico producido por macrófagos, es capaz de inhibir la actividad de las proteasas de cisteína y la alcohol deshidrogenasa 2, considerados como factores de virulencia en el parásito (Siman-Tov y Ankri, 2003), y los ratones deficientes a la iNOS parecen ser más susceptibles al desarrollo del AHA y a la apoptosis hepatocítica inducida por *E. histolytica* (Seydel y cols., 2000), sugiriendo que el óxido nítrico presenta un papel crítico en la defensa contra la amibiasis.

La amiba también ha desarrollado estrategias para modular las respuestas de los macrófagos: Por ejemplo, la exposición de macrófagos a trofozoítos completos o componentes amibianos induce la supresión del estallido respiratorio (Lin y cols., 1993) y una producción reducida de ON (Wang y col., 1994). La inhibición en la producción de ON es a través del consumo competitivo del sustrato de la oxido nítrico sintasa, la L-arginina, por una arginasa expresada en *E. histolytica* la cual convierte la L-arginina a L-ornitina (Elnekave y cols., 2003). Además, algunas proteínas amibianas solubles o secretadas inhiben en macrófagos la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II



inducida por  $\text{INF-}\gamma$ , sugiriendo una alteración en la presentación antigénica de macrófagos a los linfocitos T (Wang y Chadee, 1995).

Otro factor que podría afectar las funciones de los macrófagos es la Prostaglandina E2 (PGE2), un inmunoregulador producido por *E. histolytica* o macrófagos expuestos a proteínas amibianas (Dey y cols., 2003; Gutiérrez-Alarcón y cols., 2006). En macrófagos la presencia de PGE2 aumenta los niveles de AMPc activando la vía PKA, que inhibe la expresión de citocinas Th1, el estallido respiratorio mediado por NADPH, así como la síntesis de ON por la vía PKC (Wang y Chadee, 1995; Gutiérrez-Alarcón y cols., 2006). Además de PGE2, la amiba sintetiza al factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) que puede modular la respuesta inmune del hospedero. El FILM es un pentapéptido soluble que presenta propiedades antiinflamatorias, inhibiendo la producción de óxido nítrico y la locomoción de leucocitos (Rico y cols., 2003). Además, en monocitos humanos puede reducir la expresión de las quimiocinas pro-inflamatorias CCL1 y CCL4 y de su receptor CCR1. También se ha observado que FILM puede afectar el balance de citocinas pro y anti-inflamatorias, específicamente inhibiendo la expresión de IL-1 mientras que favorece la producción de IL-10 en células T  $\text{CD4}^+$  (Rojas-Dotor y cols., 2006). Sin embargo, aún queda la incógnita del papel que juega FILM en el desarrollo de la amibiasis humana.

Dentro de los mecanismos de defensa con los que cuenta el hospedero se han mencionado a las células asesinas naturales o NK (natural killers) y linfocitos T asesinos naturales o NKT (T Natural Killers), debido a su capacidad de producir  $\text{INF-}\gamma$  y péptidos citolíticos después de su activación. En modelos murinos con AHA ambos tipos celulares se han detectado, sugiriendo su activación ante la presencia de este parásito (Tsutsumi y col., 1984; Lotter y cols., 2006). Así mismo, se ha encontrado una elevada actividad citotóxica de células NK en ratones infectados con amibas virulentas comparados con los animales

infectados con el aislado no-patogénico (Kim y cols., 1993), sugiriendo el involucramiento de las células NK en la defensa contra *E. histolytica*. Además, en un estudio en el que se reportan diferencias entre géneros en el control del AHA en ratones C57BL/6 se menciona que las hembras controlan más rápidamente a la amiba a través del reclutamiento de un gran número de células NKT al sitio de la infección, acompañado con un incremento en la producción de INF- $\gamma$ . Adicionalmente se observó que las hembras deficientes en células NKT o tratadas con anticuerpos neutralizantes para INF- $\gamma$  presentan un mayor daño en el tejido hepático (Lotter y cols., 2006).

Por otro lado, después de penetrar la capa epitelial, los trofozoítos entran en contacto con el compartimento endovascular y con el torrente sanguíneo, en donde se encuentran factores solubles que potencialmente pueden destruir a los parásitos invasores o dirigirlos hacia las células efectoras que les darán muerte. Uno de estos factores que participan en la defensa contra parásitos que se encuentran en el torrente sanguíneo es el complemento con su vía clásica y alterna. En estudios *in vitro* se ha demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de activar al sistema de complemento por diversas vías (Reed y cols., 1986), lo cual conduce a la lisis de los parásitos susceptibles a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) (Reed y cols., 1983). A pesar de que el complemento puede matar a los trofozoítos se han identificado dos mecanismos de resistencia a este factor. Por un lado, se ha observado que la Gal-lectina puede inhibir el ensamblaje de C8 y C9 dentro del complejo de ataque a la membrana C5b-9, lo que impide la lisis de las células amibianas (Braga y cols., 1992) y por otro lado, se reporta que las proteasas de cisteína degradan a las anafilotoxinas C3a y C5a y de esta manera evadir el sistema inmune del hospedero (Reed y cols., 1995). Además, el rompimiento de la cadena  $\alpha$  de C3b por una proteinasa de cisteína de 56-kDa de *E. histolytica* conduce a la formación de una proteína tipo-C3b que impiden la formación del MAC (Reed y Gigli, 1990).

También existen otros factores del hospedero que tienen funciones importantes en la modulación del proceso inflamatorio, debido a que influyen las funciones biológicas de citocinas y quimiocinas. Se ha observado que la proteasa de cisteína EhCP2 induce la proteólisis de las quimiocinas CCL2 y CCL3 lo que resulta en una reducción de la migración de monocitos y eosinófilos. De manera interesante, la proteólisis de la quimiocina CXCL8 tiene el efecto opuesto, ya que el rompimiento causa un incremento en la migración de neutrófilos (Pertuz-Belloso y cols., 2004). De igual forma, la proteasa de cisteína EhCP5 es capaz de inactivar a la IL-18 a su forma pre-madura o madura a través de su rompimiento proteolítico. Sugiriendo que la regulación de la respuesta inflamatoria mediada por las proteasas pueden ser parte de un complejo mecanismo empleado por *E. histolytica* para establecerse exitosamente dentro del hospedero.

La citocina IL-10 se ha identificado como un factor que favorece la homeostasis intestinal, a través de la regulación de la respuesta inflamatoria (Kasper y Buzoni-Gatel, 2001). En el caso de la infección intestinal por *E. histolytica* se ha observado que la presencia de esta citocina también favorece una homeostasis en el epitelio intestinal que previene la adherencia de los trofozoítos y la exacerbación de la respuesta inmune. En la infección intestinal experimental en ratones susceptibles se observa una disminución en la producción de IL-10 que conlleva a un aumento en el daño (Sharma y cols., 2005; Haque y cols., 2007; Kasper y Buzoni-Gatel, 2001). De igual manera, la infección con trofozoítos en ratones deficientes para IL-10 resultó en un mayor daño intestinal, debido a la infiltración de los trofozoítos amibianos, e incluso este fenómeno se observó a pesar de que la infección se realizó en ratones con un fondo genético de resistencia (C57BL/6) (Hamano y cols., 2006). Por lo tanto, estas observaciones sugirieron que la resistencia a la infección intestinal podría depender de la producción de IL-10 y dos mecanismos han sido propuestos para explicar este fenómeno. El primer mecanismo descrito dependería del efecto anti-inflamatorio de esta

citocina sobre las células del hospedero que resulta en una disminución del reclutamiento de leucocitos al sitio de la infección, y el segundo involucraría su participación en la estimulación de la producción de mucinas por las células caliciformes en el epitelio intestinal (Ivory y cols., 2007).

Aunque la función de las células T en las infecciones por *E. histolytica* varía mucho dependiendo del modelo animal utilizado, así como del contexto en que se evalúa su participación. En la mayoría de los modelos se ha demostrado que la inducción de una inmunidad efectiva contra *Entamoeba* ocurre cuando se da la activación antígeno específica de los linfocitos T con la consiguiente secreción de citocinas. Sin embargo, en la mayoría de los casos de amibiasis invasiva reportados en humanos se ha observado una fuerte supresión celular, similar al efecto cuando los animales experimentales son tratados con glucocorticoides o se les realiza una esplenectomía (Ghadirian y Meerovitch, 1981<sup>a</sup> y <sup>b</sup>). Por otra parte, la depleción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el modelo experimental de amibiasis intestinal en ratones C3H/HeJ resulta en una reducción del infiltrado de mastocitos en la submucosa y en una disminución en la secreción de IL-4 y IL-13, que fue acompañada con una reducción en el número de parásitos, sugiriendo que al menos en este modelo los linfocitos T CD4<sup>+</sup> participan en la patología de la amibiasis a través de la regulación de la respuesta inflamatoria (Haupt y col., 2002). No obstante, en ratones SCID las infecciones por *E. histolytica* se desarrollan y resuelven de manera similar a como lo hacen los animales controles (Blazquez y cols., 2006).

Como se mencionó anteriormente, en humanos la amibiasis invasiva se presenta con una supresión de la respuesta linfoproliferativa para células T y B, y se desconocen las causas de este fenómeno. En el caso de la infección hepática experimental en gerbos se ha observado en la fase aguda (20 días en el desarrollo del AHA) una disminución significativa en los niveles de IL-2 cuando las células de bazo son estimuladas con Con A. Debido a que

la IL-2 presenta una función en la activación y proliferación de las células T, probablemente en gerbos la ausencia de esta citocina podría contribuir a la inmunosupresión y por consiguiente al establecimiento de la infección (Campbell y cols., 1999). No obstante de que la fase aguda de la amibiasis hepática en gerbos es acompañada con una persistente inmunosupresión, la resolución de la infección y la resistencia a una reinfección se asocia con altos niveles de IL-2 (Campbell y Chadee, 1997).

IL-6 es otra citocina que participa en la respuesta inmune hacia *E. histolytica*. En un estudio realizado en la población adulta Mexicana se observaron bajos niveles de IL-6 en el sobrenadante de linfocitos activados de pacientes que se recuperaron del AHA. Además, en aquellos individuos que presentaron AHA se detectaron bajos niveles de IL-5, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  con respecto a los individuos controles, sin embargo niveles similares de IL-2, IL-4 y IL-10 fueron observados en ambos grupos (Bekker y cols., 2000). Por otro lado, se ha encontrado que una regulación negativa en la producción de IL-6 puede aumentar el desarrollo del AHA en humanos (Bekker y cols., 2006). A nivel experimental se observó un aumento en el desarrollo de la infección hepática en ratones knockout para IL-6 en comparación con los ratones de la cepa silvestre, los cuales usualmente no presenta signos de abscesos o de infección. Adicionalmente, el análisis histológico de los abscesos de los ratones knockout mostraron una intensa reacción inflamatoria, mediada principalmente por eosinófilos, sugiriendo que la resistencia en el desarrollo del AHA podría deberse en parte a la presencia de la IL-6 en el tejido hepático (Estrada, 2007).

## Repuesta inmune humoral

En las infecciones por *E. histolytica* la activación de la inmunidad humoral ocurre en respuesta a componentes estructurales o a productos metabólicos secretados por los trofozoítos (Meerovitch y Chadee, 1989). La caracterización de la respuesta inmune humoral se ha realizado por años y se ha encontrado tanto a nivel intestinal como a nivel sistémico, dependiendo del grado de invasión del tejido por este protozoario. Los estudios seroepidemiológicos han mostrado que la mayoría de los pacientes con amibiasis invasiva desarrollan anticuerpos séricos, principalmente del isotipo IgG, específicos para *E. histolytica* los cuales puede permanecer por años (Ximénez y col., 1993; Kaur y col., 2004). En contraste a nivel intestinal un estudio prospectivo de una cohorte en niños de nivel preescolar en Dhaka, Bangladesh, demostró que los anticuerpos IgA secretados en la mucosa reconoce específicamente el dominio de reconocimiento a carbohidratos de la Gal-lectina y se encontró una asociación en la presencia de estos anticuerpos y la protección hacia la infección (Haque y col., 2001; Haque y col., 2006). Además, observaciones realizadas *in vitro* han mostrado que anticuerpos monoclonales de ratón epitope-específicos contra la Gal-lectina tienen la capacidad de inhibir la adherencia de la amiba a sus células blanco y de esta manera prevenir la colonización (Pillai y col., 1999; Kelsall y col., 1994). Sin embargo, a pesar de que los anticuerpos IgA en la mucosa intestinal se asocian con protección, la producción de anticuerpos IgA a nivel sérico no se encuentran correlacionados con está.

Adicionalmente altos niveles de anticuerpos IgG específicos contra la Gal-lectina son encontrados en pacientes con amibiasis intestinal y AHA comparados con los controles asintomáticos (Kaur y col., 2004). No obstante se ha observado un incremento en la frecuencia de nuevas infecciones hacia *E. histolytica* en niños que presentan anticuerpos IgG específicos contra la Gal-lectina en suero (Haque y col., 2002). Por lo tanto estos datos

indican que la respuesta sistémica de anticuerpos anti-Gal-lectina no confieren directamente protección hacia la amibiasis. Además, se ha descrito que la transferencia pasiva de suero de ratones vacunados no transfieren protección para la infección intestinal (Haque y col., 2002).

En el hígado humano los trofozoítos amibianos pueden permanecer por varios meses o años antes que el AHA sea diagnosticado. Durante este periodo ocurre la producción de inmunoglobulinas circulantes dirigidas hacia los dos principales antígenos inmunodominantes que se encuentran en la superficie del parásito (la Gal-lectin, la proteína rica en serina (SREHP), etc.). De manera impresionante 80% de los pacientes con AHA tienen IgGs que reconocen estos antígenos, sin embargo estos anticuerpos no se relacionan con protección (Petri y col., 2002), pero son muy importantes en el diagnóstico serológico de la infección amibiana (Salata y Ravdin, 1998). Estas observaciones sugieren una posible participación de los mecanismos de evasión inmune por parte del parásito en el control de los anticuerpos que se generan en la amibiasis invasiva; por ejemplo, podría ocurrir la acumulación de los anticuerpos que reconocen a los trofozoítos en la parte posterior de los trofozoítos, una región llamada uroide, para después desprenderlos de la amiba sin causarle ningún problema, fenómeno conocido como capping (Calderón y col., 1980).

## **2. Los sistemas inmuno-endocrino y las infecciones parasitarias**

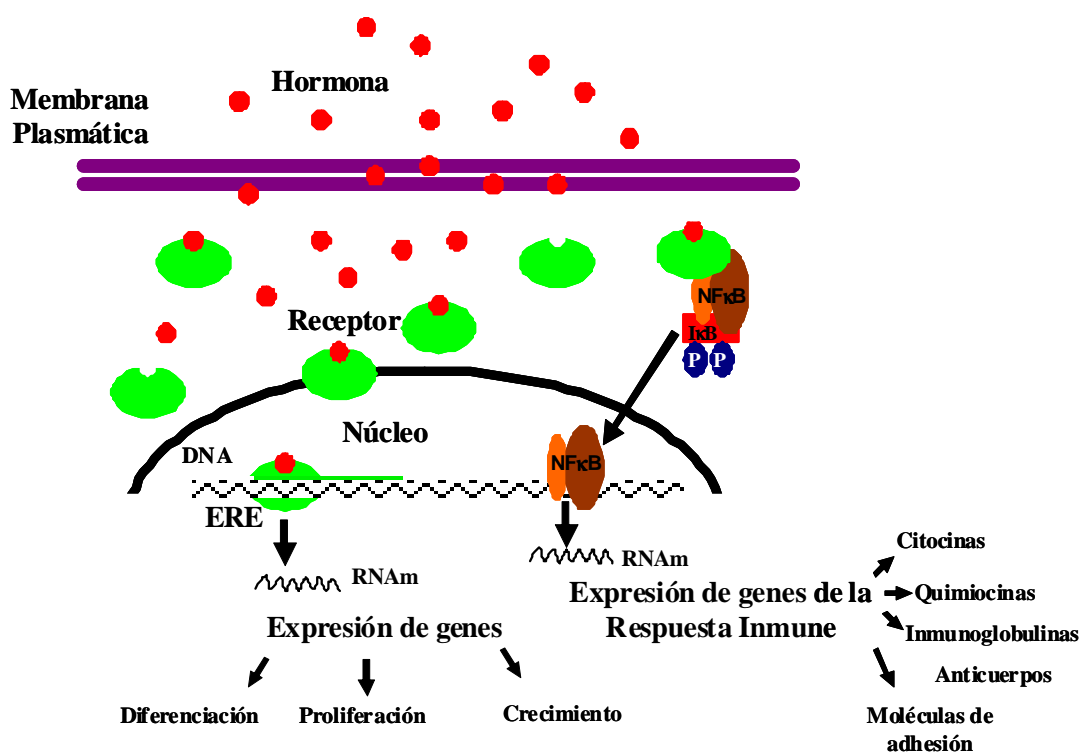
En diversos estudios de campo en aves y mamíferos se han sugerido que las infecciones parasitarias se presentan con mayor frecuencia en machos que en hembras (Zuk y McKean, 1996; Klein, 2004). No obstante, este fenómeno podría ser explicado por diversos factores, que incluyen la diferencia en la exposición de los sexos a varios estadios del parásito, la conducta social y la dieta (Klein, 2000; Humphreys y Grencis, 2002). En condiciones controladas en el laboratorio se ha observado una clara dicotomía en la susceptibilidad de machos y hembras a las infecciones por parásitos y estas diferencias se han asociado a los niveles de hormonas circulantes (Zuk y McKean, 1996; Klein, 2000; Roberts y col., 2001). Un ejemplo son las hormonas derivadas de los ejes hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) e hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG), que afectan la relación hospedero-parásito a través de sus efectos directos (inhibiendo o favoreciendo la proliferación de los parásitos) o indirectos (modulando la respuesta inmune del hospedero) (Homo-Delarche y cols., 1991; Morales-Montor y cols., 2001).

### **2.1 Factores endocrinos en el sistema inmunológico**

Las hormonas esteroideas ejercen sus efectos debido a sus estructuras químicas únicas que reconocen receptores específicos en las células, a través de los cuales regulan una variedad de funciones celulares y fisiológicas, como la reproducción, la diferenciación sexual, el desarrollo, el crecimiento, el mantenimiento del ambiente interno, la regulación del metabolismo y el suministro de nutrientes. Una sola hormona puede afectar más de una función y cada función puede ser controlada por diversas hormonas (Escobedo y cols., 2005). Actualmente se conoce que las hormonas tienen la capacidad de afectar a la respuesta inmune y en la literatura se ha descrito ampliamente la existencia de un dimorfismo



inmunológico (Schuurs y Verheul, 1990; Verthelyi, 2001). Las hormonas pueden aumentar o decrecer diversos aspectos de la inmunidad, a través de la unión a receptores funcionales de hormonas esteroideas presentes en las células del sistema inmune innato o adaptativo (Grossman, 1989; Bouman y col., 2005). La activación de este tipo de receptores en las células del sistema inmune, induce la activación de vías de señalización que incluyen al factor NF- $\kappa$ B que conduce a la producción diferencial de diversas moléculas de la respuesta inmune en las células diana (Klein, 2004; McKay y Cidlowski, 1999) (Fig. 7).



**Figura 7. Mecanismos de acción de hormonas esteroideas.** Para ejercer su acción las hormonas esteroideas se deben unir a receptores específicos en las células diana. Generalmente las hormonas se unen a receptores citoplasmáticos y el complejo hormona receptor se transloca al núcleo, en donde se une a los Elementos de Respuesta a Esteroides (ERE) en el ADN, induciendo la transcripción de genes que regulan una variedad de funciones celulares y fisiológicas. Además, se han descrito mecanismos alternativos de acción hormonal. La unión de las hormonas esteroideas a su respectivo receptor activa directamente vías de señalización celular, incluyendo el factor de transcripción NF $\kappa$ B, resultando en la producción diferencial de moléculas de la respuesta inmune en las células diana (Cervantes-Rebolledo y Carrero, 2008).

## 2.2 Modulación immuno-endocrina en las infecciones parasitarias

Se ha observado que los machos de muchas especies son más susceptibles a las infecciones parasitarias que las hembras. La infección con el tremátodo *Schistosoma mansoni* en áreas endémicas se reportan con mayor frecuencia en hombres que en mujeres (Marguerite y cols., 1999; Webster y cols., 1997). Aunque, este dimorfismo sexual puede atribuirse a las diferencias en la cantidad de tiempo que pasan hombres y mujeres en el agua y, por lo tanto, en exposición a los caracoles (el hospedero intermediario), o a diferencias en la composición de lípidos en la piel que pueden influir en la capacidad de los parásitos para penetrar y causar la infección (Webster y cols., 1997; Shiff y cols., 1972). Sin embargo, otra hipótesis para tratar de explicar la susceptibilidad de los hombres es aquella que propone un aumento en la respuesta pro-inflamatoria tipo Th1 (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ ) concomitante con una disminución de la respuesta Th2 (IgE) (Webster y cols., 1997; Mwatha y cols., 1998; Remoue y cols., 2001; Naus y cols., 2003). Además, en humanos se ha encontrado que una elevada respuesta pro-inflamatoria contra *S. mansoni* está correlacionada con el desarrollo de la infección, incluyendo la hepatomegalia (Mwatha y cols., 1998). Por el contrario, la respuesta de células T reguladoras, con síntesis de IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , que regula negativamente la respuesta Th1, así como la producción de anticuerpos IgA específicos, los cuales están asociados a la inmunidad contra futuras re-infecciones en *Schistosoma*, se encuentran incrementados en las mujeres y se correlacionan con resistencia a la infección (Remour y cols., 2001). Aunque la hormona(s) que median las diferencias entre sexos observadas en la infección por *S. mansoni* en humanos se desconocen, se ha propuesto que los estrógenos y progestinas podrían regular el aumento en la producción de IL-10, TGF $\beta$  y IgA en mujeres (Remoue y cols., 2001). En contraste, en los modelos murinos experimentales de infección con *S. mansoni*, las hembras son más susceptibles a la infección al desarrollar una respuesta inmune pro-inflamatoria aumentada

en comparación de los machos (Eloi-Santos y col. 1992; Boissier y col., 2003). Además, la administración de testosterona en hembras protege, mientras que la castración de machos exacerba la cantidad de gusanos y la mortalidad en la infección, sugiriendo que la testosterona está implicada en la susceptibilidad entre hembras y machos durante la infección temprana a *S. mansoni* (Nakazawa y cols., 1997).

Las hormonas adrenales también parecen ejercer un papel importante en el establecimiento y patogénesis de la esquistosomiasis. Así, se ha observado la existencia de una relación entre la cantidad de DHEA y de su forma sulfatada (DHEAS), y la intensidad de la infección por *S. mansoni*. El incremento en los niveles de DHEAS en el suero de adolescentes (15-19 años) favorecen un declive en la progresión e intensidad de la infección (Abebe y cols., 2003). De igual forma, en la esquistosomiasis murina la DHEAS ejerce un efecto protector, siendo incluso más efectivo que los propios antígenos candidatos a vacuna (Fallon y col., 1998). Estudios *in vitro* han mostrado revelado un efecto similar; DHEA, y en menor medida cortisol afectan el crecimiento de *S. mansoni* en todos sus estadios larvales y en el gusano adulto, aparentemente a través de la interrupción de rutas metabólicas esenciales para el parásito (Morales-Montor y cols., 2001).

Al igual que con *Schistosoma*, la infección con el parásito protozoario *Plasmodium spp.* cursa con un pronunciado dimorfismo sexual en sus hospederos vertebrados. Aunque en humanos la incidencia de la infección es generalmente similar entre sexos, se reporta que la intensidad es mayor en hombres que en mujeres (Wildling y cols., 1995; Landgraf y cols., 1994). De igual manera, en estudios con roedores infectados con *Plasmodium spp.*, el índice de mortalidad es mayor en machos que en hembras, y se sugiere que, tal vez las diferencias hormonales entre sexos podrían estar involucradas. La castración de machos disminuye, mientras que la administración exógena de testosterona aumenta, la mortalidad en ratones infectados con *P. chabaudi* y *P. berghei* (Wunderlich y cols., 1991; Kamis y Ibrahim,

1989). En ratones hembras adultas la exposición a testosterona reduce la producción de anticuerpos y disminuye la expresión del MHC II en células de bazo, así como la expresión de genes de respuesta a malaria en hígado, sugiriendo que los efectos inmunomoduladores de la testosterona favorece el aumento en la susceptibilidad en machos (Benten y cols., 1997; Krücken y cols., 2005). Este efecto modulador de la testosterona podría afectar al sistema inmune a muchos niveles, pues la infección experimental con *Plasmodium spp.* en ratones knockout para IFN- $\gamma$  e IL-4 (unas de las principales citocinas de las respuestas Th1 y Th2, respectivamente), también mostró que la sobrevivencia es mayor en hembras que en machos (Zhang y cols., 2000). A pesar de que las diferencias entre sexos se mantienen en ausencia de INF- $\gamma$ , la expresión diferencial de esta citocina pro-inflamatoria influenciada por los estrógenos, parece ser la responsable de la resistencia de las hembras en ratones C57BL/6. Machos intactos, así como las hembras gonadectomizadas, presentan mayor probabilidad de morir por la infección con *P. chabaudi* que las hembras intactas (Cernetich y cols., 2006). Por otra parte, ensayos *in vitro* se demostró que la DHEAS inhibe la proliferación de *Plasmodium spp.* (Ayi y cols., 2002), lo que correlaciona con evidencias derivadas de un estudio realizado en Kenia en un área endémica para *P. falciparum*, en el que se encontró que altos niveles circulantes de DHEAS en mujeres durante la pubertad coincidía con baja parasitemia, sugiriendo un papel protector de esta hormona contra la malaria (Leenstra y cols., 2003).

Como en los casos de *Schistosoma* y *Plasmodium*, estudios epidemiológicos revelan que los hombres presentan mayor incidencia de infecciones que las mujeres; en particular, en la leishmaniasis visceral causada por *L. donovani*, los niños prepúberes desarrollan con mayor frecuencia la enfermedad que las niñas (Jones y cols., 1987; Weigle y cols., 1993; Shiddo y cols., 1995). De la misma forma, la infección experimental en ratones revela que en general los machos son más susceptibles a la infección que las hembras y la castración de

machos reduce, mientras que la administración de testosterona a hembras aumenta la susceptibilidad a *L. major* (Mock y Nacy, 1988). La misma tendencia se ha observado en la infección por *L. mexicana*, en la que se sugiere además que la resistencia de las hembras podría ser mediada por el efecto de los estrógenos en la síntesis de INF- $\gamma$  y la producción de una respuesta Th1 (Satoskar y cols., 1998). Aunque se desconoce la fuente del INF- $\gamma$  inducido por los estrógenos, es posible que éste se derive de las células de la respuesta inmune inflamatoria temprana, como las células NK. Por su parte, un estudio con macrófagos derivados de ratones hembras y machos de la misma cepa, DBA/2, e infectados con *L. mexicana*, demostró que el tratamiento de estas células con estradiol (E2) resulta en un incremento en la producción de ON acompañado de un incremento en la mortalidad de los parásitos, sin expresión de citocinas pro-inflamatorias, sugiriendo que el E2 puede incrementar la actividad leishmanicida en macrófagos a través de la inducción en la producción de ON (Lezama-Dávila, 2007). Otro estudio *in vitro*, realizado con macrófagos infectados con *L. donovani* y tratados con testosterona (T4), mostró un incremento en el número inicial de macrófagos infectados con respecto a macrófagos no tratados (Zhang y col., 2001; Yin y col., 1998; Qiao y col., 1999). Además, la testosterona disminuyó la apoptosis, en los macrófagos infectados, acompañado con un incremento en la expresión de Fas, FasL y caspasa-8 (Qiao y col., 1999; Liu y col., 2005). Estos efectos observados por T4 son asociados a la unión de la hormona a sitios específicos en la superficie celular de macrófagos (Liu y col., 2005).

Al igual que en los casos anteriores, la evidencia indirecta en infecciones por *Trypanosoma cruzi* sugieren una tendencia a una menor severidad y frecuencia de las lesiones en mujeres que en hombres (Mota y cols., 1990; Castro y cols., 1994). Esto concuerda con estudios realizados en diversos modelos animales que demuestran que las hembras tienden a ser más resistentes que los machos a la infección (Araujo-Jorge y cols.,

1992; Prado y cols., 1999). Se ha sugerido que esta resistencia podría deberse a un incremento en la producción de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* o a una modulación de la respuesta inmune a través de la producción de citocinas como  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 y IL-2 (Krettli y Brener, 1976). La gonadectomía en machos de *Calomys callous*, antes de la infección con el aislado Y de *T. cruzi*, induce una disminución en los niveles de parasitemia, mientras que la reconstitución hormonal con testosterona revierte este efecto (Prado y cols., 1999). En contraste, la gonadectomía de hembras de la misma especie de roedor, conduce a un aumento en la parasitemia comparado con los animales intactos y la reconstitución con estrógenos y progesterona inducen una lenta disminución en los niveles de parasitemia hasta acercarse a los niveles de los animales intactos (Prado y cols., 1998). Además, los machos gonadectomizados exhiben un aumento en la respuesta inmune, con una mayor proliferación de esplenocitos y altas concentraciones de ON en comparación con las hembras gonadectomizadas, indicando que las hormonas gonadales participan en la modulación de la magnitud de la respuesta inmune durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* (D'Ambrósio, 2008). *In vitro*, se ha observado que dosis suprafisiológicas de E2 reducen la proliferación de epimastigotes e inducen la lisis de trypomastigotes (de Souza y col., 2001). Al igual que las hormonas gonadales, las hormonas adrenales parecen desempeñar un papel importante en la protección contra *Trypanosoma*. En ratones, la administración subcutánea de DHEA resulta en una reducción significativa de parásitos en sangre durante el pico de parasitemia, mientras que en tejidos de rata son observados escasos y pequeños nidos de amastigotes con poco infiltrado inflamatorio (dosSantos y cols., 2005; dosSantos y cols., 2007). El efecto del tratamiento con DHEA parece ser debido a una función inmunoreguladora durante el curso de la infección por *T. cruzi*, ya que induce atrofia tímica, un aumento en el número de macrófagos activados y un incremento en la lisis de parásitos

mediada por anticuerpos, además de un aumento en la producción de ON, IL-2 y INF- $\gamma$  (dosSantos y cols., 2007; dosSantos y cols., 2008).

*Toxoplasma gondii* y *Taenia crassiceps* son de los pocos parásitos en cuyas infecciones las hembras son más susceptibles que los machos. En ratones infectados con *T. gondii*, las hembras desarrollan una severa inflamación en el cerebro y mueren antes que los machos (Pung y Luster, 1986). Igualmente, la ovariectomía reduce, mientras que la administración de estradiol exagera, el desarrollo de quistes en tejido (Liesefeld y col., 2001; Roberts y col., 1995). Durante la infección en ratones machos se observa un incremento en las concentraciones de TNF $\alpha$ , IL-12 e INF $\gamma$  (Phillips y col., 1994). Aunque, en adultos sanos la infección es asintomática, en individuos inmunocomprometidos con SIDA la encefalitis inducida por *T. gondii* se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres (Phillips y col., 1994).

En la infección experimental de ratones con cisticercos de *T. crassiceps*, las hembras son más susceptibles a la infección que los machos, aunque después de algunos meses de infección los cisticercos se encuentren masivamente en ambos sexos (Huerta y cols., 1992). Hoy se conoce que la susceptibilidad murina a esta infección es debida al nivel de estrógenos circulantes en suero que favorece un aumento de la respuesta Th2, la cual es ineficiente para limitar el crecimiento del parásito. Así la gonadectomía tiende a equilibrar la susceptibilidad entre los dos géneros, al disminuir en mayor medida la carga parasitaria en hembras que en machos, efectos que son revertidos por la administración de E2 y T4, respectivamente (Huerta y col., 1992). Además la gonadectomía en machos se asocia con una reducción de los niveles de IL-2 e INF- $\gamma$ , la cual es restablecida por la administración de andrógenos (Morales-Montor y col., 2002).

Es interesante mencionar que la infección con *T. crassiceps* induce por si sola procesos desandrogenización y estrogenización (Larralde y cols., 1995), es decir, ocurre un

proceso de feminización en machos que podrían favorecer la implantación de los parásitos. Estos procesos también están asociados con daño en el tejido reproductor del amcho (Morales-Montor y cols., 1999) y con cambios en los niveles del ARNm de enzimas involucradas en el metabolismo normal de esteroides (Larralde y col., 1995; Morales-Montor y col., 1999). Estos estudios en animales experimentales, correlacionan con ensayos *in vitro* en los que se ha observado que la exposición del cisticerco a E2 y progesterona (P4) estimula su reproducción e infectividad, mientras que la T4 y dihidrotestosterona (DHT) ejercen el efecto opuesto (Escobedo y col., 2004). En este parásito, también se han podido amplificar secuencias correspondientes a receptores para esteroides sexuales, entre los que se encuentran el receptor de estrógenos (ER) (isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ ) y el receptor de andrógenos (AR), sugiriendo que en *T. crassiceps* los esteroides sexuales actúan directamente en la reproducción del parásito por unión a un receptor de esteroides sexuales específico y clásico (Escobedo y col., 2004). Al igual que con *T. crassiceps*, ensayos *in vitro* con *Trichomonas vaginalis* mostraron que el tratamiento con E2 estimuló su crecimiento, mientras que la P4 y la T4 lo inhibien (Martinotti y col., 1985).

En el caso de las infecciones con *Cryptosporidium parvum* se ha descrito solamente el efecto de la DHEA, una hormona secretada en la glándula adrenal. Se ha observado en modelos murinos inmunosuprimidos que el tratamiento con DHEA resulta en una disminución significativa del número de parásitos que colonizan el intestino delgado, así como de ooquistes excretados en las heces. Este efecto es atribuido a una mayor activación de células T y B, acompañado con un alto nivel de anticuerpos séricos del isotipo IgG específicos para *C. parvum* en los animales tratados con respecto a los controles no tratados (Rasmussen y Healey, 1992; Rasmussen y col., 1993; Rasmussen y col., 1995; Khalifa y col., 2000).



### 2.3 Influencia hormonal en la infección por *E. histolytica*

Aunque no se cuenta con mucha información, en las infecciones por *Entamoeba histolytica* existen datos epidemiológicos del AHA que sugieren una posible influencia del factor hormonal en esta infección extraintestinales. Así, se reporta que el AHA es más común en adultos que en niños y dentro de los adultos se presenta de 7 a 10 veces más en hombres que en mujeres, incluso en áreas endémicas donde ambos géneros están igualmente expuestos (Blessmann y cols. 2002; Hughes y Petri, 2000). Sin embargo, no se cuentan con antecedentes de un posible dimorfismo sexual en la infección por *E. histolytica* en ningún modelo experimental, salvo un reporte reciente de AHA en ratones C57BL/6, donde las hembras controlaron más rápidamente la infección hepática por *E. histolytica* a través del reclutamiento de un mayor número de células NKT al sitio de la infección, acompañado con un incremento en la producción de INF- $\gamma$  y de otras citocinas pro-inflamatorias. Además, se observó un incremento en el daño del tejido hepático en hembras deficientes en células NKT o tratadas con anticuerpos neutralizantes para INF- $\gamma$  (Lotter y cols., 2006). Sin embargo, estos resultados son contradictorios ya que existen observaciones que sugieren la participación de la respuesta inmune celular inflamatoria en el daño tisular asociado a la invasión hepática por la amiba (Tsutsumi y col., 1984; Olivos-García y col., 2004; Olivos-García y col., 2007). La clave en este caso podría estar en las hormonas femeninas, pues existe un reporte en el que se encontró que los estrógenos pueden conferir protección contra el desarrollo del AHA en hámsteres cuando son administrados días antes de la inoculación de trofozoítos virulentos (González y col., 1972). Otro informe sugiere que la P4 puede favorecer la migración de amibas del intestino al hígado en cobayos infectados (Gil y col., 1983).

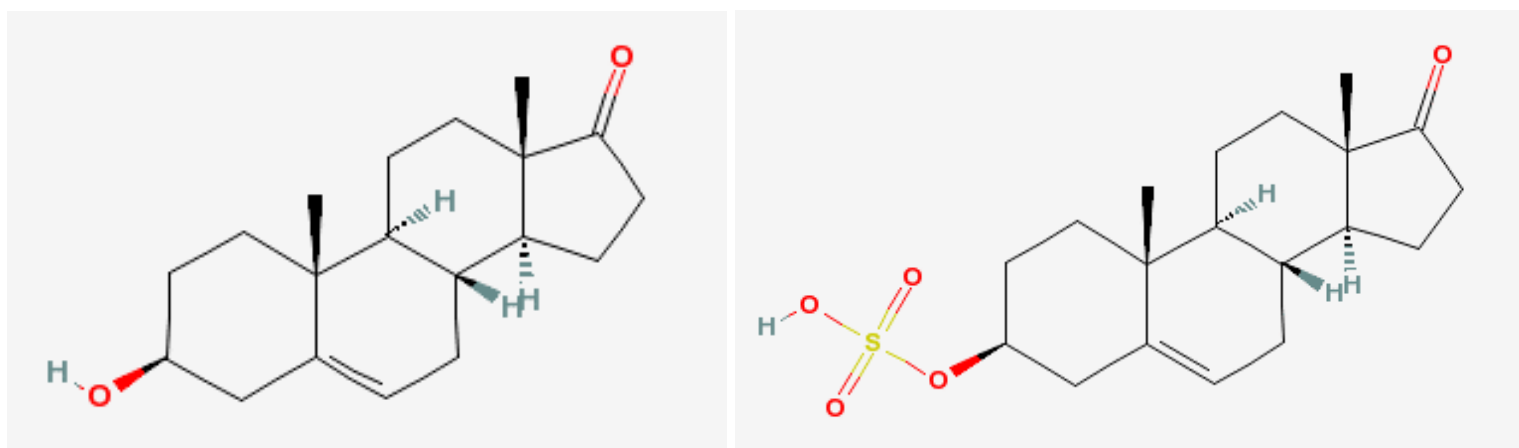
Durante mi tesis de licenciatura demostramos que el tratamiento *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* con concentraciones variables de E2, P4 y DHT no afectaron la

proliferación ni viabilidad de los trofozoítos, sugiriendo que a diferencia de otros parásitos protozoarios, las hormonas sexuales no ejercen ningún efecto directo sobre las amiba (Carrero y cols., 2006). En contraste, las hormonas adrenales DHEA y cortisol (Cor), afectaron la proliferación y viabilidad de los trofozoítos de una manera dosis-dependiente. Así, DHEA inhibió fuertemente la proliferación y síntesis de DNA, incluso a dosis fisiológicas, mientras que Cor estímulo ligeramente a altas dosis. Además, se pudo determinar que la lisis de trofozoítos inducida por DHEA es causado por un efecto necrótico mas que por un proceso apoptótico (Carrero y cols., 2006).

Sin embargo a pesar de su propiedad anti-proliferativa, el tratamiento de hámsteres vía-subcutánea con diferentes dosis de DHEA exacerbó el desarrollo del AHA, observándose en los cortes de los animales tratados escaso tejido sano, un incremento en el infiltrado inflamatorio y una gran cantidad de trofozoítos cuyo número parece estar en relación directa con la cantidad de DHEA administrada (Carrero y cols., 2006)., Lo anterior sugiere que *in vivo*, DHEA interacciona con factores del hospedero que favorecen el desarrollo de la infección hepática, enmascarando cualquier efecto directo que pudiera tener sobre el parásito.

### 3. Dehidroepiandrosterona (DHEA/S) y sus metabolitos

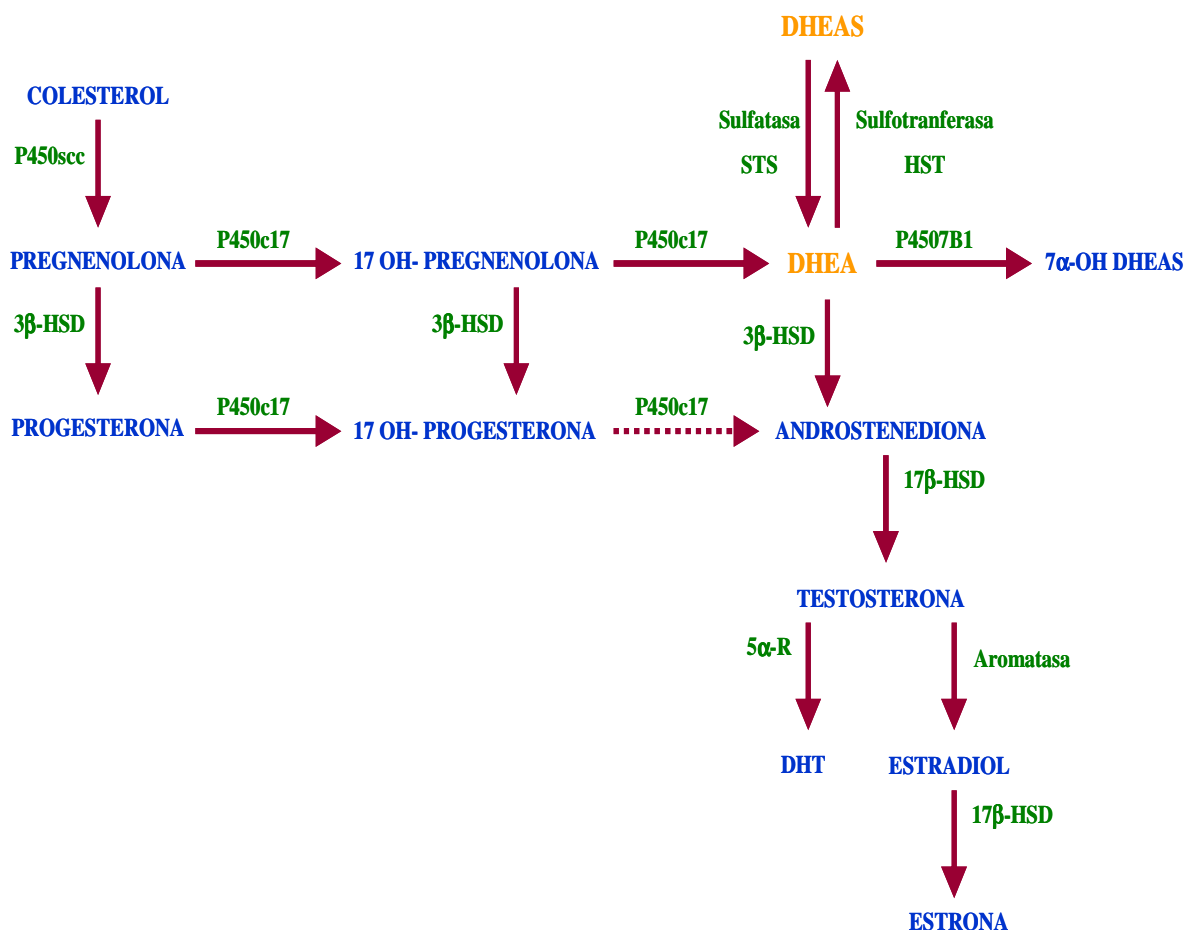
DHEA y DHEAS son los principales metabolitos secretados por la glándula adrenal y representan los esteroides más abundantes en el cuerpo humano (Fig. 8). A pesar de la mayor producción de estos esteroides ocurre en la zona adrenal, también se sintetizan en las gónadas, el cerebro y el tracto gastrointestinal (Robel y cols., 1987; Dalla-Valle y cols., 1995). Se estima que su concentración en suero de hombres y mujeres adultos es 200 a 25,000 veces mayor que la de los esteroides sexuales activos: T4, DHT y E2 (Labrie y cols., 1999).



**Figura. 8. Estructura de la Dehidroepiandrosterona** (PM: 288.424420 g/mol; Formula química:  $C_{19}H_{28}O_2$ ) /**Dehidroepiandrosterona sulfatada** (PM: 368.48762 g/mol; Formula química:  $C_{19}H_{28}O_5S$ ). Estructuras tomadas de PubChem.

DHEA es un esteroide de 19 carbonos que es sintetizado a partir del colesterol por dos enzimas que metabolizan esteroides. La ruta de síntesis de todos los esteroides comienza con la conversión de colesterol en pregnenolona por la enzima mitocondrial que rompe la cadena lateral del colesterol P450 scc. La pregnenolona es convertida a DHEA por la enzima citocromo P450c17; esta enzima cataliza la reacción de  $17\alpha$ -hidroxilación que convierte pregnenolona a 17-OH pregnenolona y de allí a DHEA. La transformación de la DHEA a su éster sulfatado más estable (DHEAS) es catalizado por la enzima

hidroxiesteroide sulfotransferasa y DHEAS puede ser convertida reversiblemente a DHEA por la esteroide sulfatasa (STS) (Fig. 9).



**Figura 9. Síntesis de DHEA y DHEAS.** Como todas las hormonas esteroideas DHEA/DHEAS provienen bioquímicamente del colesterol y es sintetizada en órganos esteroideogénicos primarios, tales como las glándulas adrenales y gónadas, aunque también en cerebro y tracto gastrointestinal. P450scc: citocromo P450 que rompe la cadena lateral del colesterol; P450c17: citocromo P450 con actividad de 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17,20-liasa; 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa; STS: esteroide sulfatasa; HST: hidroxiesteroide sulfotransferasa; 17 $\beta$ -HSD; 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5 $\alpha$ -R: 5 $\alpha$ -reductasa.

La DHEA presenta un patrón característico de secreción, muy similar al de algunas hormonas gonadales. Durante la gestación humana grandes cantidades de DHEA y DHEAS son secretadas por la zona fetal de las glándulas adrenales (Mesiano y Jaffe, 1997). Sin embargo, después del nacimiento las concentraciones de ambas hormonas comienzan a

decaer, hasta declinar completamente en los primeros seis meses de vida. Permanecen de esa manera hasta los seis u ocho años de edad en niños y niñas, es en estas edades cuando se observa que DHEA y DHEAS vuelven a ser sintetizadas y secretadas en la zona reticulada de la corteza adrenal (Havelock y cols., 2004; Parker y Odell, 1980); posteriormente ya en la edad adulta, DHEA comienza a sintetizarse en otros órganos como los ovarios y testículos (Nieschlag y cols., 1973). Los niveles máximos de DHEA y DHEAS se encuentran en la pubertad, seguido por un progresivo declive a lo largo de la vida adulta y disminuyendo completamente en la vejez alrededor de los 70 y 80 años de edad (Orentreich y cols., 1984; Bélanger y cols., 1994, Sulcova y cols., 1997). En hombres, la concentración plasmática de DHEA decrece en un rango de 1 a 4 % anual entre las edades de 40 a 80 años (Muller y cols., 2003), mientras que en mujeres decrece el 2 % cada año (Tannenbaum y cols., 2004).

### **3.1 Mecanismos de acción de DHEA/DHEAS**

La disminución con respecto a la edad en la secreción de la DHEA y DHEAS por la glándula adrenal está asociada con un profundo cambio del estatus hormonal del cuerpo, lo que tiene implicaciones en el desarrollo de varias patologías asociadas con la edad (Orentreich y cols., 1984; Belanger y cols., 1994; Nawata y cols., 2002). Una serie de estudios sugieren que la administración de DHEA en humanos y animales experimentales presenta efectos benéficos en múltiples funciones fisiológicas (Svec y Porter, 1998).

Como se mencionó anteriormente DHEA y DHEAS juega un papel biológico y fisiológico en muchos órganos, sin embargo aun no se conoce por completo el o los mecanismos por los cuales presenta estos efectos. A pesar de que no se ha reportado la existencia de un receptor al cual la DHEA y DHEAS se puedan unir específicamente, como los receptores clásicos descritos para las hormonas esteroideas, evidencia indirecta indica que la DHEA puede interactuar específicamente con receptores no clásicos presentes en el

citósol y el núcleo de linfocitos T de ratón y humanos (Meikle y cols., 1992; Okabe y cols., 1995) y en la superficie de las células endoteliales de la aorta bovina (Liu y Dillon, 2002), a través de los cuales ejercen múltiples efectos. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que algunas de las acciones descritas para la DHEA se deban a su conversión a esteroides más potentes, esteroides sexuales, que activan los AR y ER en los tejidos blanco (por ejemplo: piel, hígado, cerebro, etc.) (Labrie, 2004).

En el sistema nervioso central, se ha reportado que la DHEA tiene efecto en la neuroprotección, favoreciendo el crecimiento de neuritas, promoviendo la neurogénesis y la sobrevivencia neural. Además, se ha observado que la DHEA protege contra los procesos neurodegenerativos asociados con la edad, como el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, y en diversos estudios se ha demostrado que tanto la DHEA como su ester sulfatado (DHEAS) tiene efectos benéficos en la depresión, ansiedad, esquizofrenia y demencia (Maninger y cols., 2009). La DHEA también puede proteger contra algunas neoplasias, especialmente en el cáncer mamario, por su preferencia local a metabolizarse a andrógenos, los cuales se conocen que inhiben la glándula mamaria y el cáncer mamario (Li y cols., 1993; Sourla y cols., 1998; Couillard y cols., 1998). Además, se ha reportado que la DHEA presenta efectos benéficos en otras patologías como la diabetes en donde se ha observado que decrece la resistencia a la insulina, la osteoporosis a través de estimular la formación del hueso (Leblanc y cols., 2002; Nawata y cols., 2002; Robinzon y Cutolo, 1999), y se ha reportado que la DHEA y DHEAS tiene efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores, alterando el balance de citocinas Th1/Th2 (Chen y Parker, 2004; Kalimi y cols., 1994).

Por otro lado en varios tipos celulares se ha observado que la DHEA presenta un efecto anti-proliferativo a través de la inhibición de enzimas esenciales en el metabolismo celular, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-

CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) (Yoshida y cols., 2003). La DHEA es un potente inhibidor competitivo de la enzima G6PDH, la cual es una enzima de la vía de las pentosas fosfato que produce la ribosa 5-fosfato, importante para la síntesis de ácidos nucleicos. Además esta inhibición disminuye los niveles de NADP intracelular, haciendo a la célula susceptible al estrés oxidativo y afectando de esta manera su crecimiento celular (Tain y cols., 1998). El otro mecanismo por el cual la DHEA puede afectar el crecimiento celular involucra la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa. Esta es una enzima involucrada en la síntesis del colesterol, un lípido esteroide, formado por una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, que es vital en los organismos ya que es un componente imprescindible de las membranas. Además, es precursor de hormonas esteroideas, provitaminas y ácidos (o sales) biliares (Fig. 10). También se ha observado que la HMG-CoA reductasa puede activar a la DNA polimerasa (Alonso y Gómez, 1999). Por lo tanto, dada la importancia de esta enzima en la viabilidad celular, su inhibición puede afectar funciones imprescindibles para la sobrevivencia celular. Se ha sugerido que la DHEA puede modular la función de la HMG-CoA reductasa por medio de dos mecanismos: el primero, puede ser a través de la regulación de la expresión de su gen, y el otro, por la inhibición de su actividad a través de la competencia con el sustrato por el sitio activo de la enzima (Pascale y cols., 1995).

Además, como se mencionó anteriormente, la DHEA presenta efectos antiparasitarios contra *Plasmodium spp.*, *Cryptosporidium parvum*, *Trypanosoma cruzi* y *Entamoeba histolytica*, y se sugiere que sus efectos son debidos a su acción directa sobre los parásito protozoarios o a su efecto modulador sobre el sistema inmune del hospedero.



**Figura 10. Metabolitos generados a partir del colesterol.** Imagen tomada de <http://www.laguna.fmedic.unam.mx>

### 3.2 Análogos de DHEA

Debido a las múltiples acciones biológicas y fisiológicas de la DHEA y DHEAS, y a sus efectos benéficos que se han descrito sobre muchas patologías asociadas con la edad, se ha sugerido la utilización de ésta hormona con fines terapéuticos. Sin embargo, el tratamiento de DHEA podría ser contraproducente debido a que se metaboliza a otros productos que en algunas ocasiones podrían tener efectos nocivos en el organismo. Además, existen reportes que indican que la exposición prolongada a DHEA puede llegar a causar cáncer hepático (Mayer y cols., 2003). Por lo consiguiente, actualmente se han diseñado análogos de DHEA, los cuales carecen de actividad androgénica pero preservan otras actividades del esteroide nativo; por lo tanto la evaluación de estos compuestos se está comenzando a realizar. Se ha observado que el tratamiento con el análogo 16-alfa-fluoro-5-androsten-17-ona tiene efectos en la prevención del desarrollo de algunos tumores cancerígenos (Perkins, 1997) y en el desarrollo de la artritis reumatoide favoreciendo un



efecto anti-inflamatorio (Schwartz y Pashko, 2002), además se ha reportado que puede presentar un efecto anti-glucémico en ratones C57BL/KsJ, debido a que reduce marcadamente los niveles de glucosa en sangre (Pashko y Schwartz, 1993). Adicionalmente, se ha demostrado que el tratamiento de este (16-alfa-fluoro-5-androsten-17-ona) y otros análogos (Immunor 28, y 3 beta-hidroxi-16-alfa-fluoro-5-androstan-17-ona) inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (Diallo y cols., 2000; Yang y cols., 1993).

La 16 alfa-bromoepiandrosterona ( $\alpha$ -epi-Br) es otro análogo de la DHEA que también carece de actividad andrónica pero que retiene actividad inmuno moduladora. En infecciones con VIH el tratamiento con  $\alpha$ -epi-Br incrementa la circulación de células inmunes efectoras activadas y la producción de citocinas tipo Th1 disminuyendo la carga viral en humanos y simios (Freilich y cols., 2000). Además, se ha descrito que la  $\alpha$ -epi-Br podría ser importante en el tratamiento del asma crónico, debido a que induce una dramática reducción en la proliferación de células del músculo de la vía aérea, debido a que el tratamiento con este análogo inhibe la unión del factor activador de la proteína-1 (AP-1) al ADN, proceso que es importante para la expresión de genes que median la síntesis de ADN y la progresión del ciclo celular (Dashtaki y cols., 1998). También, este análogo presenta una mayor capacidad para inhibir la transformación de linfocitos humanos inducida por el virus Epstein-Barr (Henderson y cols., 1981). Así mismo, se ha reportado que este análogo tiene una actividad antimalárica contra *P. falciparum* y *P. berghei*, muy similar al efecto descrito para la DHEA y se ha sugerido que el efecto de la  $\alpha$ -epi-Br podría deberse a la inhibición de la enzima G6PDH, debido a que se ha observado que la deficiencia en esta enzima aumenta la opsonización mediada por inmunoglobulinas G y fragmentos del complemento, lo cual conduce a un aumento en la fagocitosis de eritrocitos parasitados (Ayi y cols., 2002; Freilich y cols., 2000).

## IV. JUSTIFICACIÓN

La susceptibilidad de uno u otro sexo a las infecciones parasitarias ha despertado el interés en el estudio del papel que juegan las hormonas sexuales y sus precursores en la relación hospedero-parásito. Las diversas investigaciones con respecto a este tema sugieren que las hormonas podrían estar afectando esta relación de manera directa sobre el parásito o de manera indirecta modulando el sistema inmune del hospedero. En el caso de la infección extraintestinal más común causada por *E. histolytica* existen datos epidemiológicos que sugieren una influencia de las hormonas sexuales en el desarrollo de la infección. Ya que en el absceso hepático amibiano, la infección es más común en adultos que en niños y dentro de los adultos se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres. Debido a que estas variaciones en la susceptibilidad de hombres y mujeres al AHA se asocian al sexo y/o a la edad y éstas a su vez se caracterizan por diferencias y/o cambios hormonales, sugerimos que las hormonas sexuales pueden estar implicadas en las diferencias que se observan en la susceptibilidad a la infección amibiana. Por lo tanto este estudio contribuiría a una mejor comprensión de la compleja red de interacción que se establecen en la relación hospedero-parásito y la participación de estos sistemas en el desenlace de la infección y su probable modulación por el parásito.

Anteriormente describimos que la DHEA inhibe la proliferación y viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*, sin embargo desconocemos el mecanismo por el cual ejerce este efecto. Pero el tratar de entender el o los mecanismo(s) que están implicados en este fenómeno es de suma importancia, debido a los graves problemas de salud pública asociados a esta infección y al desconocimiento que se tiene acerca de la participación de la red neuro-inmuno-endócrina en la modulación de la relación hospedero-parásito. Además la evaluación de nuevos compuestos, como los análogos de la DHEA podría abrir nuevas alternativas para el combate de esta enfermedad.

## V. HIPÓTESIS

Las hormonas sexuales y/o sus precursores afectan la relación amiba-hospedero a través de sus efectos moduladores sobre la respuesta inmune del hospedero y sobre el propio parásito.

## VI. OBJETIVOS

- 1) Evaluar la participación de las hormonas sexuales y análogos de DHEA en el establecimiento, curso y desenlace de la infección hepática por trofozoítos de *E. histolytica* en el modelo de amibiasis experimental en hámsteres.
- 2) Determinar el mecanismo de acción por el cual DHEA afectan la proliferación de los trofozoítos de *E. histolytica*.

### Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la deficiencia de hormonas sexuales en el desarrollo del absceso hepático amibiano.
- Evaluar el efecto de la deficiencia de hormonas sexuales sobre la respuesta inmune asociada a los abscesos hepáticos amibianos.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de análogos de DHEA sobre la proliferación de los trofozoítos y el desarrollo del absceso hepático amibiano.
- Evaluar el efecto de la DHEA sobre la actividad de las enzimas G6PDH y HMGC<sub>o</sub>A reductasa.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Parásitos

Trofozoítos axénicos de la cepa HM1:IMSS se crecieron en medio de cultivo TYI-S-33 estéril suplementado con 15 % de suero bovino adulto (Biofluids), 3 % de la mezcla de vitaminas Diamond's (JRH, Biosciences), 100 UI/ml de penicilina y 100µg/ml de sulfato de estreptomicina a 37 °C bajo condiciones anaerobias.

### 2. Animales

Para la evaluación del efecto de la deficiencia de hormonas sexuales se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) machos y hembras de 6-8 semanas de edad y de aproximadamente 100 g de peso, que se mantuvieron en jaulas de plástico, sin restricciones de agua y comida. Los animales se dividieron en cinco grupos:

- **Dos grupos no infectados:** Intacto y gonadectomizado (Gdx);
- **Tres grupos infectados:** Infectado, falsa gonadectomía (operado sin removimiento de gónadas) e infectado (FGdx+Infectado) y gonadectomizado e infectado (Gdx+Infectado).

El número de animales por cada grupo fue el siguiente: Intacto y Gdx con 20 animales cada uno (10 hembras y 10 machos); infectado y Gdx+Infectado con 80 animales cada uno (40 hembras y 40 machos) y FGdx+Infectado con 28 animales (14 hembras y 14 machos).

### 3. Gonadectomía

Hámsteres machos y hembras se sedaron con Anestesal (pentobarbital sódico) a una dosis de 60 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal, para extraerles los testículos y ovarios a través de un procedimiento quirúrgico bajo condiciones estériles. Una vez gonadectomizados,

los hámsteres se mantuvieron por 2 semanas, para posteriormente ser usados para en la inducción del AHA de manera experimental. En los animales del grupo FGdx+Infectado se realizó el mismo procedimiento quirúrgico pero sin remover las gónadas en ambos sexos. A los animales de los grupos intacto e infectado no se les realizó ningún procedimiento.

#### **4. Determinación de testosterona y estradiol**

Para cada animal muestras de sangre se obtuvieron en tres ocasiones: la primera al comienzo del experimento (antes de la gonadectomía); la segunda, fue antes de la infección (15 días después de la gonadectomía) y la última, se realizó al momento del sacrificio (22 días después de la gonadectomía). Las muestras de suero (0.5 ml) se obtuvieron del seno retro-orbital bajo anestesia. Los niveles de T4 en suero se determinaron utilizando un kit de inmunoensayo enzimático para esta hormona (Diagnostic System Laboratories, Inc. USA) y para la determinación de los niveles de E2 se uso un ensayo de unión a fluorescencia para esta hormona (Biomerieux, Francia).

#### **5. Inducción del AHA**

El AHA se indujo en los hámsteres machos y hembras de los grupos: Infectado, FGdx+Infectado y Gdx+Infectado. Para lo cual trofozoítos en fase de crecimiento logarítmica (72 h) se desprendieron de la pared de las cajas de cultivo por enfriamiento en hielo por 5 min., se contaron en el hematocitómetro y se ajustaron al inóculo adecuado para inducir la infección. Cabe mencionar, que en todos los experimentos descritos en esta tesis se utilizaron amibas que se mantuvieron virulentas al pasarlas de manera continua por hígado de hámster.

Los animales fueron sedados con Anestesal (pentobarbital sódico) a una dosis de 60 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal, posteriormente se rasuraron ventralmente, se les hizo asepsia con alcohol y se les realizó una incisión con bisturí, primero sobre la piel y después

sobre el tejido muscular. Los intestinos se sacaron cuidadosamente de la cavidad peritoneal y una vez expuesta la vena porta, se inyectaron directamente  $5 \times 10^5$  trofozoítos axénicos de la cepa HM-1:IMSS resuspendidos en 100  $\mu$ l de PBS. Inmediatamente después, para evitar una hemorragia y la pérdida de amibas, en el orificio de la inyección se colocó una almohadilla de gel-espuma, una esponja sintética y estéril que es absorbida por el tejido del cuerpo. Finalmente, los intestinos se regresaron a la cavidad peritoneal, la piel se suturó y el área del procedimiento se limpió con peróxido de hidrógeno al 10%. A los 7 días post-infección los animales se sacrificaron y el hígado fue removido y pesado. Las muestras de hígado que contenían abscesos se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS 1X por una hora y se almacenaron en sucrosa al 30% para su posterior análisis histológico.

## **6. Procesamiento del hígado para análisis histológico**

El tejido hepático fijado de todos los grupos se embebió en parafina, a partir de los cuales se realizaron cortes transversales de 20  $\mu$ m con un microtomo. Las laminillas obtenidas se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), una coloración mixta (ácido-base) mediante la cual las estructuras nucleares se tiñen de azul o púrpura oscuro y prácticamente todas las estructuras citoplasmáticas, las sustancias intercelulares y el tejido conectivo, de rosa. Las laminillas se analizaron bajo microscopia de luz para determinar el grado de las lesiones. Se tomaron fotografías de las áreas representativas de cada corte histológico.

## **7. Proliferación de esplenocitos**

El día del sacrificio (7 días post-infección), los bazos de cada animal se extrajeron bajo condiciones estériles, colocándolos en medio RPMI suplementado con 2mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bovino, 200 UI/ml de penicilina y 200 ug/ml de estreptomicina, los esplenocitos se obtuvieron profundiendo el bazo. Las células fueron concentradas por centrifugación, resuspendidas en solución hemolizante durante 5 min a 4 °C y lavadas por centrifugación con medio RPMI. El pellet de esplenocitos se resuspendió en medio RPMI suplementado, las células viables se contaron con la ayuda del hematocitómetro y azul de tripano (tinción vital); se ajustaron para colocar  $5 \times 10^5$  células/pozo en microplacas de 96 pozos de fondo plano con 0.2 ml de medio RPMI suplementado. Cada ensayo se realizó por triplicado con un grupo de pozos a los cuales no se les añadió nada y otro grupo de pozos a los cuales se les adicionó concanavalina A (Con A) a una concentración de 1  $\mu$ g/pozo. Las placas se incubaron por 48 h a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 18 h antes de la cosecha de las células a cada pozo se le adicionó metil-timidina H<sup>3</sup> en una concentración de 1  $\mu$ Ci/pozo en 20  $\mu$ l de medio. Al término de este tiempo, los linfocitos se colectaron sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman GF-A) con un cosechador automático. La cuantificación de la radioactividad incorporada en el DNA celular se realizó inmediatamente después de la adición de líquido de centelleo (PPO-tolueno, 0.4%) por medio del contador  $\beta$ -plate. La proliferación celular inducida se expresó como cuentas por minuto (cpm).

## **8. Inmunohistoquímica y análisis confocal**

La evaluación de la deficiencia de hormonas sexuales sobre la respuesta inmune asociada a los AHA se determinó por medio de inmunohistoquímica en los cortes de hígado de los hámsteres de todos los grupos. Para lo cual las muestras de hígado con abscesos previamente fijadas en paraformaldehído al 4 % por 1 h y almacenadas en sucrosa al 30% a 4°C, se

embebieron en medio para congelación de tejido (Tissue tech, Leica, Nussloch, Germany) y se colocaron en hexano con hielo seco para posteriormente almacenarlas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . De cada muestra se realizaron cortes seriados de  $20\ \mu\text{m}$  de grosor usando un cryomicrotomo. Los cortes se colocaron en un portaobjetos cubierto con poli-L-lisina (Sigma) y las laminillas se secaron al vacío. Al comienzo de la inmunohistoquímica las laminillas se trataron con Tritón X-100 al 1% por 5 min, se lavaron 3 veces con PBS 1X y posteriormente se bloquearon con albúmina (BSA) al 3% por 2 h a temperatura ambiente. Inmediatamente después se incubaron con el anticuerpo primario (anticuerpos anti-ratón para IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-5 y TGF- $\beta$  hechos en conejo; anti-ratón para INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-13 e IL-10 hechos en cabra, y anti-ratón para IL4 hecho en rata (Santa Cruz, Biotechnology, USA) se usaron como anticuerpos primarios) a una dilución 1:1000 en BSA al 1% durante toda la noche a  $4\ ^{\circ}\text{C}$ . Después de lavar 3 veces con PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpos IgG anti-conejo e IgG anti-cabra conjugados con rodamina e IgG anti-rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (ZIMED Laboratories Inc., USA) se usaron como anticuerpos secundarios) diluido 1:500 en BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de este tiempo las laminillas se lavaron 3 veces con PBS y se montaron en medio DAKO para fluorescencia (DAKO, USA). Las secciones de hígado que se procesaron sin el anticuerpo primario se utilizaron como controles negativos.

Para cada grupo, diversas imágenes de los AHA se capturaron usando el microscopio confocal. Imágenes TIFF se adquirieron con el software TCS-SP1 e importaron dentro del programa Imagen Pro Plus para la subsecuente cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Para cada imagen se seleccionaron áreas representativas, y el tiempo de exposición se mantuvo constante, la intensidad de la fluorescencia se cuantificó en un área definida y se expresó como la media de la intensidad de píxeles para cada región. Para cada animal, se evaluaron un mínimo



de seis regiones seleccionadas al azar. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar y se analizaron estadísticamente.

## **9. Tratamiento de trofozoítos con análogos de DHEA**

El registro de las curvas de proliferación para  $\beta$ -AET y  $\alpha$ -epi-Br se realizó colocando  $5 \times 10^4$  trofozoítos/ml en medio de cultivo TYI-S-33 a 37°C, con diferentes concentraciones (0.1, 1, 5, 10, 20 y 50  $\mu$ g/ml) de cada análogo de DHEA. Paralelamente a los cultivos de los grupos experimentales, se crecieron controles tratados con la misma cantidad de vehículo en el que se encontraban disueltos los análogos, la cual nunca excedió del 5% del volumen total. Las cinéticas de crecimiento se evaluaron determinando el número de trofozoítos a las 24, 48 y 72 hrs, por enfriamiento de los tubos en hielo por 5 min y contando los trofozoítos a partir de una alícuota de 100  $\mu$ l en presencia de azul de tripano (tinción vital) bajo el microscopio óptico. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió por lo menos 3 veces. La dosis mínima que afecta la viabilidad de los trofozoítos se determinó a partir de la curva de dosis-respuesta para cada análogo.

## **10. Tratamiento de hámsteres con análogos de DHEA e inducción del AHA**

Para la evaluación de los análogos en el establecimiento del AHA se utilizaron grupos de 15 hámsteres (7 hembras y 8 machos) de 6-8 semanas de edad, los cuales se trataron vía subcutánea con dosis diarias de  $\beta$ -AET y  $\alpha$ -epi-Br a una concentración de 60 mg/Kg de peso, disueltas en 100  $\mu$ l del vehículo. Los grupos control, con igual número de animales, recibieron la misma cantidad de vehículo. A los 5 días de tratamiento, y antes de la administración de la dosis diaria correspondiente, todos los animales se infectaron con trofozoítos virulentos de *E. histolytica*, para la inducción del AHA como se describió previamente. El tratamiento con los análogos se continuó administrando diariamente hasta los 7 días post-infección, momento en el

cual todos los hámsteres se sacrificaron usando exceso de anestesia. El porcentaje de daño se obtuvo dividiendo el peso total del hígado entre el peso de los abscesos. Para el análisis histológico, las muestras del hígado se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se embebieron en parafina y se procesaron para la obtención de cortes. Las secciones del tejido se tiñeron con H&E y se evaluaron bajo microscopia de luz.

## **11. Detección de las enzimas G6PDH y HMGCoA reductasa y su inhibición por DHEA**

Trofozoítos de *E. histolytica* en la fase logarítmica de crecimiento (72 h) se cosecharon enfriándose en hielo y lavándose tres veces por centrifugación a 150 x g por 5 min a 4°C con PBS frío. Un total de  $1 \times 10^8$  parásitos se obtuvieron y resuspendieron en 5 ml de buffer que contenía inhibidores de proteasas (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0, 5 mM DTT y 1 mM PMSF). Para la obtención del extracto clarificado, las células se lisaron por varios ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a temperatura ambiente, y centrifugadas a 39,000 x g durante 20 min. El sobrenadante obtenido se uso inmediatamente para la determinación de la concentración de proteínas (método de Bradford) y la detección de las actividades enzimáticas. La actividad de la HMG-CoA reductasa se determinó a 37 °C por la adición de diferentes concentraciones de extracto clarificado (7.5, 15, 30, 60, 90 y 150 µg/ml) a la mezcla del buffer de reacción [(150 mM Na-fosfato, 75 mM NaCl y 10 mM de ácido acético, MES y TRIS ajustado a pH 6.0), 0.15 mM NADPH, 1 mM EDTA y 10 mM DTT]. La reacción enzimática se inicio agregando diversas concentraciones del sustrato 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA. La oxidación de NADPH por la actividad de la HMG-CoA reductasa se monitoreó a 340 nm en un espectrofotómetro. La oxidación basal de NADPH siempre se resto antes de agregar el sustrato específico. La inhibición de la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa por DHEA se determinó por adición de concentraciones variables (0.025–0.4 mM) de esta hormona

disuelta en etanol. Las reacciones controles se realizaron en presencia del mismo volumen de etanol usado para disolver a la DHEA. La dependencia de pH de la enzima se realizó con el mismo buffer de mezcla ajustando el pH a intervalos de 0.5. La estabilidad de la actividad enzimática no se alteró durante el período del análisis (2-3 minutos) en los pHs bajos y altos. Por su parte, la actividad enzimática de la G6PDH fue determinada a 37°C agregando diferentes concentraciones de extracto amibiano (7.5, 15, 30, 60, 90 y 150 µg/ml) al buffer de reacción que contenía 0.1M Tris-HCl pH 8.1, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1mM NADP<sup>+</sup>. La reacción fue iniciada agregando diversas concentraciones de glucosa-6-fosfato. La producción de NADPH por la G6PDH se determinó a 340 nm en un espectrofotómetro.

## **12. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar. La significancia estadística entre los grupos se determinó por el análisis de variancia (ANOVA 2-vías) seguido por la prueba de Tukey post-hoc. Las diferencias se consideraron significativas a partir de una  $p < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

### 1. Efecto de la deficiencia de hormonas sexuales en el desarrollo del absceso hepático amibiano y sobre la respuesta inmune asociada a los abscesos hepáticos amibianos

#### 1.1 Niveles de hormonas sexuales en hámsteres

La cuantificación de los niveles de E2 en hembras y T4 en machos se realizó en los hámsteres de todos los grupos. En la primera toma obtenida al comienzo del experimento, la determinación de ambas hormonas mostró niveles muy similares a los valores reportados para hámsteres de las mismas edades usados en este experimento (Arteaga-Silva, y col., 2005; Scotti y col., 2007). En la segunda toma de suero realizada quince días después de que se efectuó la gonadectomía, la cuantificación reveló una reducción de los niveles sanguíneos para ambas hormonas en los hámsteres machos y hembras de los grupos gonadectomizado (Gdx) y gonadectomizado e infectado (Gdx+Infectado), indicando que la escisión de ovarios en hembras y testículos en machos se había realizado satisfactoriamente (Tabla 3 y 4). Después de la confirmación de la deficiencia de hormonas sexuales en los grupos a los cuales se les efectuó la gonadectomía, se realizó la inducción del AHA con trofozoítos virulentos de *E. histolytica* en los hámsteres machos y hembras de los grupos Infectado, con Falsa gonadectomía e infectado (FGdx+Infectado) y Gdx+Infectado. Al final del experimento, a los siete días post-infección y antes del sacrificio de todos los hámsteres, se realizó la toma de la última muestra suero. La cuantificación de los niveles hormonales en ese momento, volvió a revelar que los niveles para ambas hormonas continuaban sin ser detectados en los animales de los grupos Gdx y Gdx+Infectado. De manera interesante, la determinación de hormonas en las hembras del grupo infectado mostró una significativa disminución en la concentración de E2 y T4 en suero durante la infección (estradiol de  $25.1 \pm 1.5$  pg/ml a  $11.7 \pm 0.8$  pg/ml y testosterona de  $0.07 \pm 0.01$

ng/ml a  $0.05 \pm 0.01$  ng/ml;  $p < 0.05$  para ambas hormonas). Por el contrario, los hámsteres machos del mismo grupo mostraron un incremento en los niveles de E2 ( $9.5 \pm 0.6$  ng/ml a  $22.7 \pm 0.5$  ng/ml;  $p < 0.05$ ), mientras que la T4 disminuyó drásticamente (de  $1.2 \pm 0.2$  ng/ml a  $0.02 \pm 0.03$  ng/ml;  $p < 0.05$ ). Por otro lado, la cuantificación en los hámsteres hembras y machos del grupo intacto mostró que los niveles para ambas hormonas permanecieron constantes a lo largo del experimento (Tabla 3 y 4).

**Tabla 3.** Concentraciones de estradiol en suero de hámsteres de los diferentes grupos (pg/ml)

Toma	I Inicio del experimento (Gonadectomía)		II Infección con $5 \times 10^5$ trofozoítos		III Sacrificio	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Intacto	$24.8 \pm 1.8$	$9.6 \pm 0.4$	$23.1 \pm 1.2$	$9.5 \pm 0.3$	$25.1 \pm 1.5$	$9.5 \pm 0.6$
Gdx	$24.1 \pm 1.6$	$9.6 \pm 0.4$	$1.1 \pm 0.3$	$10.4 \pm 0.5$	ND	$10.6 \pm 0.2$
Infectado	$24.3 \pm 1.1$	$9.6 \pm 0.2$	$25.0 \pm 1.6$	$9.6 \pm 0.4$	$11.7 \pm 0.8^a$	$22.7 \pm 0.5^b$
Gdx+Infectado	$24.2 \pm 0.7$	$9.5 \pm 0.3$	ND	$10.2 \pm 0.2$	ND	$9.5 \pm 0.7$

Datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar.

Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) son observadas en la concentración de estradiol en suero de hembras<sup>a</sup> y machos<sup>b</sup>.

ND- No detectable.

**Tabla 4.** Concentraciones de testosterona en suero de hámsteres de los diferentes grupos (ng/ml)

Toma	I Inicio del experimento (Gonadectomía)		II Infección con 5 X 10 <sup>5</sup> trofozoítos		III Sacrificio	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Intacto	0.07 ± 0.01	1.3 ± 0.2	0.07 ± 0.01	1.1 ± 0.2	0.07 ± 0.01	1.2 ± 0.2
Gdx	0.05 ± 0.02	1.3 ± 0.3	0.09 ± 0.02	ND	0.07 ± 0.01	ND
Infectado	0.06 ± 0.01	1.1 ± 0.1	0.07 ± 0.01	1.2 ± 0.3	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.03 <sup>b</sup>
Gdx+Infectado	0.07 ± 0.01	1.2 ± 0.2	0.09 ± 0.01	ND	1.0 ± 0.02	ND

Datos son presentados como la media ± desviación estándar.

Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) son observadas en la concentración de estradiol en suero de machos<sup>b</sup>.

ND- No detectable.

## 1.2 Efecto de la deficiencia de hormonas en el desarrollo del AHA

La inducción de deficiencias hormonales en los hámsteres hembras y machos del grupo Gdx+infectado resultó en una marcada reducción en el número y tamaño de los abscesos que se encontraron en el hígado al momento del sacrificio (7 días post-infección). Además, se observó que solamente 34 hembras y 19 machos de los 80 hámsteres (40 hembras y 40 machos) que se infectaron en el grupo Gdx+Infectado llegaron a desarrollar algún absceso hepático, en comparación con los 80 hámsteres del grupo Infectado (40 hembras y 40 machos) y los 28 hámsteres del grupo FGdx+Infectado (14 hembras y 14 machos) que llegaron a desarrollar extensos abscesos en todos los animales (Fig. 11 y Tabla 5). Un indicativo del daño en el AHA es el aumento en el tamaño del hígado, producto de la hepatomegalia que se induce durante la infección con este parásito. En este sentido, un análisis más detallado del daño observado en el tejido hepático de los animales que se infectaron, se realizó obteniendo la media de los pesos de los hígados completos y de las zonas en las que se presentaron solamente los abscesos. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los hígados y abscesos entre los hámsteres del grupo Gdx+Infectado con respecto a los hámsteres de los grupos Infectado y FGdx+Infectado (Tabla 5). Además, se observaron diferencias en el daño al tejido hepático entre los sexos del grupo Gdx+Infectado (32.8% del hígado en machos y 45.3% del hígado en hembras presentaron daño), mientras que el número y tamaño de los abscesos en los hígados del grupo Infectado fueron muy similares en ambos sexos (82.8% del hígado en machos y 80% del hígado en hembras presentaron daño). De gran interés, es además destacar que la extensión del daño en el tejido hepático fue siempre menor en los hámsteres machos del grupo Gdx+Infectado en comparación con los hámsteres de los demás grupos infectados que se evaluaron (Tabla 5).

Por otro lado, el análisis histológico de las zonas que presentaron abscesos en los animales del grupo Infectado mostró una clara pérdida de la estructura del tejido hepático, con lisis

celular extensa, asociado con un intenso infiltrado inflamatorio, representado principalmente por neutrófilos, PMN, macrófagos y linfocitos T. Además, se observaron escasos trofozoítos diseminados a lo largo de los abscesos, como se ha reportado en otras ocasiones (Fig. 12 A y B). En comparación, los animales del grupo Gdx+Infectado mostraron una disminución en las lesiones hepáticas, con poca destrucción celular e infiltrado inflamatorio moderado, principalmente de PMN y linfocitos T. Además, se observó que en este grupo los trofozoítos se encontraban formando cúmulos, de 3 a 4 células en hembras y de 20 a más células en machos, y estas agrupaciones celulares a su vez estaban rodeadas por el infiltrado inflamatorio (Fig. 12 C y D). En los cortes también se logró observar que el daño del tejido hepático siempre fue menor en los machos del grupo Gdx+Infectado en comparación con los hámsteres de los otros grupos. Debido, a que los machos gonadectomizados e infectados (gdx+Infectado) fueron en todo momento los que presentaron menor desarrollo del AHA, estos datos sugieren que los andrógenos podrían estar involucrados en el establecimiento de la infección y el daño del tejido durante la colonización del hígado por *E. histolytica* en hámsteres. En el caso de los hámsteres de los grupos que no fueron infectados (Intacto y Gdx) se observaron pesos similares y la apariencia macroscópica e histológica del hígado fue muy semejante (datos no mostrados).



**Tabla 5.** Comparación de los pesos de los hígados y abscesos entre los hámsteres intactos y gonadectomizados

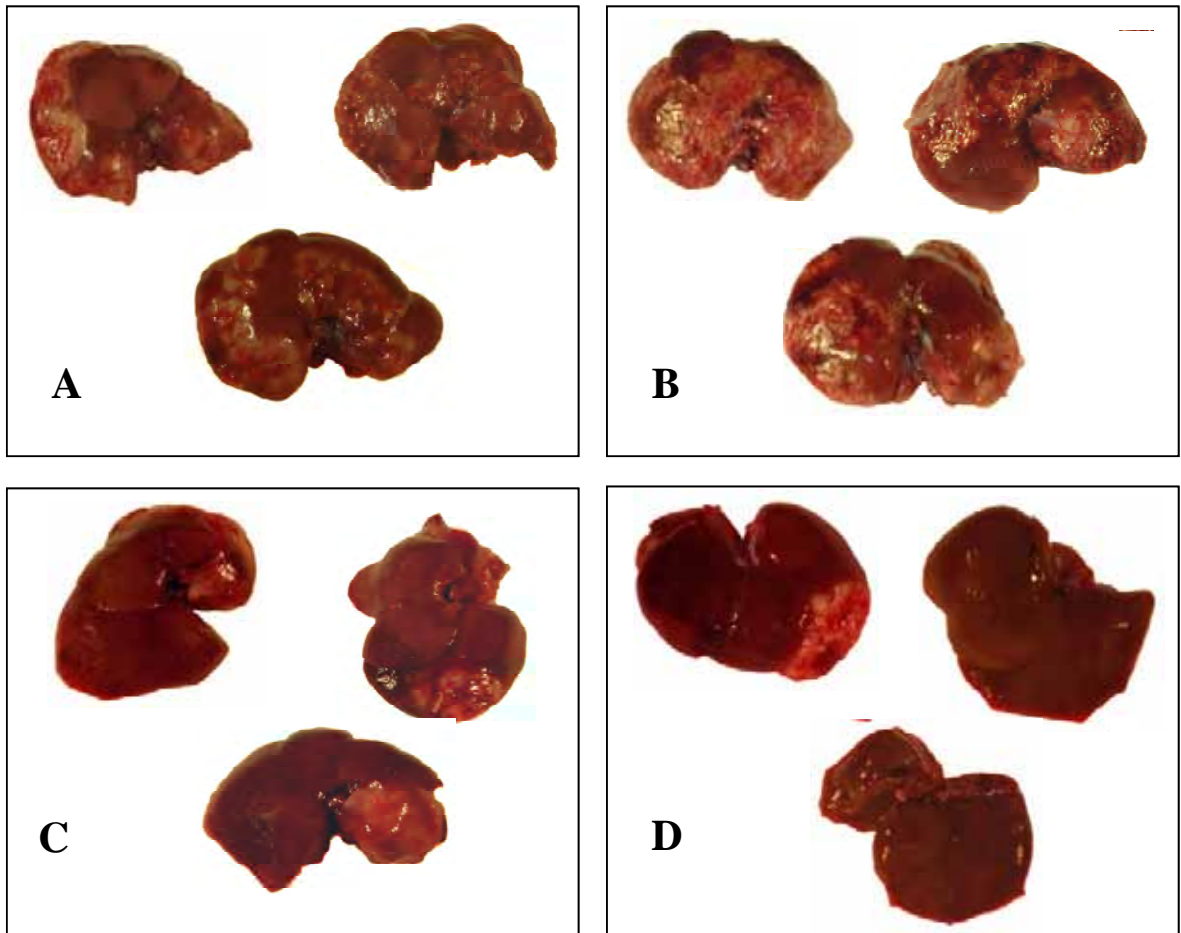
GRUPO	AHA		HÍGADO				Porcentaje %	
			Peso hígado (g) <sup>a</sup>		Peso abscesos (g) <sup>a</sup>			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<b>Intacto<sup>b</sup></b>	NA	NA	4.5 ± 0.5	5 ± 0.4	NA	NA	NA	NA
<b>Gdx<sup>b</sup></b>	NA	NA	4 ± 0.3	4.1 ± 0.3	NA	NA	NA	NA
<b>FGdx+Infectado</b>	14/14	14/14	12.8 ± 0.4	10.9 ± 0.6	10.8 ± 0.2	8.3 ± 0.7	84.3	76.1
<b>Infectado</b>	40/40	40/40	14 ± 2.3	11.1 ± 2.5	11.6 ± 2.7	8.9 ± 1.6	82.8	80
<b>Gdx+Infectado</b>	19/40	34/40	7 ± 1.2*	8.6 ± 1.6*	2.3 ± 1.8*	3.9 ± 1.3*	32.8	45.3

<sup>a</sup> Los datos son presentados como la media ± desviación estándar.

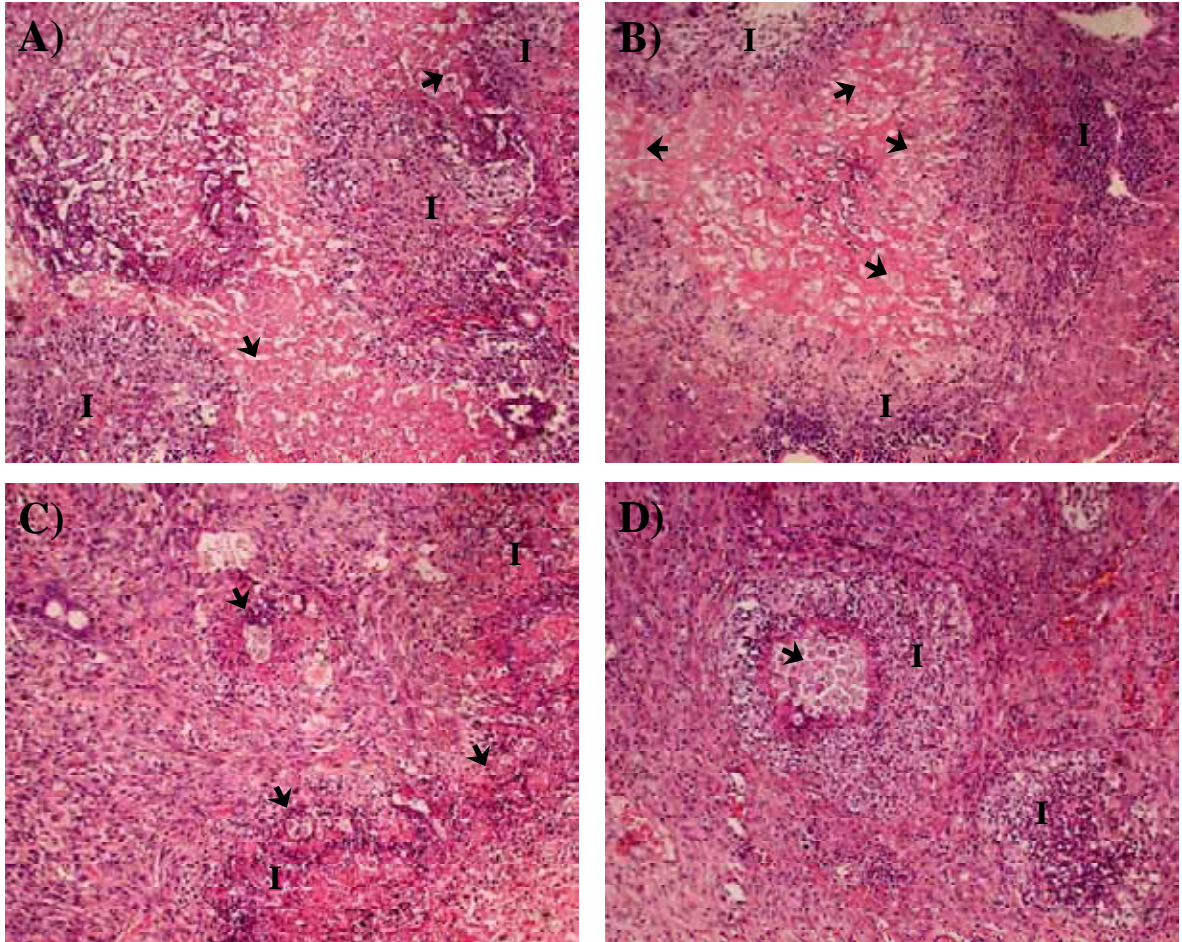
<sup>b</sup> El peso de los hígados de los hámsteres de los grupos no infectados, intacto y Gdx, son mostrados para la comparación con la hepatomegalia desarrollada en el AHA de los grupos que se infectaron (alrededor de 3 veces más el peso).

\* Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) son observadas en el peso de los hígados y abscesos de los animales Gdx+Infectados con respecto a su contraparte de género del grupo infectado.

NA= No aplica



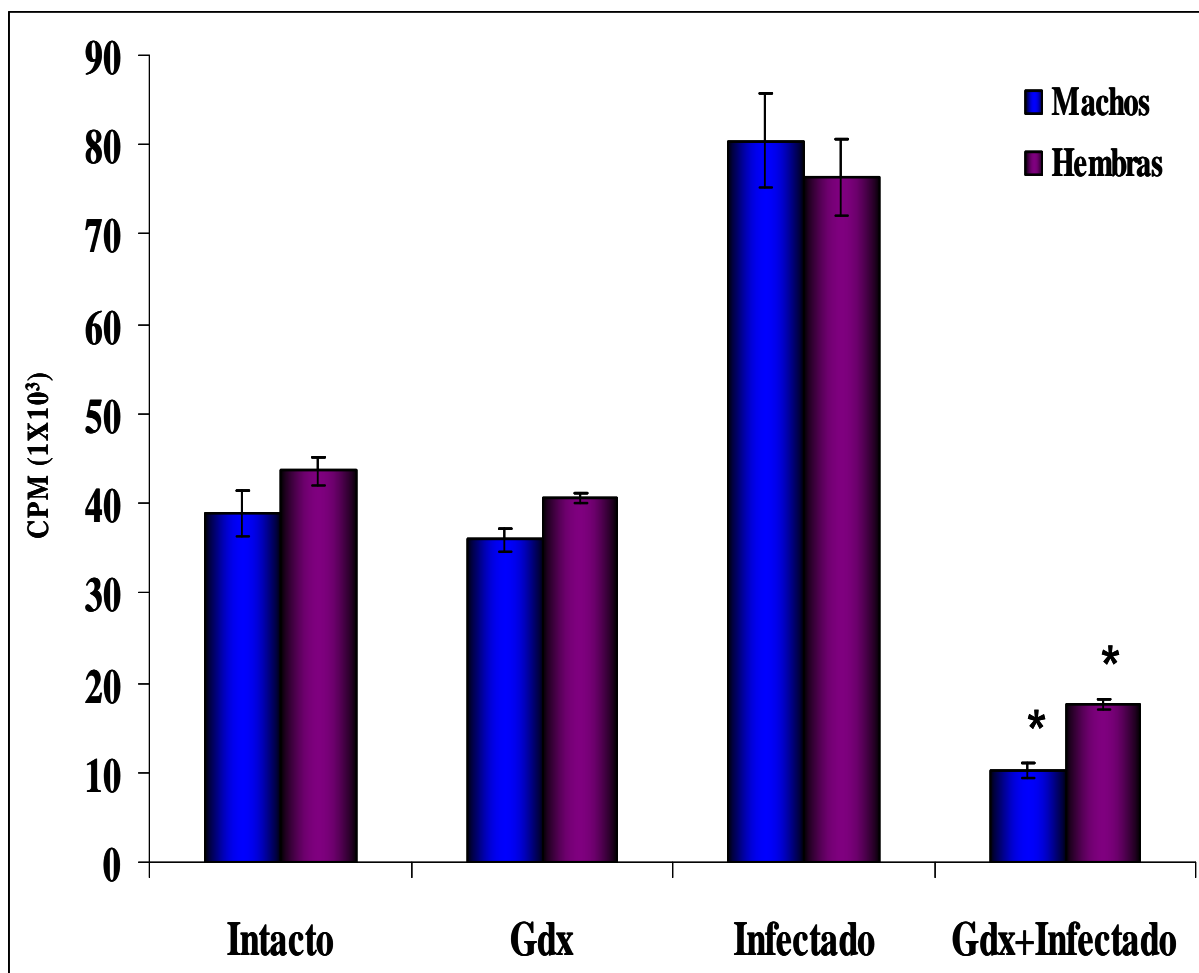
**Figura 11.** Aspecto macroscópico de los hígados de los hámsteres con y sin gonadectomía e infectados con trofozoítos de *E. histolytica* Se observan múltiples abscesos en la mayor parte del hígado de los hámsteres hembras (A) y machos (B) del grupo Infectado. En contraste, en el grupo Gdx+Infectado se observan pocos y pequeños abscesos en hembras (C) mientras que abscesos muy reducidos o ausentes son observados en machos (D).



**Figura 12.** Cortes histológicos de abscesos en hígados de hámsteres con y sin gonadectomía e infectados con trofozoítos de *E. histolytica*. Se observa una gran destrucción del tejido hepático, con abundante infiltrado inflamatorio y con pocos y dispersos trofozoítos en hembras (A) y machos (B) del grupo Infectado. Por el contrario, poca lisis celular, con moderada infiltración celular y grupos de 3 o 4 trofozoítos en hembras (C) y de 20 o más trofozoítos en machos (D) se observaron en los animales del grupo Gdx+Infectado. Infiltrado inflamatorio (I), trofozoítos (flechas).

### **1.3 Efecto de la deficiencia de hormonas en la proliferación celular durante el AHA.**

Tratando de averiguar si la respuesta inmune celular del hospedero estaba siendo afectada por la deficiencia de hormonas, y por consiguiente influir en los efectos mostrados, principalmente el observado en la disminución del infiltrado inflamatorio en los animales que se gonadectomizaron e infectaron, se realizó la determinación de la capacidad de proliferación de las células inmunes de bazo de los hámsteres en presencia de un mitógeno para células T. Los resultados mostraron una marcada reducción en la proliferación de esplenocitos en respuesta a conavalina A (Con A) del 87 % en machos y del 77% en hembras del grupo Gdx+Infectado comparado con los hámsteres del grupo Infectados (Fig. 13), indicando que la gonadectomía induce un estado de inmunosupresión en los animales. Estos resultados son particularmente interesantes debido a la amplia evidencia que sugiere que la respuesta inmune celular es la principal responsable del daño al tejido hepático durante el desarrollo del AHA experimental en hámsteres (Tsutsumi y col., 1984; Olivos-García y col., 2007). Además, de manera relevante dentro del grupos Gdx+Infectados la proliferación de células de bazo fue 40 % más baja en machos que en hembras (Fig. 13). Estos resultados correlacionan bien con la inhibición o con la disminución en el desarrollo del AHA observado en los hígados de los animales machos Gdx+Infectado comparado con las hembras del mismo grupo (Fig.12). En contraste, los animales de los grupos Infectados exhibieron una gran respuesta proliferativa a Con A, sin notables diferencias entre géneros. En el caso de los hámsteres hembras y machos de los grupos no infectados (Intactos y Gdx) se observó una similar proliferación a Con A, indicando que la gonadectomía por sí misma no afecta la respuesta proliferativa de las células de bazo (Fig. 13).



**Figura 13.** Proliferación de esplenocitos en hámsteres con y sin gonadectomía. Los esplenocitos se incubaron con 1  $\mu$ g ConA y la replicación de DNA se determinó por la incorporación de  $^3$ Htimidina y la proliferación celular inducida se expresó como cuentas por minuto (cpm). Se observa una marcada inhibición en la proliferación de células T en machos y hembras del grupo Gdx+Infectado comparado con las respuestas de los otros grupos, siendo esta inhibición significativamente (\* $p < 0.05$ ) más baja en los hámsteres machos que en las hembras. La proliferación celular de los hámsteres machos y hembras del grupo Gdx fue similar a las hembras y machos del grupo Intacto en. CPM: Cuentas por minuto.

#### **1.4 Efecto de la gonadectomía sobre la modulación de la expresión de citocinas Th1, Th2 y Treg durante el desarrollo del AHA.**

A pesar de que en los hámsteres Gdx+Infectado ocurre una supresión de la respuesta celular, en los cortes histológicos de los abscesos se observan un infiltrado de células inmunes a nivel local. Regularmente el daño en el tejido hepático durante el desarrollo del AHA en hámster se ha relacionado a la presencia de citocinas inflamatorias tipo Th1. Por lo tanto, se evaluó por medio de inmunohistoquímica en cortes de hígado el perfil de citocinas asociado a esta respuesta inmune y a otras que también podrían estar participando (citocinas tipo Th2 y reguladoras). La evaluación de la media de la intensidad de fluorescencia del perfil de citocinas inflamatorias tipo Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) mostró una reducción estadísticamente significativa en la expresión de estas citocinas en los abscesos de los hámsteres hembras y machos del grupo Gdx+Infectado, comparado con la gran expresión observada para todas las citocinas tipo Th1 en los abscesos de hámsteres hembras y machos del grupo Infectado (Tabla 6; Fig. 14). De manera interesante, a pesar de la escasa expresión de citocinas Th1 en el grupo Gdx+Infectado se lograron observar diferencias muy claras entre sexos; las hembras mostraron muy baja pero detectable expresión de todas las citocinas Th1 evaluadas, mientras que en los machos no se detectó la expresión de las citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , en combinación con un decaimiento estadísticamente significativo en la expresión de IL-2 e IL-12 cuando se compara con la expresión observada en las hembras (Tabla 6; Fig. 14). Estos resultados sugieren que la deficiencia de hormonas en hámsteres modifica el ambiente inflamatorio, el cual es propuesto como el responsable de la patología observada durante la infección hepática por *E. histolytica* (Tsutsumi y col., 1984; Olivos-García y col., 2007). Por lo tanto, estos resultados indican que la baja producción de citocinas Th1 en machos se puede asociar con la disminución o completa ausencia de daño en el tejido hepático. Por otro lado, el nivel de expresión de citocinas Th1 observado en los hámsteres Gdx+Infectados fue similar a la

determinada en los animales del grupo Intacto y Gdx, los cuales no fueron infectados (datos no mostrados).

Al igual que con las citocinas inflamatorias se observó una disminución estadísticamente significativa en la media de la intensidad de fluorescencia de las citocinas con perfil anti-inflamatorio tipo Th2 (IL-5, IL-13 y IL-6), con la excepción de la citocina IL-4, en los abscesos de los hámsteres del grupo Gdx+Infectado, en comparación con las medias de fluorescencias de los animales del grupo Infectado que mostraron una gran expresión de citocinas Th2, similar a la expresión de las citocinas Th1 (Tabla 6; Fig. 15). Además, se volvieron a observar diferencias entre las hembras y los machos de los grupos Gdx+Infectado, una disminución en la producción de IL-13, IL-5 y IL-6 se observó en los abscesos de hámsteres machos comparados con las hembras. Con respecto, a los grupos Intacto y Gdx no se observó expresión de citocinas Th2 en los hígados (datos no mostrados).

Notablemente, la ausencia de respuestas tipos Th1 y Th2 en los abscesos de los machos del grupo Gdx+Infectado se asoció con una mayor expresión de citocinas reguladoras, IL-10 y TGF- $\beta$ , comparado con la muy baja expresión de estas citocinas en las hembras del mismo grupo y con la expresión moderada que mostraron para estas citocinas las hembras y machos del grupo Infectado. De manera interesante, en este caso se observaron diferencias entre sexos en la expresión de estas citocinas reguladoras entre machos y hembras de todos los grupos que se infectaron (Tabla 6; Fig. 16). Probablemente, el incremento en la expresión de estas citocinas reguladoras en los machos del grupo Gdx+Infectado previenen la exacerbación de la respuesta inflamatoria, la cual se sugiere que es necesaria para el desarrollo del AHA. En el caso de los hámsteres de los grupos no infectados (Intacto y Gdx) no se observó expresión de citocinas T reguladoras (Treg) (Datos no mostrados).

**Tabla 6.** Expresión de citocinas en los AHA en hámsteres con y sin gonadectomía e infectados con trofozoítos de *E. histolytica*.

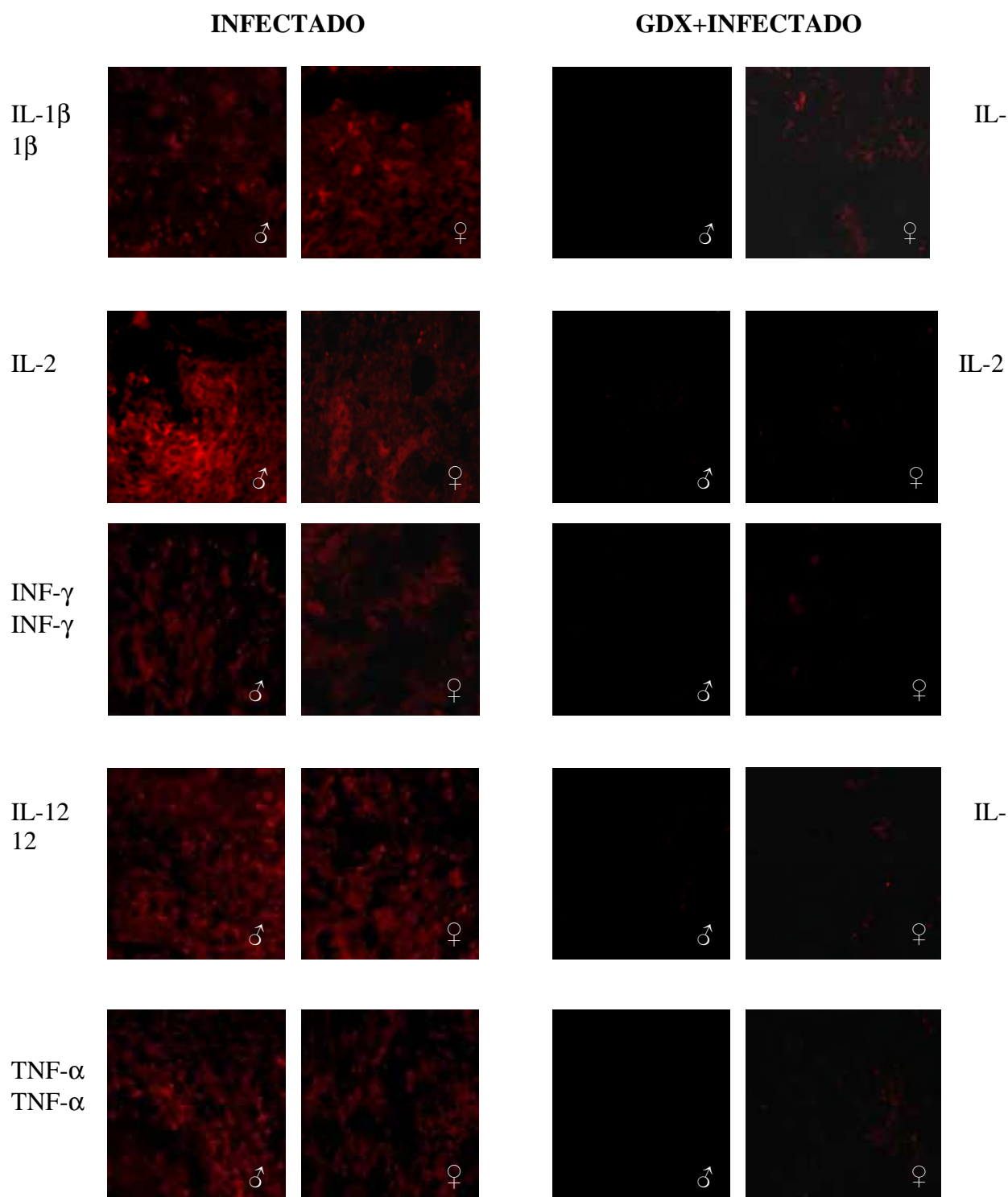
CITOCINAS		GRUPOS			
		Infectado <sup>a</sup>		Gdx+Infectado <sup>a</sup>	
		♂	♀	♂	♀
<b>Th1</b>	IL-1 $\beta$	46.5 $\pm$ 4.1	46.2 $\pm$ 2.7	0 <sup>b,d</sup>	14.9 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
	IL-2	56.2 $\pm$ 4.2	54.6 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.2 <sup>b,e</sup>	3.9 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
	INF- $\gamma$	46.6 $\pm$ 4.1	52.1 $\pm$ 3.3	0 <sup>b,d</sup>	2.3 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
	IL-12	53.4 $\pm$ 3.2	52.5 $\pm$ 3.8	0.2 $\pm$ 0.4 <sup>b,e</sup>	9.4 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>
	TNF- $\alpha$	55.5 $\pm$ 1.8	42.6 $\pm$ 2.8	0 <sup>b,d</sup>	5.6 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
<b>Th2</b>	IL-5	43.7 $\pm$ 2.1	32.8 $\pm$ 3.3	0.5 $\pm$ 0.2 <sup>b,d</sup>	9.0 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
	IL-13	44.0 $\pm$ 3.6	25.0 $\pm$ 3.0	0.6 $\pm$ 0.2 <sup>b,d</sup>	7.8 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
	IL-6	28.4 $\pm$ 1.2	25.7 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	13.4 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>
	IL-4	50.5 $\pm$ 0.6	49.8 $\pm$ 3.3	50.0 $\pm$ 0.7	40.0 $\pm$ 2.1 <sup>c</sup>
<b>Treg</b>	IL-10	8.0 $\pm$ 1.1	32.6 $\pm$ 6.1	58.5 $\pm$ 3.0 <sup>b,d</sup>	5.0 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
	TGF- $\beta$	30.0 $\pm$ 3.0	34.1 $\pm$ 1.5	66.6 $\pm$ 3.1 <sup>b,d</sup>	7.0 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Datos de la intensidad de fluorescencia son expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

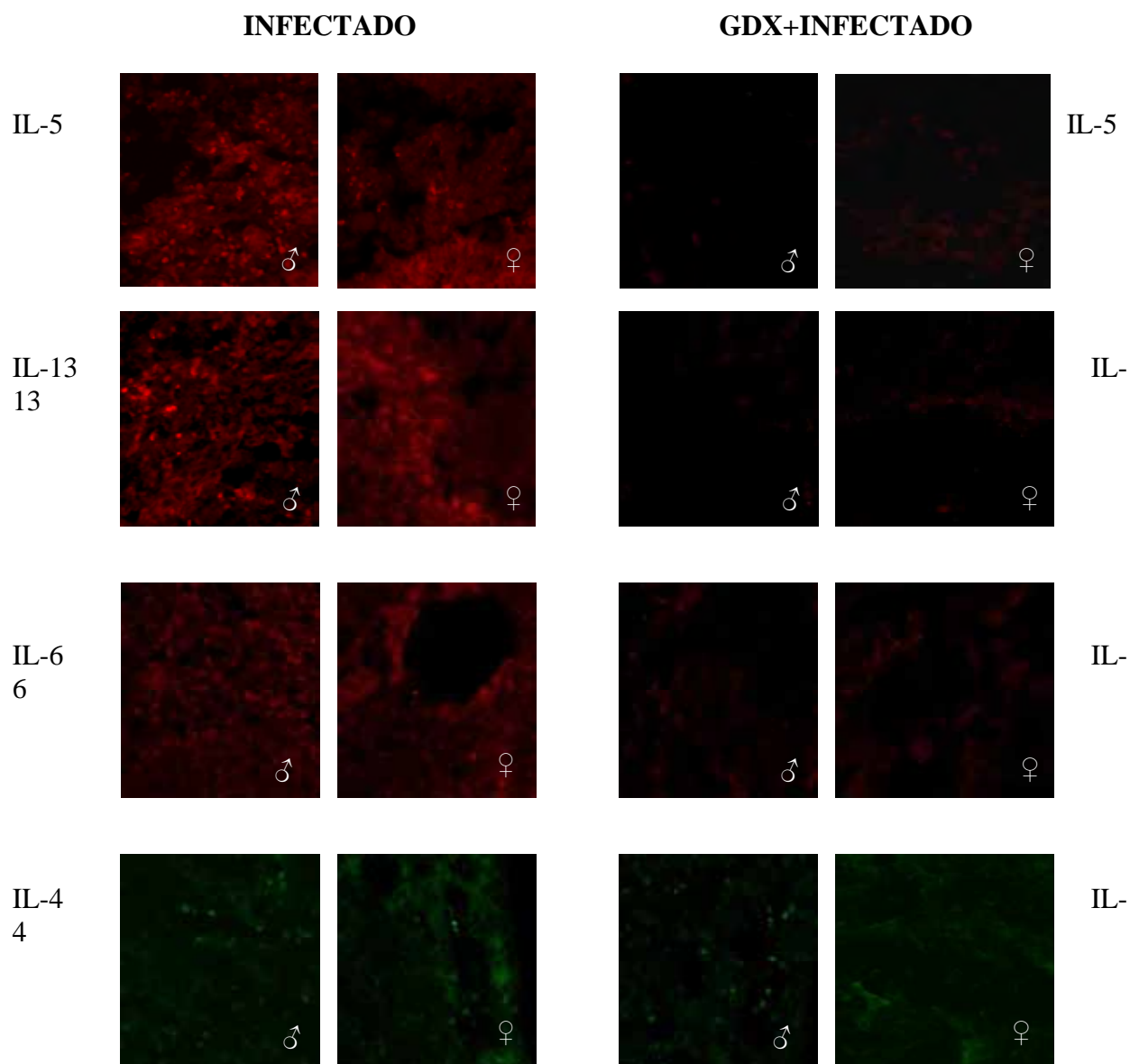
<sup>b</sup>  $p < 0.01$ , <sup>c</sup>  $p < 0.05$  Diferencias estadísticamente significativas son observadas en la intensidad de fluorescencia de citocinas Th1, Th2 y Treg de AHA para hámsteres hembras y machos Gdx+Infectados con respecto a sus contrapartes en genero del grupo infectado.

<sup>d</sup>  $p < 0.01$  <sup>e</sup>  $p < 0.05$  Diferencias estadísticamente significativas son observadas en la media de la intensidad de fluorescencia de citocinas Th1, Th2 y reguladoras en los AHA de los hámsteres machos Gdx+Infectados con respecto a las hembras del mismo grupo.

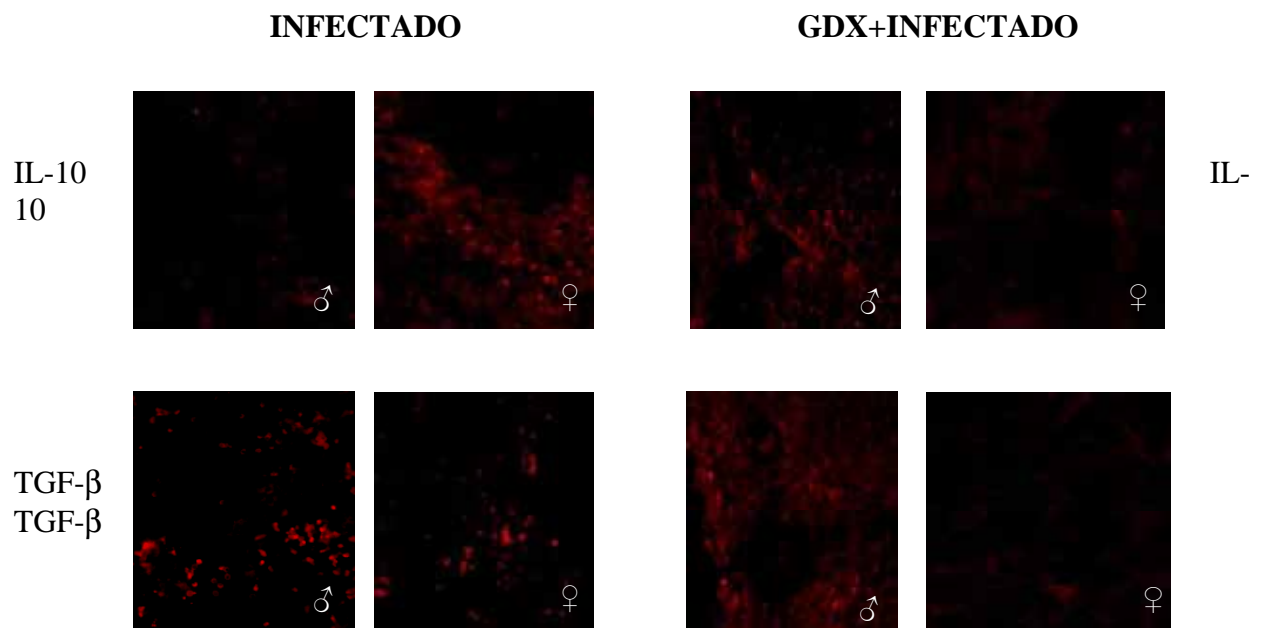




**Figura 14.** Perfil de citocinas tipoTh1 en abscesos de hámsteres con y sin gonadectomía e infectados con trofozoítos de *E. histolytica*. Se observa una disminución en la expresión de estas citocinas en los animales hembras y machos del grupo Gdx+Infectado, con respecto a los hámsteres hembras y machos del grupo Infectado. La determinación se realizó por inmunohistoquímica con anticuerpos contra citocinas de ratón. Magnificación 40X.



**Figura 15.** Perfil de citocinas tipoTh2 en abscesos de hámsteres con y sin gonadectomía e infectados con trofozoítos de *E. histolytica*. Se observa una disminución en la expresión de estas citocinas ( con excepción de IL-4, cuya expresión fue similar en ambos grupos) en los animales hembras y machos del grupo Gdx+Infectado, con respecto a los hámsteres hembras y machos del grupo Infectado. La determinación se realizó por inmunohistoquímica con anticuerpos contra citocinas de ratón. Magnificación 40X.

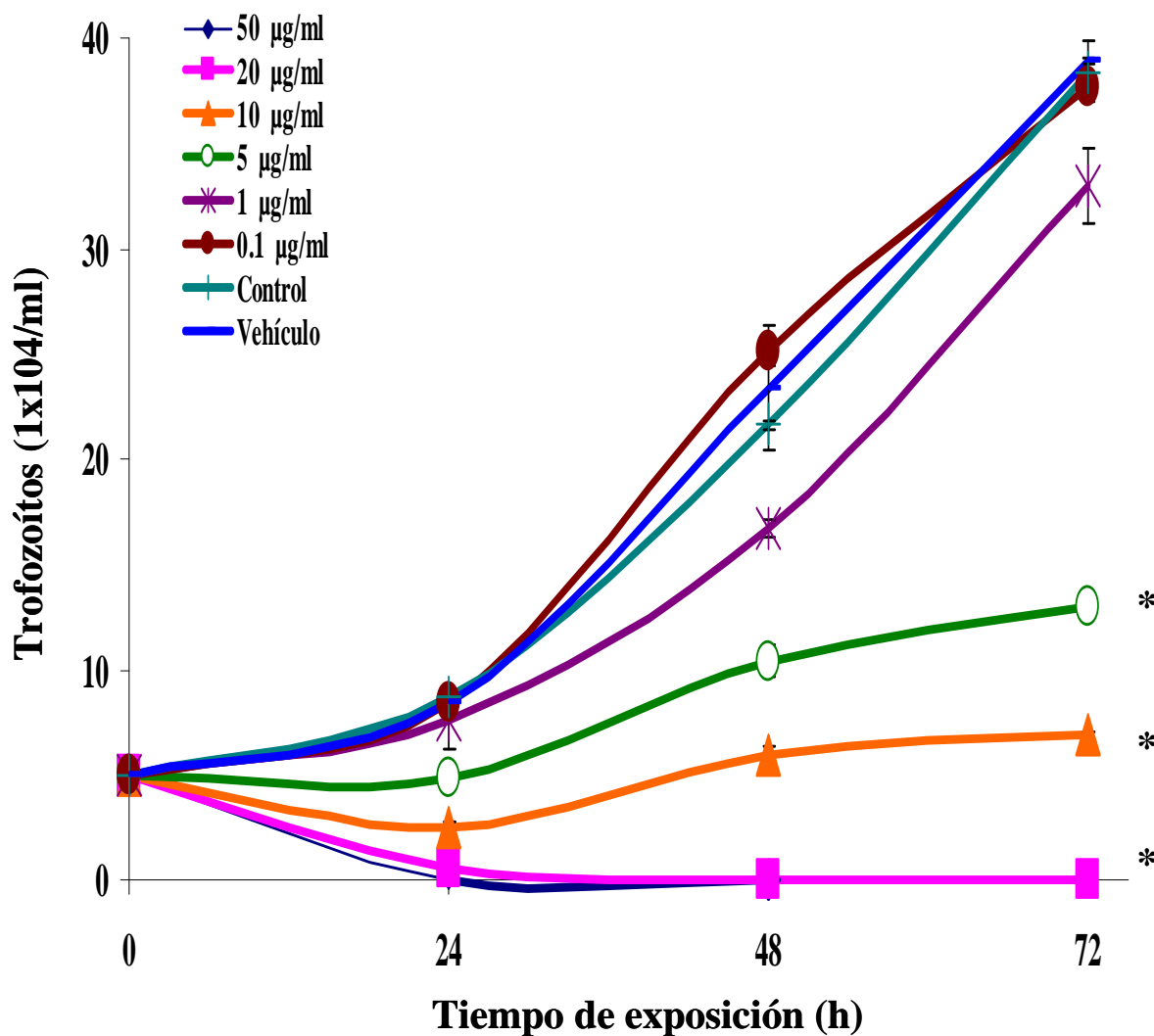


**Figura 16.** Perfil de citocinas reguladoras en abscesos de hámsteres con y sin gonadectomía e infectados con trofozoítos de *E. histolytica*. Se observa una mayor expresión de ambas citocinas se observo en los machos del grupo Gdx+Infectado, con respecto a los hámsteres de los otros gupos. La determinación se realizó por inmunohistoquímica con anticuerpos contra citocinas de ratón. Magnificación 40X.

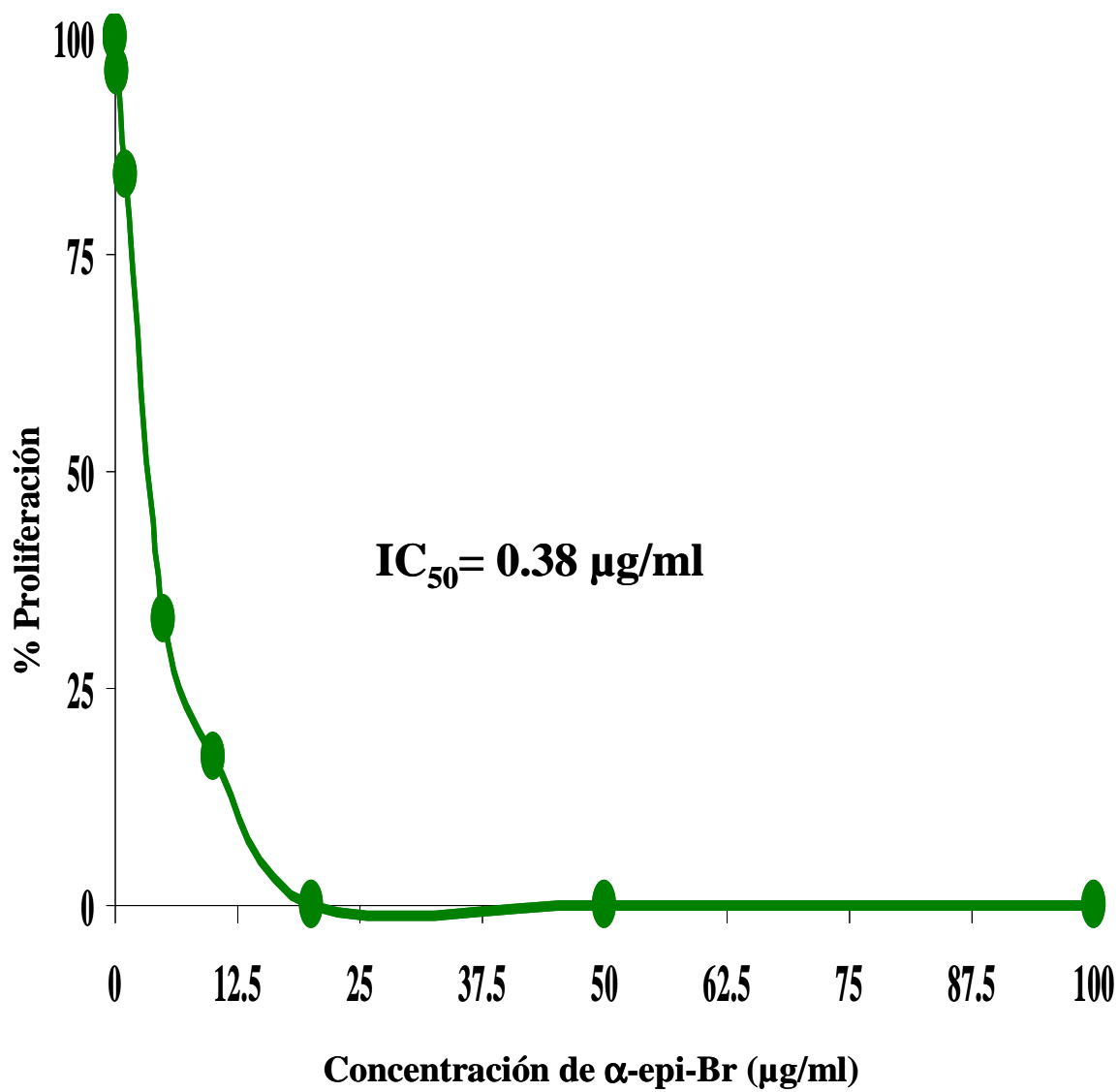
## **2. Efecto de diferentes concentraciones de análogos de DHEA sobre la proliferación de los trofozoítos y el desarrollo del absceso hepático amibiano**

### **2.1 Efecto de los análogos de DHEA sobre la proliferación de *E. histolytica*.**

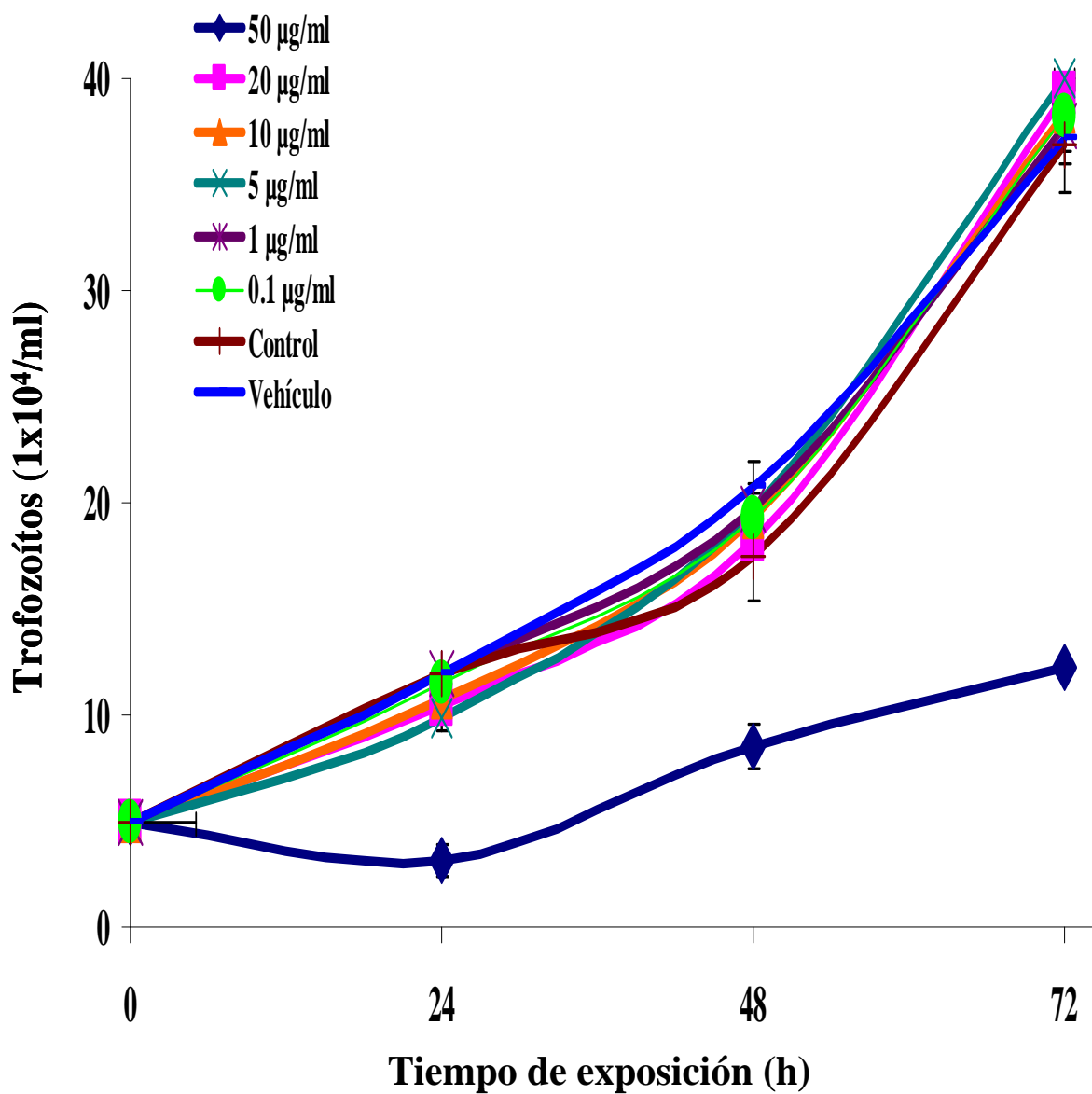
Como mencionamos anteriormente la hormona adrenal DHEA afecta el crecimiento de los trofozoítos de *E. histolytica*. Por lo tanto, se evaluó el efecto de dos análogos de esta hormona sobre la proliferación de los trofozoítos. La evaluación del crecimiento de los trofozoítos se realizó adicionando diferentes dosis (0.1, 1, 5, 10, 20 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) de los análogos  $\beta$ -AET y  $\alpha$ -epi-Br, las cinéticas de crecimiento se registraron cada 24 horas. Los resultados mostraron que el análogo  $\alpha$ -epi-Br inhibió la proliferación de los trofozoítos de manera dosis-dependiente. Aunque, la reducción en la proliferación comenzó a observarse a partir de la dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$ , la inhibición comenzó a ser estadísticamente significativa a partir de la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ). Además, a las concentraciones más altas (20 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) evaluadas se observó una mortalidad del 100 % a las 24 h de exposición (Fig. 17). El valor de  $\text{IC}_{50}$  determinado para la  $\alpha$ -epi-Br fue de 0.38  $\mu\text{g/ml}$ , similar al efecto reportado para la DHEA ( $\text{IC}_{50}$  de 0.3  $\mu\text{g/ml}$ ) (Carrero y cols, 2006) (Fig. 18). Por el contrario, la evaluación de  $\beta$ -AET mostró que este análogo solo afectó la proliferación de los trofozoítos a la concentración más alta (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig.19).



**Figura 17.** Efecto del análogo  $\alpha$ -epi-Br sobre la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica*. Los parásitos se cultivaron en ausencia o en presencia de las diferentes concentraciones del análogo. Se observa que el tratamiento afecta la proliferación a partir de la concentración de 1  $\mu$ g/ml, continuando el efecto de una manera dosis dependiente, similar a lo reportado para DHEA (Carrero y cols., 2006).



**Figura 18.** Determinación de la  $\text{IC}_{50}$  en cultivos de 72h tratados con el análogo  $\alpha$ -epi-Br.



**Figura 19.** Efecto del análogo de DHEA  $\beta$ -AET en la proliferación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Los parásitos se cultivaron en ausencia o en presencia de las diferentes concentraciones del análogo. El resultado mostró que la proliferación de los trofozoítos solamente es afectada por la concentración mas alta (50  $\mu\text{g/ml}$ ) del análogo.

## **2.2 Efecto de los análogos de DHEA, $\beta$ -AET y $\alpha$ -epi-Br, sobre el desarrollo del absceso hepático amibiano.**

La evaluación del efecto de los análogos mostró una reducción estadísticamente significativa en los pesos de los hígados y abscesos en los hámsteres tratados, con respecto a los controles de la infección tratados con los vehículos en los que estaban disueltos los análogos (Tabla 7). Adicionalmente, se observó una inhibición del 100% en el desarrollo del AHA cuando los hámsteres son tratados previamente y durante el desarrollo de la infección con el análogo  $\beta$ -AET, en comparación con los animales que se trataron con el vehículo. La ausencia de abscesos en los animales tratados con este análogo se corroboró a nivel histológico, en los cortes de los hígados en donde sólo se observó tejido hepático sano, sin ningún signo de inflamación ni presencia de amibas (Fig. 20 A, B y C), en comparación con los hígados de los animales controles que se trataron solamente con el vehículo, que presentaron las características típicas del absceso hepático amibiano, como son la pérdida de la estructura del tejido, lisis celular extensa y un severo infiltrado de células inflamatorias con escasos trofozoítos diseminados a lo largo del tejido destruido (Fig. 20 D, E y F). Por su parte, el tratamiento con  $\alpha$ -epi-Br mostró una reducción del 55.1 % en el desarrollo del AHA (Tabla 7). Además, los cortes de los animales tratados con este análogo mostraron pequeños y localizados abscesos, con destrucción del tejido hepático y trofozoítos rodeados por infiltrado inflamatorio, representado principalmente por linfocitos T, PMN y células mononucleares (Fig.21 A, B y C). Al igual que los controles de  $\beta$ -AET, los controles tratados con el vehículo en el cual se disolvió la  $\alpha$ -epi-Br mostraron abscesos de mayor extensión, con lisis celular severa, mayor infiltrado inflamatorio y con algunos trofozoítos diseminados a lo largo del tejido dañado (Fig. 21 D, E y F).



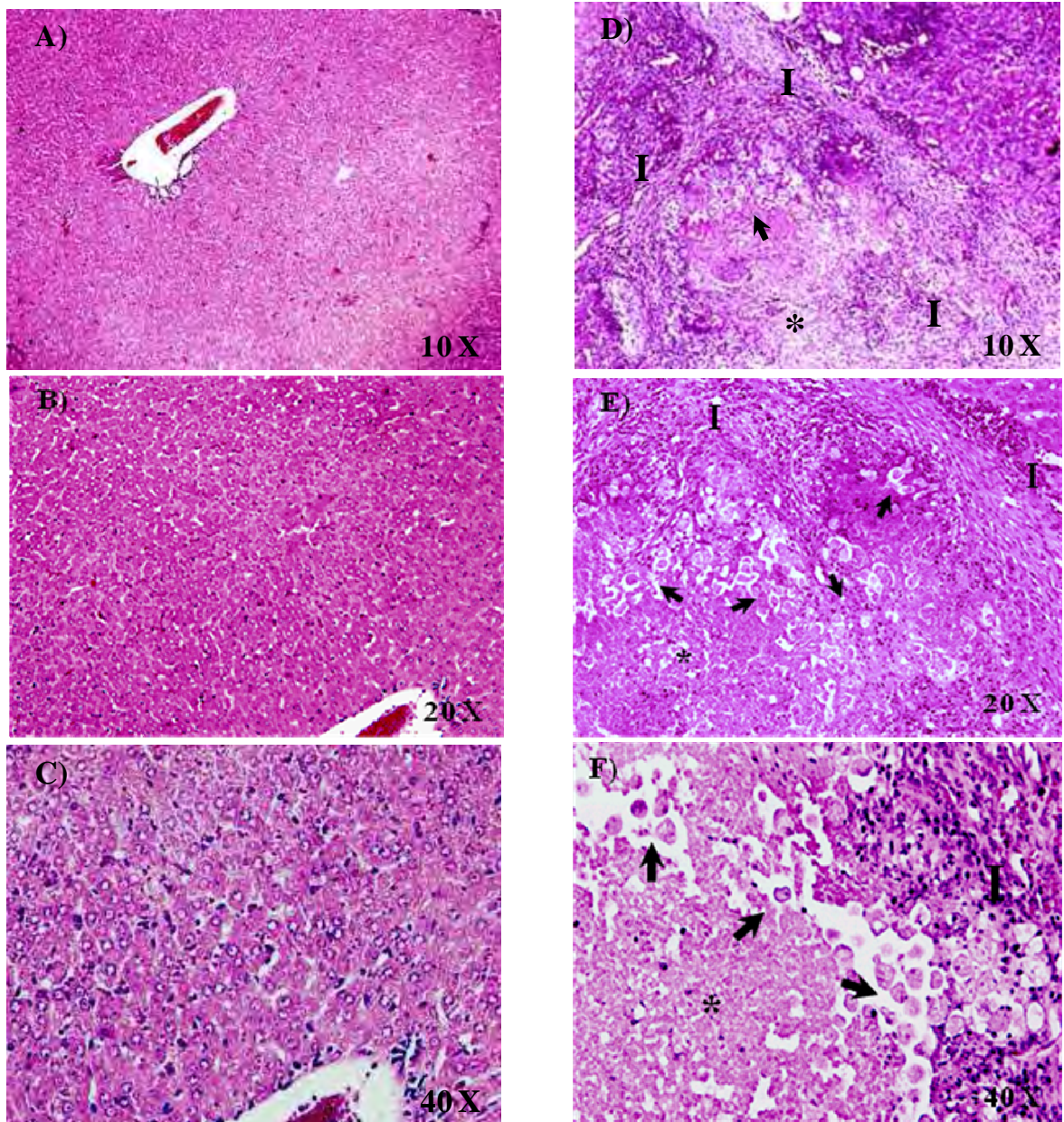
**Tabla 7.** Comparación de los pesos de los hígados y abscesos de hámsteres tratados y no tratados con los análogos de DHEA e infectados con trofozoítos virulentos de *E. histolytica*,

GRUPO	AHA	HÍGADO		
		Peso hígado (g) <sup>a</sup>	Peso abscesos (g) <sup>a</sup>	% AHA/Hígado
Control (Vehículo $\beta$ -AET)	15/15	9.3 $\pm$ 1.6	7.7 $\pm$ 1.4	82.7
$\beta$ -AET (60 mg/Kg)	0/15	3.4 $\pm$ 0.8*	ND	ND
Control (Vehículo $\alpha$ -epi-Br )	15/15	10.7 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 1.7	76.6
$\alpha$ -epi-Br (60 mg/Kg)	12/15	5.9 $\pm$ 1.3*	3.8 $\pm$ 0.5*	64.4

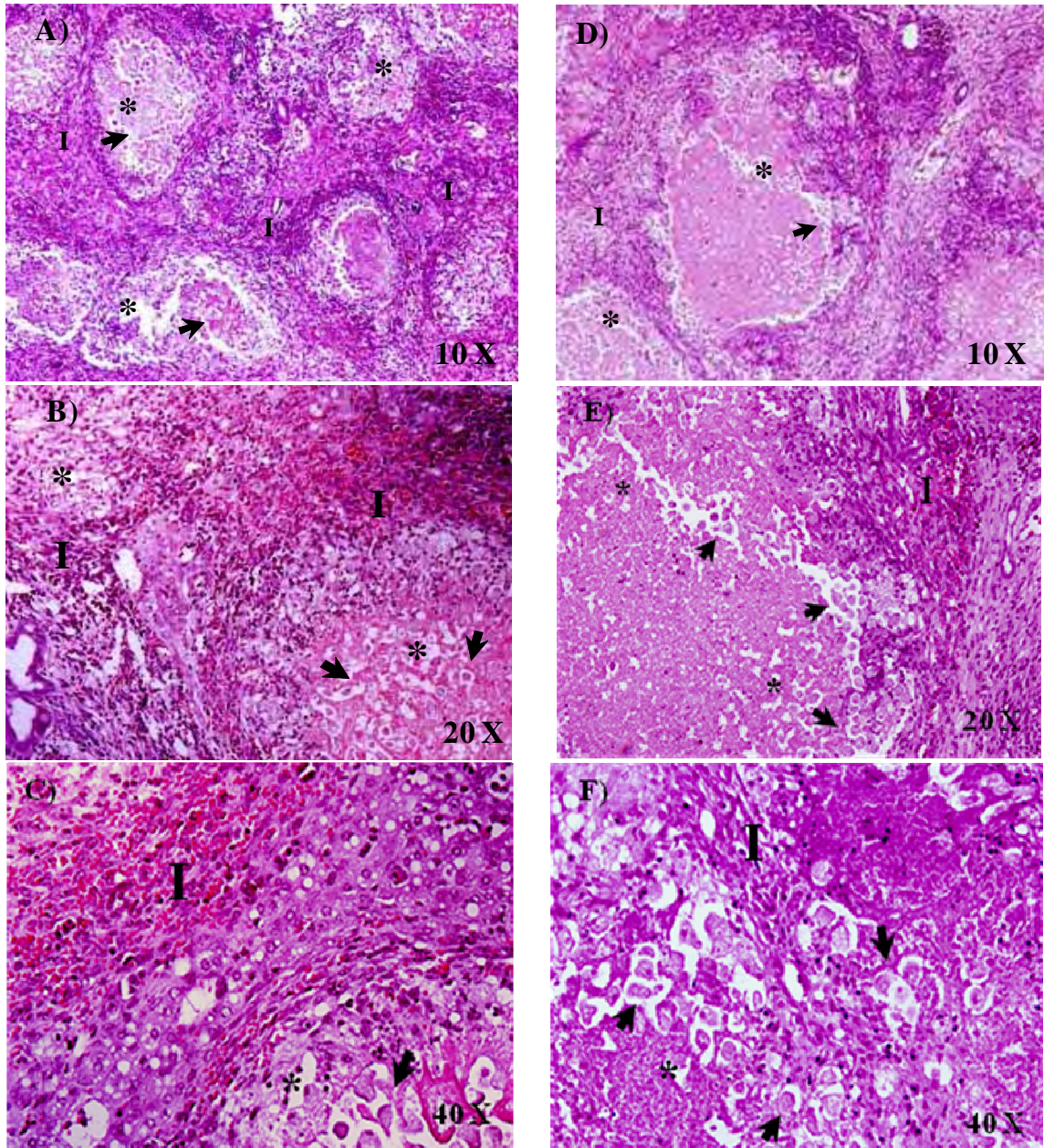
<sup>a</sup> Los datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar.

\* Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) son observadas en el peso de los hígados y abscesos de los animales tratados con  $\beta$ -AET y  $\alpha$ -epi-Br a una concentración de 60 mg/Kg con respecto a los controles tratados solamente con los vehículos en los que están disueltos.

ND= No Desarrollaron AHA



**Figura 20.** Cortes histológicos de tejidos hepáticos de hámsteres tratados con el análogo de DHEA,  $\beta$ -AET e infectados con trofozoítos de *E. histolytica*. A, B y C) Cortes de hígado a diferentes ampliaciones de los animales infectados y tratados con 60mg/Kg de  $\beta$ -AET. Se observa tejido con apariencia normal con ausencia de abscesos, inflamación y amibas. D, E y F) Cortes de hígado a diferentes ampliaciones de animales infectados y tratados sólo con el vehículo del análogo. Los cortes muestran destrucción del tejido hepático con un severo infiltrado inflamatorio. Infiltrado inflamatorio (I), tejido destruido (\*), trofozoítos (flechas).

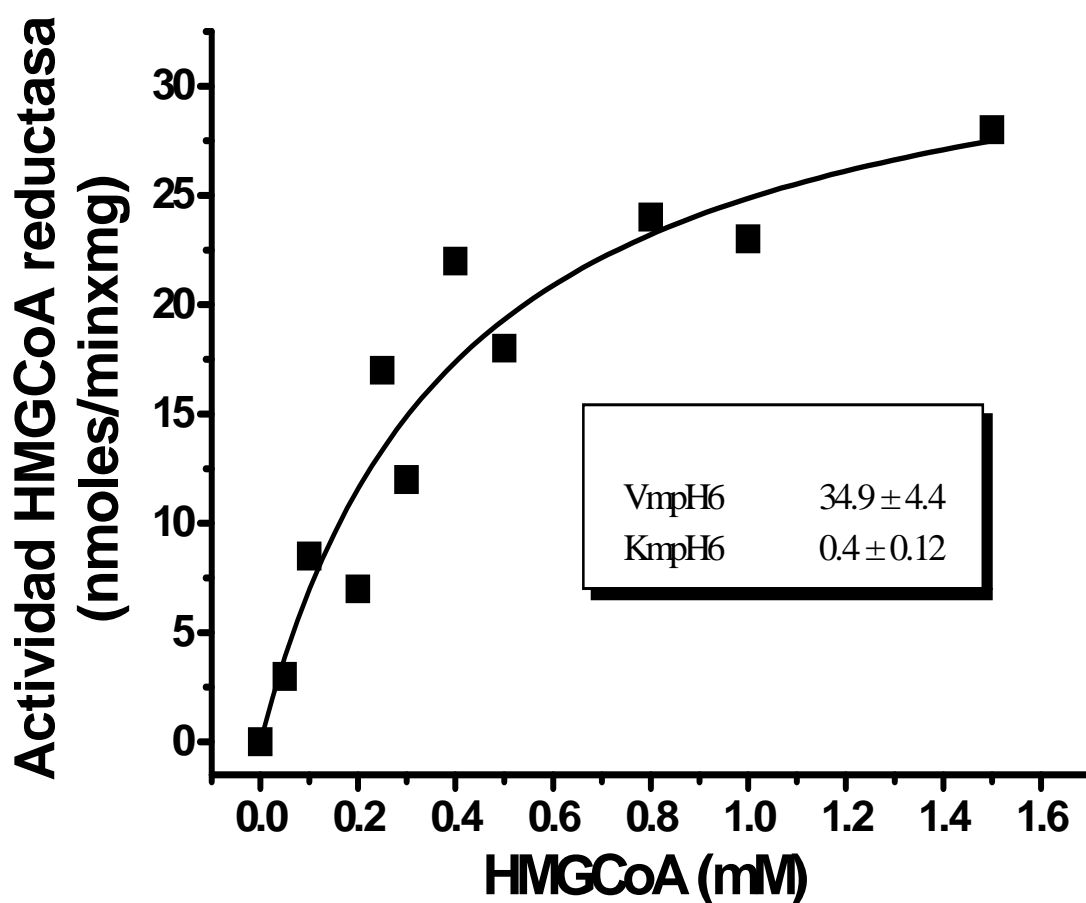


**Figura 21.** Cortes histológicos de tejidos hepáticos de hámsteres tratados con el análogo de DHEA,  $\alpha$ -epi-Br e infectados con trofozoítos de *E. histolytica*. A, B y C) Cortes de hígado a diferentes ampliaciones de animales infectados y tratados con 60mg/Kg de  $\alpha$ -epi-Br. Se observan escasos y pequeños abscesos focales, con clara destrucción del tejido hepático en el sitio del absceso y trofozoítos rodeados por infiltrado inflamatorio D, E y F) Cortes de hígado a diferentes ampliaciones de animales infectados y tratados sólo con el vehículo del análogo. Se observan abundantes y extensos abscesos, con lisis celular severa, infiltrado inflamatorio y algunos trofozoítos diseminados a lo largo del tejido dañado. Infiltrado inflamatorio (I), tejido destruido (\*), trofozoítos (flechas).

### 3. Efecto de la DHEA sobre la actividad de las enzimas G6PDH y HMGC<sub>o</sub>A reductasa

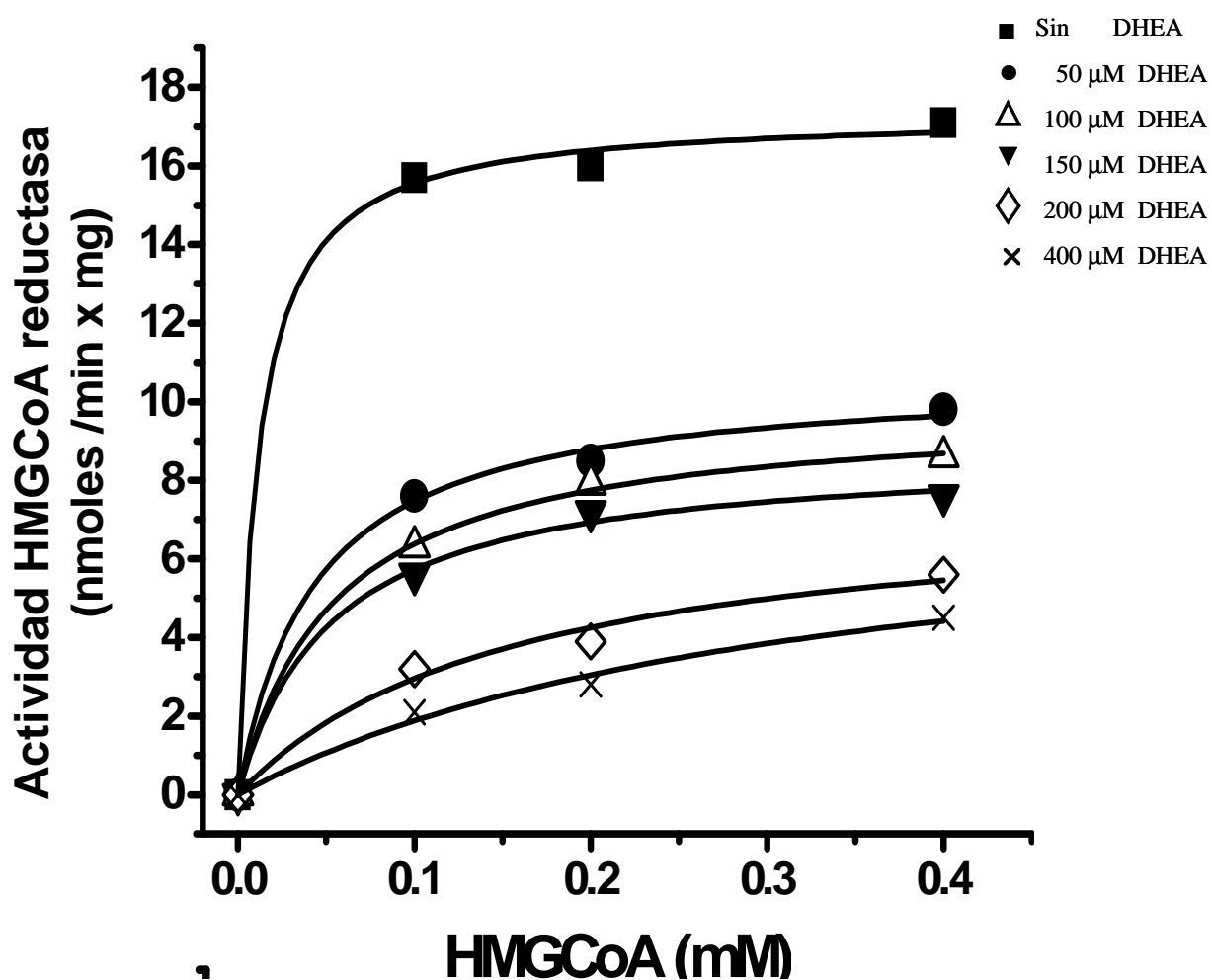
#### 3.1 Caracterización de la cinética de la actividad de la HMGC<sub>o</sub>A reductasa y G6PDH en extractos de *E. histolytica* y su inhibición por DHEA

Se ha reportado que el mecanismo por el cual DHEA afecta la proliferación celular es a través de la inhibición de enzimas importantes en el metabolismo celular. Como previamente reportó Reeves en 1984, no se detectó actividad de la enzima G6PDH en los extractos de trofozoítos, a pesar de que se realizaron diversas variaciones en los estándares de la cinética del ensayo, tales como cambios en el pH, concentraciones bajas y altas de sustrato, o reemplazamiento del cofactor NAD<sup>+</sup> por NADP<sup>+</sup> (datos no mostrados). En contraste, se detectó una consistente actividad tipo HMGC<sub>o</sub>A reductasa en todos los extractos amibianos evaluados por medio de un ensayo espectrofotométrico cinético con condiciones estándar. Esta probable actividad tipo HMGC<sub>o</sub>A reductasa se determinó a 37 °C en extracto clarificado de amibas preparado en fresco con concentraciones saturadas del sustrato HMGC<sub>o</sub>A, exhibiendo rutas de velocidades máximas ( $V_{max}$ ) de  $36.3 \pm 10.4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$  (n=4). El pH óptimo de esta actividad fué entre 6.0 y 7.0 (dato no mostrado). La curva de saturación para la HMGC<sub>o</sub>A mostró una cinética hiperbólica con un valor de  $K_m$  entre 0.4 y 1.0 mM (Fig. 22). Se observó un incremento proporcional en la actividad tipo HMGC<sub>o</sub>A reductasa con cada adición de HMGC<sub>o</sub>A. Sin embargo, la enzima es inhibida a concentraciones de sustrato superiores a 1 mM (dato no mostrado).

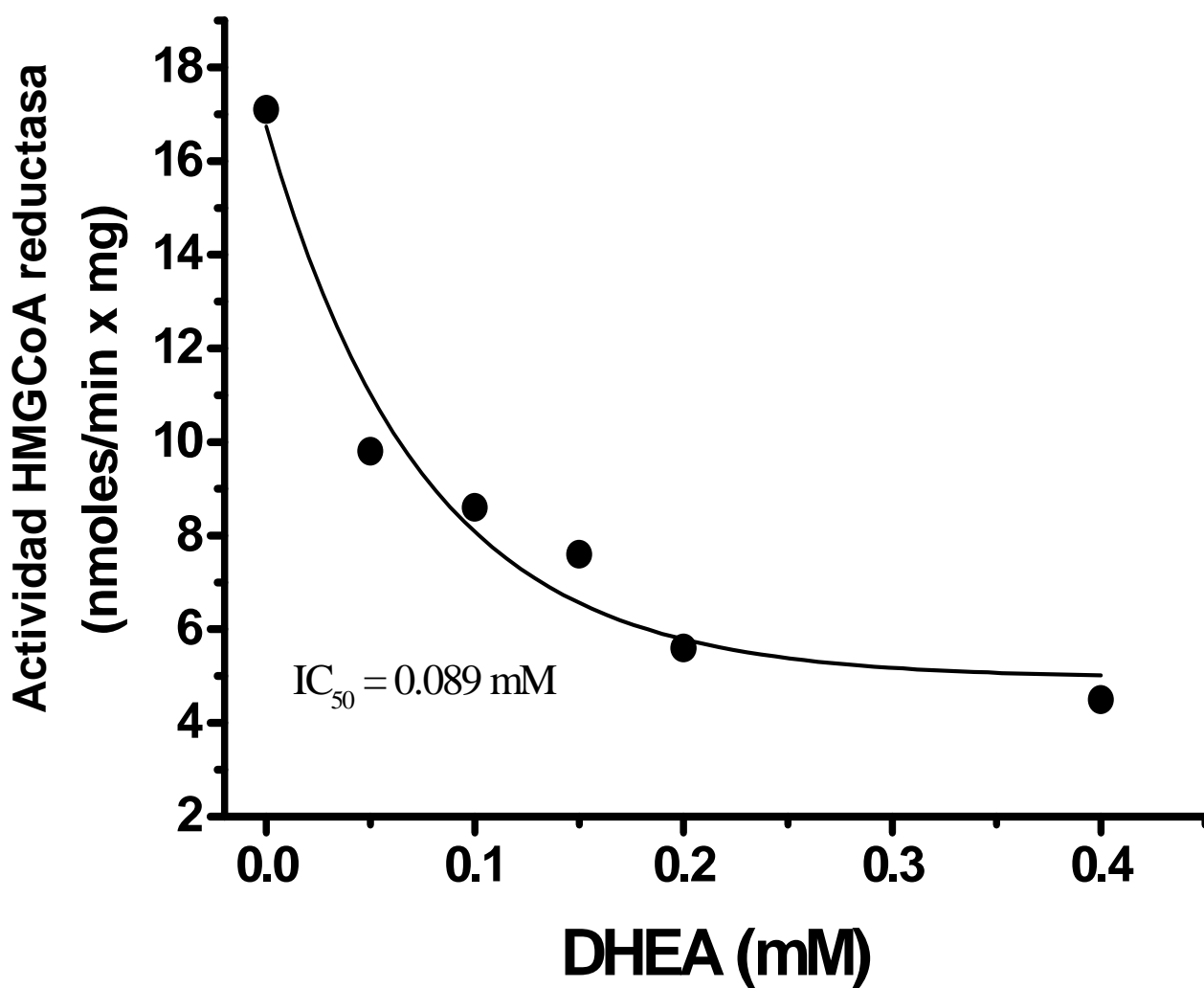


**Figura 22.** Cinética enzimática de la actividad HMGCóA reductasa con una  $K_m$  de 0.4 mM a un pH óptimo de 6

La evaluación del efecto de la DHEA sobre la actividad enzimática de la probable HMGCóA reductasa se realizó adicionando diferentes concentraciones de la DHEA y sustrato (Fig. 23). Gráficos de doble recíproco ( $1/v$  vs  $1/[S]$ ) y Dixon ( $1/v$  vs  $[I]$ ) para este tipo de experimentos indican una inhibición competitiva o tipo-mixta con respecto al HMGCóA de la actividad por DHEA (dato no mostrado). La evaluación del efecto de DHEA a grandes concentraciones de sustrato (0.4 mM) la colocan en una ecuación exponencial de primer orden, mostrando un valor de  $IC_{50}$  de 0.089 mM (Fig. 24). Estos resultados indican que *E. histolytica* presenta una actividad tipo-HMGCóA reductasa la cual es inhibida por concentraciones micromolares de DHEA.



**Figura 23.** Efecto de diferentes concentraciones DHEA sobre la actividad enzimática de la HMGCoA reductasa con adición de diferentes concentraciones de sustrato. La adición de DHEA a diferentes concentraciones, inhibió la actividad de HMGCoA reductasa ambiental de una manera dosis dependiente.



**Figura 24.**  $IC_{50}$  de la inhibición de HMGCoA reductasa por DHEA, con una concentración de sustrato de 4 mM.

## IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La diversa y compleja respuesta inmune hacia *E. histolytica* resulta en un delicado balance entre el hospedero y el parásito. Sin embargo, muchos detalles de esta interacción y de los factores que la influyen no han sido aclarados. Recientemente, se demostró que las interacciones entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino juegan un papel fundamental en el desenlace de las infecciones parasitarias. Un claro ejemplo son las hormonas derivadas del eje HPG que afectan estas relaciones a través de efectos directos sobre el parásito o indirectos sobre la respuesta inmune del hospedero (Klein, 2000).

En la amibiasis extraintestinal existen datos epidemiológicos que sugieren la existencia de una influencia hormonal en el desarrollo de la infección. Se reporta que el AHA es más común en adultos que en niños y dentro de los adultos se presenta siete veces más en hombres que en mujeres (Hughes y Petri, 2000; Blessmann y cols., 2002). Debido a que las variaciones en la susceptibilidad se asocian al sexo y/o a la edad, y éstas a su vez se caracterizan por diferencias y/o cambios hormonales, sugerimos que las hormonas podrían ser las responsables de las diferencias que se observan en la susceptibilidad a la infección amibiana.

Recientemente, se reportó la existencia de dimorfismo sexual en el control del AHA en ratones C57BL/6, debido a diferencias en la producción de citocinas que regulan la respuesta inmune a la infección hepática (Lotter y cols., 2006). Sin embargo, en el modelo experimental en hámsteres estas diferencias no han sido descritas, por lo tanto realizamos la búsqueda de un posible dimorfismo sexual o de probables diferencias con respecto a la edad en el establecimiento del absceso hepático amibiano (AHA) en hámsteres. Para lo cual se utilizaron hámsteres de ambos sexos y de diferentes edades (de 3 a 4 semanas; de 9 a 12 semanas y de 20 a 30 semanas), a los cuales se les varió la cantidad de inóculo utilizado para inducir la infección ( $1 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$ ). En términos generales, el análisis macroscópico de los hígados no mostró diferencias entre machos y hembras en el desarrollo del AHA (datos no



mostrados), probablemente debido a que este modelo es sumamente susceptible y por consiguiente enmascarar el efecto que las hormonas sexuales podrían tener.

Una manera drástica de evaluar la participación de las hormonas sexuales en el desarrollo de la infección extraintestinal en hámsteres, es a través de la inducción de deficiencias hormonales, por medio de la escisión de los ovarios en hembras y de los testículos en machos. En este trabajo se demuestra que la ausencia de estrógenos y andrógenos en hámsteres hembras y machos, respectivamente, resulta en la reducción del AHA. Esto concuerda con observaciones realizadas en otras infecciones parasitarias que muestran que la gonadectomía, influye en la susceptibilidad a las infecciones parasitarias en varios hospederos. Por ejemplo, en las infecciones causadas por *P. chabaudi*, *P. berghei*, *L. major* y *T. cruzi* la castración de ratones machos disminuyó la patología y la mortalidad asociada a la infección, mientras que la gonadectomía de hembras condujo a un incremento en la parasitemia (Krücken y cols., 2005; Cernetich y cols., 2006; Prado y cols., 1998; Prado y cols., 1999; Wunderlich y cols., 1991; Mock y Nacy, 1988). En el caso, de los diversos modelos utilizados para *T. cruzi* se ha observado que los machos presentan mayores niveles de parasitemia y menor sobrevivencia que las hembras (Prado y col., 1998; Prado y col., 1999). Sin embargo, las diferencias entre sexos desaparecen cuando las hembras se gonadectomizan resultando en un incremento en la parasitemia (Prado y cols., 1998; Prado y cols., 1999) y la reconstitución hormonal con E2 y P4 vuelve a disminuir el número de tripomastigotes en sangre a niveles muy similares a los observados en las hembras intactas (Santos y cols., 2007). Estos resultados indican que las hormonas sexuales femeninas, específicamente los estrógenos, juegan un papel fundamental en la resistencia a *T. cruzi*. En contraste, la gonadectomía en los machos induce una disminución en la parasitemia comparado con los animales sin gonadectomía y la reconstitución con T4 regresa la parasitemia a los niveles de los animales intactos, confirmando la influencia de las hormonas masculinas en la susceptibilidad a esta infección (Prado y cols., 1999).

En nuestro caso los resultados obtenidos muestran que la mitad de los machos del grupos Gdx+Infectado no desarrollaron ningún absceso y el desarrollo del AHA en la otra mitad fue considerablemente reducido, sugiriendo que la T4 es un factor que favorece la progresión del AHA. Por lo tanto, estos datos concuerdan con aquellos que demuestran que la T4 esta implicada en la susceptibilidad a las infecciones en parásitos. Sin embargo, en nuestro caso fue de gran interés además observar una significativa disminución en el desarrollo y el tamaño de los abscesos en las hembras Gdx+infectados, en contraste a los muchos modelos que muestran un incremento en la parasitemia y sintomatología cuando a las hembras se gonadectomizan. Demostrando que al menos en el modelo de AHA en hámsteres ambas hormonas, aunque en un grado más alto la testosterona, parecen estar implicadas en el establecimiento y desarrollo de las lesiones en el hígado por *E. histolytica*. Esta observación experimental parece correlacionar con los datos epidemiológicos que reportan una incidencia más alta (7 veces más) de AHA en hombre que en mujeres (Hughes y col., 2000; Lotter y col., 2006). Sin embargo, los experimentos de reconstitución hormonal con estradiol y testosterona en los hámsteres con gonadectomía son necesarios para establecer una relación mecánica entre las hormonas y el desarrollo del AHA (experimentos que actualmente se están realizando en el laboratorio). Ensayos preliminares de la reconstitución hormonal en hámsteres machos y hembras gonadectomizados, mostraron que el tratamiento con testosterona en machos y con estradiol en hembras restablecieron la infección experimental a niveles muy similares a los animales intactos (datos no mostrados). A pesar de estos resultados, no podemos descartar la propuesta de que existe una mayor exposición de los hombres a la infección, que podría ser la responsable de las diferencias entre géneros. Sin embargo, es importante mencionar que la incidencia del AHA todavía sigue siendo muy alta en varones, aunque la exposición de hembras a las fuentes de infección amibianas se han incrementado rápidamente.

Es interesante mencionar que las diferencias entre sexos en el AHA se observaron solamente cuando los animales se gonadectomizaron. Además, este modelo ha sido descrito como altamente susceptible a la infección hepática por la amiba, por lo que es tentador especular que las diferencias entre sexos en los animales normales no se han detectadas, debido a la exacerbación de la respuesta inflamatoria, que enmascara cualquier efecto que podrían tener las hormonas sexuales. En este sentido, existe cada vez mayor evidencia que indica que las hormonas sexuales modulan la función del sistema inmune del hospedero y de este modo, influyen la susceptibilidad o la resistencia a las infecciones parásitas (Bouman y cols., 2005; Grossman, 1989; Sapino y cols., 2003; Roberts y cols., 2001). Se han descrito que las hembras desarrollan respuestas inmunes humorales y celulares más robustas y potencialmente más protectoras a los desafíos antigénicos que sus contrapartes machos. En cambio, los andrógenos en machos se relacionan con respuestas inmunes más agresivas a los estímulos microbianos (Marriott y Huet-Hudson, 2006), indicando que las hormonas sexuales tienen la capacidad de afectar la respuesta inmune celular y humoral. En nuestro caso la deficiencia de hormonas en los hámsteres Gdx+Infectado reguló negativamente la respuesta celular (Fig. 2), este estado inmunosupresivo podría ser el responsable (o contribuir) en la disminución de la inflamación observada en el hígado, y por consiguiente, en la reducción de las lesiones del hígado y la inhibición del desarrollo del AHA en los hámsteres. Esto concuerda con reportes recientes que mencionan que la respuesta inmune celular del hospedero parece fomentar el establecimiento y el desarrollo del absceso amibiano en el hígado de hámster, en vez de desempeñar un papel protector (Olivos-García y cols., 2007; Olivos-García y cols., 2004; Tsutsumi y cols., 1984).

En las secciones histológicas del tejido hepático de los machos Gdx+Infectados se observó que los trofozoítos se encontraban formando agrupaciones delimitadas por tejido fibroso, rodeados por infiltrado inflamatorio. Un arreglo similar es observado cuando los hámsteres se tratan con ciclosporina A, un agente inmunosupresor de linfocitos T, el cual se

reporta que también inhibe el desarrollo del AHA (Olivos-García y col., 2007), sugiriendo que la deficiencia de andrógenos en hámsteres, conduce a un estado inmunosupresivo que favorece la proliferación de trofozoítos en el hígado, pero inhibe su migración y su capacidad invasora. De acuerdo con nuestros resultados, un efecto inmunosupresivo producto de la gonadectomía también se observó en las hembras de *Calomys callosus* infectadas con el aislado “Y” de *T. cruzi*, sin embargo en este caso, la inmunosupresión indujo un aumento en la parasitemia durante el curso de la infección (Prado y col., 1998). El efecto estimulador observado para la T4 en el AHA es controversial, debido a que se reporta que los andrógenos presentan un rol inmunosupresivo como se ha observado en las enfermedades autoinmunes (Malkin y cols., 2003; Cutolo y cols., 2004).

En las infecciones, entre ellas las parasitarias, se conoce que la respuesta inmune del hospedero contra los patógenos es regulada por citocinas, y por lo tanto la polarización de las respuestas tipo Th1/Th2 puede resultar en la protección o en la susceptibilidad a las infecciones (Spellberg y Edwards, 2001). Diversos reportes han descrito que las hormonas sexuales presentan la capacidad de influenciar a todos los tipos celulares de el sistema inmunes innato y adaptativo, y por consiguiente influenciar una gran diversidad de funciones inmunológicas (Lamason y cols., 2006; Roberts y cols., 1996).

Se ha reportado que en la fase aguda del AHA en gerbos, cuando los animales se recuperan de un estado inmunosupresivo, la respuesta Th1 y particularmente la citocina IL-2 parece ser la responsable en la protección observada en este modelo, mientras que las citocinas Th2 (IL-4 y IL-10) parecen asociarse con la susceptibilidad (Kretschmer y López-Osuna, 1990; Campbell y cols., 1999; Campbell y Chadee, 1997). Sin embargo, no hay estudios que demuestren el papel que presentan las respuestas Th1 y Th2 en el AHA, así como el papel de las citocinas reguladoras en la susceptibilidad o en la resistencia a la amibiasis invasora en hámsteres. Por esta razón, en esta tesis mostramos el análisis de un amplio perfil de citocinas

que podrían influenciar el curso de la infección amibiana en el hígado de hámsteres. El análisis semicuantitativo de las imágenes de inmunofluorescencia en los AHA de hámsteres Gdx+infectados, sugieren que la deficiencia de las hormonas sexuales resulta en una polarización de la respuesta hacia el tipo Th2 en hembras y de reguladoras en machos que protegerían al hígado contra el daño causado por la respuesta Th1 que desarrollan las hámsteres hembras y machos de los grupos infectados (Tabla 2). Anteriormente se mencionó un efecto protector de la respuesta Th1 contra el AHA en gerbos, sin embargo este efecto se observó después de 20 post-infección (Tsutsumi y Shibayama, 2006), mientras que en los hámsteres el curso de la infección es más agudo y agresivo (la mayoría de los animales mueren en 1 o 2 semanas) (Tsutsumi y Shibayama, 2006). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la teoría de que en hámsteres una fuerte respuesta Th1 es la responsable de la destrucción del tejido como se reportó en otras ocasiones (Tsutsumi y cols., 1984; Olivos-García y cols., 2007), y además indican que las hormonas sexuales son necesarias para que ocurra esta respuesta tipo Th1 (los hámsteres de ambos sexos del grupo Gdx+Infectado no desarrollaron este tipo de respuesta).

En la amibiasis intestinal se ha mencionado que la presencia de la citocina IL-10 favorece una homeostasis en el epitelio intestinal que previene la adherencia de los trofozoítos y la exacerbación de la respuesta inmune (Sharma y cols., 2005; Haque y cols., 2007; Kasper y Buzoni-Gatel, 2001). Sin embargo, a nivel extraintestinal no se conoce el papel que esta citocina podría tener, en nuestros resultados se sugiere que está citocina presenta un efecto anti-inflamatorio sobre las células del hospedero que resulta en una disminución del reclutamiento de leucocitos al sitio de la infección, indicando un papel protectorio de las células T reguladoras.

Al mismo tiempo no podemos descartar que la deficiencia de hormonas sexuales afecta directamente al parásito. En este sentido, se ha observado que las amibas tienen la capacidad de modular la expresión de moléculas relacionadas con la virulencia sobre todo cuando se encuentra en contacto con componentes del hospedero, entre estos factores podrían estar

incluidas las hormonas. Anteriormente nosotros reportamos el efecto directo de algunas hormonas esteroideas sobre el crecimiento y la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*, describimos que el tratamiento de cultivos con concentraciones variables de DHEA y cortisol, afectaron la proliferación de las células amibianas de una manera dosis-dependiente, DHEA inhibiéndola marcadamente y Cor estimulándola ligeramente. Por su parte, hormonas sexuales como la P4, E2 y DHT no afectaron la proliferación, exceptuando esta última a la concentración más elevada.

El efecto anti-proliferativo de la DHEA sobre *E. histolytica* es de particular interés por tratarse de un parásito que causa serios problemas de salud pública y por que no existen antecedentes del efecto directo de las hormonas sobre la infección amibiana. Debido a que en *Plasmodium spp.* y células tumorales se ha sugerido que el mecanismo anti-proliferativo de la DHEA se debe a la inhibición de enzimas esenciales en el metabolismo celular, como la G6PDH (Leenstra y cols., 2003; Safeukui y cols., 2004) y la HMGC<sub>o</sub>A reductasa (Pascale y cols., 1995; Yoshida y cols., 2003). Se realizó la identificación de ambas enzimas en extracto clarificado de *E. histolytica*, y por primera vez se detecto actividad de la enzima HMGC<sub>o</sub>A reductasa en los trofozoítos amibianos. Por su parte la enzima G6PDH no fue detectada de acuerdo con antecedentes que sugerían su ausencia en la amiba (Reeves, 1984). La adición de DHEA a diferentes concentraciones, inhibió la actividad de la HMGC<sub>o</sub>A reductasa amibiana de una manera dosis dependiente. Estos resultados sugieren que el mecanismo anti-proliferativo *in vitro* de la DHEA sobre los trofozoítos de *E. histolytica* podría ser mediado, al menos en parte, por la inhibición de la actividad HMGC<sub>o</sub>A reductasa, enzima limitante de la síntesis de colesterol, componente imprescindible de la membrana celular; por lo tanto, su inhibición podría llevar a cantidades insuficientes de colesterol necesarias para la duplicación celular y como consecuencia disminución en la proliferación de los trofozoítos amibianos. El

comprender los mecanismos por los que los trofozoítos mueren permitirá contar con nuevas estrategias para combatir esta infección.

Por otra parte, aunque nosotros no logramos identificar una secuencia homologa a las HMGC<sub>o</sub>A reductasas reportadas para otros organismos, en el artículo publicado en el 2005 del proyecto del genoma de *E. histolytica* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>) se reportan genes que codifican para enzimas localizadas por debajo de la HMGC<sub>o</sub>A reductasa en la ruta metabólica de la síntesis de isoprenoides, unidades necesarias para la formación del colesterol (Loftus B y cols., 2005).

En otros parásitos se han identificado receptores específicos para hormonas sexuales, y sea demostrado que tienen la capacidad de regular la expresión de diversas moléculas (de Mendonça y cols., 2000; Escobedo y cols., 2005). La búsqueda de estos receptores en los trofozoítos de *E. histolytica* se realizó a través de ensayos de PCR y RT-PCR usando iniciadores sintéticos derivados de los receptores clásicos de andrógenos y estrógenos; sin embargo, los ensayos no mostraron la amplificación de algún fragmento en el DNA y RNA de *E. histolytica*. De igual manera, la búsqueda por homología de genes en la base de datos de la amiba usando fragmentos conservados o secuencias consenso derivadas de todas las secuencias reportadas para mamíferos de ambos receptores, no permitió ubicar ninguna secuencia homóloga. Por lo anterior, se efectuó una búsqueda más detallada para tratar de identificar al receptor de andrógenos, por medio de un Blast-Psi, el cual permite encontrar las mínimas homologías en las secuencias reportadas de *E. histolytica*. Al igual que la estrategia anterior, no se logró identificar alguna secuencia homóloga. Sin embargo, ensayos de proliferación de trofozoítos amibianos en presencia de flutamida, un compuesto que inhibe la unión del andrógeno a su receptor, mostraron que el tratamiento con 1 y 5 µg/ml durante 2 y 4 h de incubación, revirtieron el efecto anti-proliferativo de la DHEA (usada a las concentraciones inhibitorias previamente

establecidas de 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ), sugiriendo que el efecto de la DHEA sobre los trofozoítos requiere de su unión a un probable receptor presente en los trofozoítos amibianos.

A pesar que no se identificó la presencia de receptores clásicos para hormonas, para DHEA se ha reportado la existencia de receptores no clásicos en citósol y núcleo de linfocitos T de ratón y humanos (Meikle y col., 1992; Okabe y cols., 1995), y en la superficie de las células endoteliales de la aorta bovina (Liu y Benten, 2005). La realización de ensayos preliminares descritos para la identificación de este tipo de receptores, indican la presencia de un receptor no-clásico para la dehidroepiandrosterona (DHEA) en los trofozoítos de *E. histolytica* (datos no mostrados en esta tesis). Actualmente se están efectuando ensayos más detallados para corroborar estas evidencias.

DHEA es una hormona suprarrenal con múltiples funciones capaces de afectar al crecimiento de diferentes parásitos, incluyendo a la amiba (Carrero y cols., 2006; Escobedo y col., 2005). Gracias a su acción benéfica en muchas patologías asociadas a la edad, DHEA se ha considerado como una hormona de gran importancia. Sin embargo, su uso terapéutico es limitado debido a que puede ser metabolizada a otros productos que en algunas ocasiones tienen efectos nocivos en el organismo (Allolio y Arlt, 2002). Con la finalidad de resolver este problema, se han diseñado análogos de la DHEA que carecen de actividad androgénica, pero mantienen otras actividades biológicas del esteroide nativo. Por lo tanto, se realizó la evaluación de diferentes dosis de dos análogos de la DHEA sobre los trofozoítos amibianos. Los resultados mostraron que, el análogo  $\beta$ -AET no afectó la proliferación de los trofozoítos, exceptuando a la concentración más elevada de 50  $\mu\text{g/ml}$  que inhibió el crecimiento de los trofozoítos en un 18.32 % (Fig. 19). Este efecto es totalmente opuesto al observado con DHEA, la cual inhibe la proliferación de los trofozoítos a partir de concentraciones más bajas a las que son reportan como fisiológicas (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Carrero y cols., 2006). Por el contrario, el otro análogo  $\alpha$ -epi-Br, inhibió el crecimiento de los trofozoítos de una manera dosis dependiente, similar al efecto



describió para su esteroide nativo (DHEA) (Carrero y cols., 2006) (Fig. 17 y 18). En el caso de *P. falciparum* y *P. berghei* un efecto similar se ha observado, tanto para DHEA como para el análogo  $\alpha$ -epi-Br, los cuales inhibieron la proliferación de estos parásitos a través de la inhibición de la enzima G6PDH (Ayi y cols., 2002; Freilich y cols., 2000).

Por otro lado, en la infección experimental el tratamiento con los análogos, después de la inoculación intraportal con trofozoítos, mostró una disminución en el desarrollo del AHA en los hámsteres. En el caso del análogo  $\beta$ -AET se observó una inhibición del 100% en el desarrollo del absceso, este efecto es sumamente interesante debido a que se han descrito pocos compuestos que puedan inhibir completamente al AHA. En contraste el tratamiento con  $\alpha$ -epi-Br mostró una reducción del 55.1 % en el desarrollo del AHA. Aunque este efecto no fue tan marcado como el de  $\beta$ -AET, es interesante mencionar que la administración (después de la infección) de cualquiera de estos análogos en hámsteres resultó en un efecto de protección, contrario a la exacerbación en el desarrollo del AHA que se reportó cuando se administra DHEA a la misma concentración (Carrero y cols., 2006). Sin embargo, se deben de efectuar estudios futuros para determinar el o los mecanismos por los cuales los análogos reducen la infección, principalmente por que se ha reportado que la  $\alpha$ -epi-Br presenta actividad inmuno moduladora en las infecciones con VIH, el tratamiento con  $\alpha$ -epi-Br incrementa la circulación de las células inmunes efectoras activadas y la producción de citocinas tipo Th1, disminuyendo la carga viral en humanos y simios (Freilich y cols., 2000). Por lo tanto, sería de gran interés evaluar si la reducción en el desarrollo del AHA se debe a una modulación de la respuesta inflamatoria, como ocurre en los hámsteres hembras y machos gonadectomizados.

Además, es necesario evaluar todos los efectos que podría inducir su uso regular, debido a que la mayoría de fármacos que se utilizan en el tratamiento de la amibiasis, presentan efectos secundarios como, náuseas, vómitos, dolores de cabeza, neuritis óptica, erupción cutánea, y en casos extremos puede producir depresión de médula ósea y de la espermatogénesis, además se

considera que los grupos nitro (imidazoles) pueden presentar efectos mutagénicos (Romero, 2008<sup>b</sup>). Si en estudios futuros no se encuentran estos efectos adversos, estos análogos serán compuestos idóneos para el combate de la amibiasis. Principalmente, por que se ha descrito resistencia *in vitro* al metronidazol en los trofozoítos de *E. histolytica*. También, tenemos que mencionar que la evaluación de este fármaco en la infección intestinal ocasionada por este parásito es necesaria para complementar estos resultados.

En conclusión, aunque el modelo de hámster utilizado en los experimentos de deficiencia hormonal no reflejen muchos aspectos del AHA en humanos, en este trabajo nosotros demostramos que se establecen una red de interacciones entre el hospedero y el parásito, en la cual el sistema inmune y el sistema endocrino juegan un papel determinante, que definen el resultado de la infección causada por el parásito *E. histolytica*. La evidencia que se presenta aquí, muestra que la deficiencia de hormonas sexuales en hámsteres reduce la progresión del AHA, posiblemente debido a una reducción de la respuesta inflamatoria tipo Th1. Por otro lado, el describir nuevos mecanismos de acción de anti-amibianos como el de la DHEA a través de la enzima blanco HMGC<sub>o</sub>A reductasa, o la identificación de nuevos compuestos que protegen contra la amibiasis invasora, abre la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos que ayuden a combatir la amibiasis en vista de la reciente descripción de casos reuantes al metronidazol y de su cada vez mas discutido uso en humanos por sus efectos adversos.

## X. REFERENCIAS

- **Abebe, F., Birkeland, K. I., Gaarder, P. I., Petros, B., Gundersen, S. G.** 2003. The relationships between dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), the intensity of *Schistosoma mansoni* infection and parasite-specific antibody responses. A cross-sectional study in residents of endemic communities in north-east Ethiopia. *APMIS*. **111**: 319-28.
- **Abuabara, S. F., Barret, J. A., Hau, T., Jonasson, O.** 1982. Amebic liver abscess. *Arch. Surg.* **117**:239-44.
- **Ali, I. K. M., Hossain, M. B., Roy, S., Ayeh-Kumi, P. F., Petri Jr, W. A., Haque, R., Clark, C. G.** 2003. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:580-84.
- **Ali, I. K. M., Clark C. G., Petri W. A. Jr.** 2008. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect. Genet. Evol.* **8**: 698-07.
- **Allolio, B., Arlt, W.** 2002. DHEA treatment: myth or reality?. *Trends Endocrinol Metab.* **13**: 288-94.
- **Alonso, D. F., Gómez, D. E.** 1999. Cancer mamario y colestrol. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy.* **59**: 54-59.
- **Anon.** 1997. A consultation with experts on amoebiasis. WHO/PAHO/UNESCO Report. Epidemiol. Bull. PAHO. 18. pp 13-14.
- **Anon.** 1998. Life in the 21st century: a vision for all. The World Health Report 1998. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- **Araujo-Jorge, T. C., Lage, M. J. F., Rivera, M. T., Carlie, Y., Leuven, F van.** 1992. *Trypanosoma cruzi*: enhance  $\alpha$ -macroglobulin levels correlate to resistance of BalbC/J mice to acute infection. *Parasitol. Res.* **78**: 215-21.
- **Arbo, A., Hoefsloot, M., Ramírez, A., Ignacio-Santos, J.** 1990. *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. *Arch. Invest. Med. (Mex).* **21**: 57-61.
- **Arellano, J., Granados, J., Pérez, E., Félix. C., Kretschmer, R. R.** 1991. Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo patients with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* **13**: 23-9.
- **Arellano, J., Granados, J., Frenk, P., López-Osuna, M., Santos, I., Kretschmer, R. R.** 1992. Increased frequency of HLA-DR3 in Mexican mestizo pediatric patients with amebic liver abscess (ALA). *Arch. Med. Res.* **23**:269-70.
- **Arellano, J., Pérez-Rodríguez, M., López-Osuna, M., Velásquez, J. R., Granados, J., Justiniano, N., Santos, J. I., Madrazo, A., Muñoz, L., Kretschmer, R.** 1996. Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SCO1 in Mexican mestizo children with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* **18**: 491-8.
- **Arteaga-Silva, M., Márquez-Villanueva, Y., Martínez-García, R., Hernández-González, M., Bonilla-Jaime, H., Retana-Márquez, S.** 2005 Effects of hormonal replacement with androgens and estrogens on male sexual behavior and plasma levels of these steroids in gonadectomized golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Physiol. Behav.* **85**: 571-80.
- **Asgharpour, A., Gilchrist, C., Baba, D., Hamano, S., Houpt, E.** 2005. Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1<sup>+</sup> cells. *Infect. Immun.* **73**: 4522-59.
- **Ayi, K., Giribaldi, G., Skorokhod, A., Schwarzer, E., Prendergast, P. T., Arese, P.** 2002. 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterone, an antimalarial analogue of the hormone dehydroepiandrosterone, enhances phagocytosis of ring stage parasitized erythrocytes: a novel mechanism for antimalarial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3180-4.
- **Bekker, C., Arellano, J., Talamás, P., Kretschmer, R., Perez-Rodriguez, M. E.** 2000. Amebic lectin stimulation of lymphocytes of Mexican Mestizos recovered from amebic abscess of the liver induces decreased production of IL5 and IL6. *Arch. Med. Res.* **31**: S96-7.
- **Bekker-Mendez, V. C., Pérez-Castillo, V. L., Rico-Rosillo, M. G., Pérez-Rodríguez, M., Arellano-Blanco, J., Kretschmer-Schmid, R. R., Talamás-Rohana, P.** 2006. Downregulation of selected cytokines in amebiasis. *Arch. Med. Res.* **37**: 556-8.
- **Belanger, A. Candas, B., Dupont, A., Cusan, L., Diamon, P., Gomez, J. L. Labrie, F.** 1994. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **3**: 285-99.

- **Benten, W. P., Ulrich, P., Kuhn-Velten, W. N., Vohr, H. W., Wunderlich, F.** 1997. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone. *J. Endocrinol.* **153**: 275-81.
- **Blazquez S, Zimmer C, Guigon G, Olivo-Marin JC, Guillén N, Labruyère E.** 2006. Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **74**: 1407-11.
- **Blessmann, J., Van Linh, P., Nu, P. A., Thi, H. D., Muller-Myhsok, B., Buss, H., Tannich, E.** 2002. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**:578-83.
- **Blessmann, J., Ali, I. K., Nu, P. A., Dinh, B. T., Viet, T. Q., Van, A. L., Clark, C. G., Tannich, E.** 2003. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4745-50.
- **Boissier, J., Chlichlia, K., Digon, Y., Ruppel, A., Mone, H.** 2003. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* **91**: 144-50.
- **Bouman, A., Heineman, M. J., Faas, M. M.** 2005. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update.* **11**: 411-23.
- **Braga, L. L., Ninomiya, H., McCoy, J. J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P. J., Petri, W. A. Jr.** 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **90**: 1131-7.
- **Bruchhaus, I., Richter, S., Tannich, E.** 1997. Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* **326**: 785-9.
- **Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor, J., Gutiérrez, G., Ortiz-Ortiz, L.** 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**:412-19.
- **Calderón, J. Muñoz M. L., Acosta, H. M.** 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J. Exp. Med.* **151**:184-93.
- **Campbell, D., Chadee, K.** 1997. Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J. Infect. Dis.* **175**: 1176-83.
- **Campbell, D., Gaucher, D., Chadee, K.** 1999. Serum from *Entamoeba histolytica*-infected gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting interleukin-2 production. *J. Infect. Dis.* **179**: 1495-501.
- **Carrero, J. C., Cervantes, C., Moreno-Mendoza, N., Saavedra, E., Morales-Montor, J., Laclette, J. P.** 2006. Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*. *Microbes Infect.* **8**: 323-31.
- **Castro, C., Macedo, V., Rezende, J. M., Prata, A.** 1994. Longitudinal radiologic study of esophagus, in na endemic area of Chagas disease, in a period of 13 years. *Rev. Soc. Bras. Soc. Med. Trop.* **27**: 227-33.
- **Cernetich, A., Garver, L. S., Jedlicka, A. E., Klein, P. W., Kumar, N., Scott, A. L., Klein, S. L.** 2006. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. *Infect. Immun.* **74**: 3190-203.
- **Cervantes-Rebolledo, C., Carrero, J. C.** 2008. Hormonas y la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. *Rev. Med. de la Extensión Portuguesa-ULA.* **2**: 77-88.
- **Cevallos, A. M.** 2002. Manson's Tropical Diseases. Saunders. 21 ed. London. U. K.
- **Conde-Bonfil, M. C., De la Mora-Zerpa, C.** 1992. *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Pública de México.* **34**:335-41.
- **Couillard, S., Labrie, C., Belanger, A. Candas, B., Pouliot, F., Labrie, F.** 1998. Effect dehydroepiandrosterone and antiestrogen EM-800 on the growth of human ZR-75-1 breast cancer xenografts. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**:772-78.
- **Cutolo, M., Sulli, A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Seriolo, B. Straub, R. H.** 2004. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus.* **13**: 635-638.
- **Chadee, K., Meerovitch, E.** 1984. The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**:47-54.
- **Chen, C. C., Parker Jr, R. C.** 2004. Adrenal androgens and the immune system. *Semin. Reprod. Med.* **22**: 369-77.
- **Choi, M. H., Sajed, D., Poole, L., Hirata, K., Herdman, S., Torian, B. E., Reed, S. L.** 2005. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Mol. Biochem. Parasitol.* **143**: 80-9.

- **Dalla-Valle, L., Coute, J., Labrie, Y., Simard, J., Belvedere, P., Simontacchi, C.** 1995. Occurrence of cytochrome P450c17 mRNA and dehydroepiandrosterone biosynthesis in the rat gastrointestinal tract. *Mol. Cell Endocrinol.* **111**: 83-92.
- **D'Ambrósio-Fernandes, R., Caetano L. C., dos Santos, C. D., Abrahão, A. A., Pinto, A. C., Prado Jr, J. C.** 2008. Alterations triggered by steroid gonadal hormones in triglycerides and the cellular immune response of *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Vet. Parasitol.* **152**: 21-7.
- **Davis, P. H., Zhang, X., Guo, J., Townsend, R. R., Stanley, S. L. Jr.** 2006. Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* **61**: 1523-32
- **de Mendonça, R. L., Escrivá, H., Bouton, D., Laudet, V., Pierce, R. J.** 2000. Hormones and nuclear receptors in schistosome development. *Parasitol. Today.* **16**: 233-240.
- **de Souza, E. M., Rivera, M. T., Araujo-Jorge, T. C., de Castro, S. L.** 2001. Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol. Res.* **87**: 513-20.
- **Dey, I., Keller, K., Belley, A., Chadee K.** 2003. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 13561-6.
- **Diallo, K., Loemba, H., Oliveira, M., Mavoungou, D. D., Wainberg, M. A.** 2000. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) replication by immunor (IM28), a new analog of dehydroepiandrosterone. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **19**: 2019-24.
- **Diamond, L. S., Clark, C. G.** 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**:340-44.
- **dosSantos, C. D., Toldo, M. P., Prado Jr, J. C.** 2005. *Trypanosoma cruzi*: the effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment during experimental infection. *Acta Trop.* **95**: 109-15.
- **dosSantos, C. D., Toldo, M. P., Levy, A. M., Kawasse, L. M., Zucoloto, S., Prado Jr, J. C.** 2007. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. *Acta Trop.* **102**: 143-50.
- **dosSantos, C. D., Toldo, M. P., Santello, F. H., Filipin, M. D., Brazão, V., Prado Jr, J. C.** 2008. Dehydroepiandrosterone increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Vet. Parasitol.* [Epub ahead of print]
- **Elnekave, K., Siman-Tov, R., Ankri, S.** 2003. Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. *Parasite Immunol.* **25**: 597-608.
- **Elói-Santos, S., Olsen, N. J., Correa-Oliveira, R., Colley, D. G.** 1992. *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Exp. Parasitol.* **75**: 168-75.
- **Escobedo, G., Larralde, C., Chavarria, A., Cerbón, M. A., Morales-Montor, J.** 2004. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.* **90**: 1235-44.
- **Escobedo, G., Roberts, C. W., Carrero, J. C., Morales-Montor, J.** 2005. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?. *Trends Parasitol.* **21**: 588-93.
- **Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A.** 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 318:331.
- **Estrada-Villaseñor, E., Morales-Montor, J., Rodríguez-Dorantes, M., Ramos-Martínez, E., Néquiz-Avenidaño, M., Ostoa-Saloma, P.** 2007. IL-6 KO mice develop experimental amoebic liver infection with eosinophilia. *J. Parasitol.* **93**: 1424-8.
- **Fallon, P. G., Richardson, E. J., Jones, F. M., Dunne, D. W.** 1998. Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 251-3.
- **Fotadar, R., Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J.** 2007. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1035-37.
- **Freilich, D., Ferris, S., Wallace, M., Leach, L. Kallen, a., Frincke, J. Ahlem, C., Hacker M., Nelson, D., Hebert J.** 2000. 16-alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**: 280-83.
- **Ghadirian, E., Meerovitch, E.** 1981. Effect of splenectomy on the size of amoebic liver abscesses and metastatic foci in hamsters. *Infect. Immun.* **31**: 571-3<sup>a</sup>.
- **Ghadirian, E., Meerovitch, E.** 1981. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasite Immunol.* **3**: 329-38<sup>b</sup>.

- **Ghadirian, E., Denis, M.** 1992. *Entamoeba histolytica* extract and interferon-gamma activation of macrophage-mediated amoebicidal function. *Immunobiology*. **185**: 1-10<sup>a</sup>.
- **Ghadirian, E., Denis, M.** 1992. *In vivo* activation of macrophages by IFN-gamma to kill *Entamoeba histolytica* trophozoites *in vitro*. *Parasite Immunol.* **14**: 397-404<sup>b</sup>.
- **Gil, J. N., Ganguly, K. N., Majan, R. C., Bhusnurmath, R. S., Dilawari, B. J.** 1983. Progesterone-induced liver abscess in guinea-pigs-anew model. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 53-8.
- **González, M. F., Tanimoto, W. M., Vázquez, S. J. A., Calderon, P., Aguirre, G. J.** 1972. Efecto de los estrógenos en hámsteres con amibiasis en el hígado. *Arch. Invest. Méd.* **3**: 335-41.
- **Grossman, C.** 1989. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J. Steroid Biochem.* **5**: 325-46.
- **Guo, X., Houpt, E., Petri, W. A. Jr.** 2007. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. *Curr. Opin. Immunol.* **19**: 376-84.
- **Guerrant, R. L., Brush, J., Ravdin, J. I., Sullivan, J. A., Mande, L. L.** 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.* **143**: 83-93.
- **Gutiérrez-Alarcón, A., Moguel-Torres, M., Mata-Leyva, O., Cuellar-Nevárez, G., Siqueiros-Cendón, T., Erosa, G., Ramos-Martínez, E., Talamás-Rohana, P., Sánchez-Ramírez, B.** 2006. *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. *Exp. Parasitol.* **114**: 154-9.
- **Hamano, S., Asgharpour, A., Stroup, S. E., Wynn, T. A., Leiter, E. H., Houpt, E.** 2006 Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production. *J. Immunol.* **177**: 1208-13.
- **Haque, R., Ali, I. M., Sack, R. B., Farr, B. M., Ramakrishnan, G., Petri, W. A. Jr.** 2001. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J. Infect. Dis.* **183**: 1787-93.
- **Haque, R., Duggal, P., Ali, I. M., Hossain, M. B., Mondal, D., Sack, R. B., Farr, B. M., Beaty, T. H., Petri, W. A. Jr.** 2002. Innate and acquired resistance to amoebiasis in bangladeshi children. *J. Infect. Dis.* **186**: 547-52.
- **Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E., Petri Jr., W. A.** 2003. Amebiasis. *N. Engl. J. Med.* **348**:1565-73.
- **Haque, R., Mondal, D., Duggal, P., Kabir, M., Roy, S., Farr, B. M., Sack, R. B., Petri Jr, W. A.** 2006. *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amoebiasis. *Infect Immun.* **74**:904-09.
- **Haque R, Mondal D, Shu J, Roy S, Kabir M, Davis AN, Duggal P, Petri WA Jr.** 2007. Correlation of interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg.* **76**: 340-4.
- **Havelock, C. J., Auchus, J. R., Rainey, E. W.** 2004. The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Semin. Reprod. Med.* **22**: 337-47.
- **Henderson, E., Schwartz, A., Pashko, L., Abou-Gharbia, M., Swern, D.** 1981. Dehydroepiandrosterone and 16 alpha-bromo-epiandrosterone: inhibitors of Epstein-Barr virus-induced transformation of human lymphocytes. *Carcinogenesis.* **2**: 683-6.
- **Homo-Delarche, F., Fitzpatrick, F., Christeff, N., Nunez, E. A., Bach, J. F., Dardenne, M.** 1991. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**: 619-37.
- **Houpt ER, Glembocki DJ, Obrig TG, Moskaluk CA, Lockhart LA, Wright RL, Seaner RM, Keepers TR, Wilkins TD, Petri WA Jr.** 2002. The mouse model of amoebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J. Immunol.* **169**: 4496-503.
- **Huerta, L., Terrazas, L. I., Scitutto, E., Larralde, C.** 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J. Parasitol.* **78**: 471-6.
- **Hughes, M. A., Petri Jr., W.A.** 2000. Amoebic liver abscess. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **14**:565-82,
- **Humphreys, N. E., Grencis, R. K.** 2002. Effects of ageing on the immunoregulation of parasitic infection. *Infect. Immun.* **70**: 5148-57.
- **Ivory, C. P., Chadee, K.** 2007. Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J Immunol.* **37**:385-94.
- **Ivory, C., Kammanadiminti, S., Chadee, K.** 2007. Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. *Trends Parasitol.* **23**: 46-8.

- **Jones, T. C., Johnson Jr, W. D., Barretto, A. C., Lago, E., Badaro, R., Cerf, B., Reed, S. G., Netto, E. M., Tada, M. S., Franca, T. F.** 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J. Infect. Dis.* **156**: 73-83.
- **Kalimi, M., Shafagoj, Y., Loria, R., Padgett, D., Regelson, W.** 1994. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol. Cell. Biochem.* **131**: 99-04.
- **Kamis, A. B., Ibrahim, J. B.** 1989. Effects of testosterone on blood leukocytes in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Parasitol. Res.* **75**: 611-3.
- **Kammanadiminti, S. J., Mann, B.J., Dutil, L., Chadee, K.** 2004. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *FASEB J.* **18**: 155-7. **Kasper, L.H., Buzoni-Gatel, D.** 2001. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun.* **69**: 1-8.
- **Kasper, L. H., Buzoni-Gatel, D.** 2001. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect. Immun.* **69**: 1-8.
- **Kaur, U., Sharma, A. K., Sharma, M., Vohra, H.** 2004. Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin-specific antibody response in an endemic area. *Scand. J. Immunol.* **60**: 524-8.
- **Kelsall, B. L., Jackson, T. G., Gathiram, V., Salig, S. B., Vaithilingum, M., Pearson, R. D., Ravdin, J. I.** 1994. Secretory immunoglobulin A antibodies to the galactose-inhibitable adherence protein in the saliva of patients with amebic liver disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 454-9.
- **Khairnar, K., Parija, S. C., Palaniappan R.** 2007. Diagnosis of intestinal amoebiasis by using nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *J. Gastroenterol.* **42**:631-40.
- **Khalifa, A. M., Ibrahim, I. R., el-Kerdany, E. D.** 2000. Coccidial infection in immunosuppressed mice: prophylaxis and treatment with dehydroepiandrosterone. *East Mediterr. Health J.* **6**: 908-18.
- **Kim, K. H., Shin, C. O., Im, K.** 1993. Natural killer cell activity in mice infected with free-living amoeba with reference to their pathogenicity. *Korean J. Parasitol.* **31**: 239-48.
- **Klein, S. L.** 2000. Hormones and mating system affect sex and species differences in immune function among vertebrates. *Behav. Processes.* **51**: 149-166.
- **Klein, S. L.** 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.* **26**: 247-264.
- **Krettli, A. U., Brener, Z.** 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* **116**: 755-60.
- **Krücken, J., Dkhil, M. A., Braun, J. V., Schroetel, R. M., El-Khadragy, M., Carmeliet, P., Mossmann, H., Wunderlich, F.** 2005. Testosterone suppresses protective responses of the liver to blood-stage malaria. *Infect. Immun.* **73**: 436-43.
- **Labrie, F., Bélanger, V., Luu-The, J., Simard, S. X., Lin, J., Cusan, C.** 1999. Role of DHEA transformation into androgens and estrogens in peripheral intracrine tissue. In "Proceedings of the Workshop on DHEA: A Comprehensive Review". J. H. H. Thijssen and H. Nieuwenhuysse, eds. Parthenon Publishing, New York; pp 69-103.
- **Labrie, F.** 2004. Adrenal androgens and intracrinology. *Semen. Reprod. Med.* **22**: 299-309.
- **Lamason, R, Zhao, P., Rawat, R., Davis, A., Hall, J. C., Chae, J. J., Agarwal, R., Cohen, P., Rosen, A., Hoffman, E. P., Nagaraju, K.** 2006. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol.* **20**; 7:2.
- **Landgraf, B., Kollaritsch, H., Wiedermann, G., Wernsdorfer, W. H.** 1994. Parasite density of *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence for influence of sex hormones?. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 73-4.
- **Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M. C.** 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**: 575-80.
- **Leblanc, M., Labrie, C., Belanger, A., Candas, B., Labrie, F.** 2002. Pharmacokinetics of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) in the ovariectomised cynomolgus monkey. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **81**: 159-64.
- **Leenstra, T., ter Kuile, F. O., Kariuki, S. K., Nixon, C. P., Oloo, A. J., Kager, P. A., Kurtis, J. D.** 2003. Dehydroepiandrosterone sulfate levels associated with decreased malaria parasite density and increased hemoglobin concentration in pubertal girls from western Kenya. *J. Infect. Dis.* **188**: 297-304.
- **Lezama-Dávila, C. M., Isaac-Márquez, A. P., Barbi, J., Oghumu, S., Satoskar, A. R.** 2007. 17Beta-estradiol increases *Leishmania mexicana* killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 1125-7.

- **Li, S., Yan, X., Belanger, f., Labrie, F.** 1993. Prevention by dehydroepiandrosterone of the development of mammary carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in the rat. *Breast Cancer Res. Treat.* **29**:203-17.
- **Lidell, M. E., Moncada, D. M., Chadee, K., Hansson, G. C.** 2006. *Entamoeba histolytica* proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 9298-303.
- **Liesenfeld, O., Nguyen, T. A., Pharke, C., Suzuki, Y.** 2001. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J. Parasitol.* **87**: 1491-3.
- **Lin, J. Y., Keller, K., Chadee, K.** 1993. *Entamoeba histolytica* proteins modulate the respiratory burst potential by murine macrophages. *Immunology.* **78**: 291-7.
- **Lin, J. Y., Seguin, R., Keller, K., Chadee, K.** 1994. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun.* **62**: 1534-1541.
- **Liu, D., Dillon, J. S.** 2002. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem.* **277**:21379-88.
- **Liu, L., Benten, W. P., Wang, L., Hao, X., Li, Q., Zhang, H., Guo, D., Wang, Y., Wunderlich, F., Qiao, Z.** 2005. Modulation of *Leishmania donovani* infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: signaling via surface binding sites. *Steroids.* **70**: 604-14.
- **Loftus, B., Anderson, I, Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N. M., Petri, W. A. Jr, Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M., Hall, N.** 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature.* **433**:865-8.
- **Lotter H, Jacobs T, Gaworski I, Tannich E.** 2006. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect. Immun.* **74**:118-24.
- **Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C. J., Rosenstein, Y., Rocha, L. M., Rios-Sarabia, N., Espinosa-Cantellano, M., Becker, I., Estrada, I., Salazar-González, R. M., López-Macias, C., Wagner, H., Sánchez, J., Isibasi, A.** 2005. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol.* **27**: 127-37.
- **Malkin, C. J., Pugh, P. J., Jones, R. D., Jones, T. H., Channer, K. S.** 2003. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis--immunomodulation and influence upon plaque development and stability. *J Endocrinol.* **178**: 373-380.
- **Maninger, N., Wolkowitz, M. O., Reus, I. V., Epel, S. E., Mellon, H. S.** 2009. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front. Neuroendocrinol.* **30**: 65-91.
- **Marguerite, M., Gallissot, M. C., Diagne, M., Moreau, C., Diakkhate, M. M., Roberts, M., Remoue, F., Thiam, A., Decam, C., Rogerie, F., Cottrez, F., Neyrinck, J. L., Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Piau, J. P., Daff, B., Niang, M., Wolowczuk, I., Riveau, G., Auriault, C., Capron, A.** 1999. Cellular immune responses of a Senegalese community recently exposed to *Schistosoma mansoni*: correlations of infection level with age and inflammatory cytokine production by soluble egg antigen-specific cells. *Trop. Med. Int. Health.* **4**: 530-43.
- **Marriott, I., Huet-Hudson, Y. M.** 2006. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res.* **34**: 177-192.
- **Martínez-Palomo, A.** 1987. The patogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Today.* **3**:111-18.
- **Masliah, E., and Pérez-Tamayo, R.** 1984. Nota sobre la histopatología de la amibiasis invasora del intestino grueso. *Patología.* **22**:233-45.
- **Mayer, D., Forstner, K. Kopplow, K.** 2003. Induction and modulation of hepatic preneoplasia and neoplasia in the rat by dehydroepiandrosterone. *Toxicol. Pathol.* **31**: 103-12.
- **McKay, L. I., Cidlowski, J. A.** 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* **20**: 435-59.
- **Meerovitch, E., Chadee, K.** 1989. *In vivo* models of immunity in amebiasis. In *Amebiasis*. Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin ed. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York. pp 425-37.



- Meikle, A. W., Dorchuck, R. W., Araneo, B. A., Stringham, J. D., Evans, T. G., Spruance, S. L., Daynes, R. A. 1992. The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42**:293-304.
- Mesiano, M., Jaffe, B. R. 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.* **18**: 378-03.
- Mock, B. A., Nacy, C. A. 1988. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infect. Immun.* **56**: 3316-9.
- Moncada, D., Séller, K., Chadee, K. 2003. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect. Immun.* **71**: 838-44.
- Morales-Montor, J., Gamboa-Domínguez, A., Rodríguez-Dorantes, M., Cerbón, M. A. 1999. Tissue damage in the male murine reproductive system during experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Parasitol.* **85**: 887-90.
- Morales-Montor, J., Mohamed, F., Ghaleb, A., Baig, S., Hallal-Calleros, C., Damian, R. T. 2001. In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **87**:1132-9.
- Morales-Montor, J., Baig, S., Hallal-Calleros, C., Damian, R. T. 2002. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp. Parasitol.* **100**: 209-16.
- Mota, E. A., Guimaraes, A. C., Santana, O., Sherlock, I., Of, R., Weller, T. H. 1990. A nine year the prospective study of Chagas disease in a defined rural population in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**: 429-40.
- Muller, M., den Tonkelaar, I., Thijssen, H. J., Grobbee, E. D., van der Schouw, Y. T. 2003. Endogenous sex hormones in men aged 40-80 years. *Eur. J. Endocrinol.* **149**: 583-89.
- Mwatha, J. K., Kimani, G., Kamau, T., Mbugua, G. G., Ouma, J. H., Mumo, J., Fulford, A. J., Jones, F. M., Butterworth, A. E., Roberts, M. B., Dunne, D. W. 1998. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human *Schistosomiasis mansoni*. *J. Immunol.* **160**: 1992-9.
- Nakazawa, M., Fantappie, M. R., Freeman Jr, G. L., Eloji-Santos, S., Olsen, N. J., Kovacs, W. J., Secor, W. E., Colley, D. G. 1997. *Schistosoma mansoni*: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Exp. Parasitol.* **85**: 233-40.
- Naus, C. W., Booth, M., Jones, F. M., Kemijumbi, J., Vennervald, B. J., Kariuki, C. H., Ouma, J. H., Kabatereine, N. B., Dunne, D. W. 2003. The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community. *Trop. Med. Int. Health.* **8**: 561-8.
- Nawata, H., Toshihiko, Y., Kiminobu, G., Taijiro, O., Ashida, K. 2002. Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech. Ageing Dev.* **123**: 1101-06.
- Nieschlag, E., Loriaux, L. D., Ruder, J. H., Zucker, R. I., Kirschner, A. M., Lipsett, B. M. 1973. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *J. Endocrinol.* **57**: 123-34.
- Olivos-García, A., Nequiz-Avenidaño, M., Tello, Ramos, E., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R. 2004. Inflammation, complement, ischemia and survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Pathol.* **77**: 66-71.
- Olivos-García, A., Carrero, J. C., Ramos, E., Nequiz, M., Tello, E., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R. 2007. Late experimental amebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetylcysteine. *Exp Mol Pathol.* **82**: 310-315.
- Okabe, T., Haji, M., Takayanagi, R., Adachi, M., Imasaki, K., Kurimoto, F., Watanabe, T., Nawata, H. 1995. Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* **80**:2993-6.
- Orentreich, N., Brind, J. L., Rizer, R. L. Vogelman, J. H. 1984. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**: 551-55.
- Organización Mundial de la Salud. 1997. Amoebiasis, an expert consultation. Weekly Epidemiological Record No. 14, Ginebra; Abril.
- Pan American Health Organization. 1998. México. In: Health in the Americas. Pan American Health Organization, Washington DC. pp. 357-78.
- Parker, N. L., Odell, W. D. 1980. Control of adrenal androgen secretion. *Endocr. Rev.* **1**: 392-10.

- **Pascale, R. M., Simile, M. M., De Miglio, M. R., Nuftris, A., Seddaiu, M. A., Muroi, M. R., Danni, O., Rao, K. N., Feo, F.** 1995. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity and gene expression by dehydroepiandrosterone in preneoplastic liver nodules. *Carcinogenesis*. **16**:1537-42.
- **Pashko, L. L., Schwartz, A. G.** 2003. Antihyperglycemic effect of dehydroepiandrosterone analoge 16-alpha-fluoro-5-androsten-17-one in diabetic mice. *Diabetes*. **42**: 1105-08.
- **Perkins, S. N., Hursting, S. D., Haines, D. C., James, S. J., Miller, B. J., Phang, J. M.** 1997. Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in nullizygous p53-deficient mice by dehydroepiandrosterone and its analog 16alpha-fluoro-5-androsten-17-one. *Carcinogenesis*. **18**: 989-94.
- **Pertuz-Belloso, S., Ostoa-Saloma, P., Benitez, I., Soldevila, G., Olivos, A., García-Zepeda, E.** 2004. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol.* **26**: 237-41.
- **Petri Jr, W. A., Haque, R., Mann, B. J.** 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 39-64.
- **Phillips, A. N., Antunes, F., Stergiou, G., Ranki, A., Jensen, G. F., Bentwich, Z., Sacks, T., Pedersen, C., Lundgren, J. D., Johnson, A. M.** 1994. A sex comparison of rates of new AIDS-defining disease and death in 2554 AIDS cases. AIDS in Europe Study Group. *AIDS in Europe Study Group. AIDS*. **8**: 831-5.
- **Pillai, D. R., Wan, P. S., Yau, Y. C., Ravdin, J. I., Kain, K. C.** 1999. The cysteine-rich region of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin (170-kilodalton subunit) is sufficient for high-affinity Gal/GalNAc-specific binding in vitro. *Infect. Immun.* **67**: 3836-41.
- **Prado Jr, J. C., Leal, M. de P., Anselmo-Franci, J. A., de Andrade júniur, H. F., Kloetzel, J. K.** 1998. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **84**: 100-5.
- **Prado Jr, J. C., Levy, A. M., Leal, M. P., Bernard, E., Kloetzel, J. K.** 1999. Influence of male gonadal hormones on the parasitaemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Prasitol. Res.* **85**: 826-29.
- **Prathap K, Gilman R.** 1970. The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. *Am J Pathol.* **60**:229-46.
- **Pung, O. J., Luster, M. I.** 1986. *Toxoplasma gondii*: decreased resistance to infection in mice due to estrogen. *Exp. Parasitol.* **61**: 48-56.
- **Qiao, Z., Guo, Z., Yin, G., Yin, L., Zhao, J., Wunderlich, F.** 1999. Testosterone inhibits apoptosis of *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* **17**: 21-4.
- **Rasmussen, K. R., Healey, M. C.** 1992. Dehydroepiandrosterone-induced reduction of *Cryptosporidium parvum* infections in aged Syrian golden hamsters. *J. Parasitol.* **78**: 554-7.
- **Rasmussen, K. R., Martin, E. G., Healey, M. C.** 1993. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* **79**: 364-70.
- **Rasmussen, K. R., Healey, M. C., Cheng, L., Yang, S.** 1995. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* **81**: 429-33.
- **Radvin, J. I.** 1988. Amoebiasis. In human infection by *Entamoeba histolytica*. Ed. Churchill Livingstone, New York, United States of America. pp 838.
- **Ravdin, J. I.** 1995. State of the art clinical article. Amebiasis. *Clin. Nort. Am.* **20**:1453-66.
- **Reed, S. L., Sargeant, P. G., Braude, A. I.** 1983. Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 248-53.
- **Reed, S. L., Curd, J. G., Gigli, I., Gillin, F. D., Braude, A. I.** 1986. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* **136**: 2265-70.
- **Reed, S. L., Gigli, I.** 1990. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J. Clin. Invest.* **86**: 1815-22.
- **Reed, S. L., Ember, J. A., Herdman, D. S., DiScipio, R. G., Hugli, T. E., Gigli, I.** 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* **155**: 266-74.
- **Remoue, F., To, Van D., Schacht, A. M., Picquet, M., Garraud, O., Vercruyse, J., Ly, A., Capron, A., Riveau, G.** 2001. Gender-dependent specific immune response during chronic human *Schistosomiasis haematobia*. *Clin. Exp. Immunol.* **124**: 62-8.

- **Rico, G., Leandro, E., Rojas, S., Giménez, J. A., Kretschmer, R. R.** 2003. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol. Res.* **90**: 264-7.
- **Rivero-Nava, L., Aguirre-García, J., Shibayama-Salas, M., Hernández-Pando, R., Tsutsumi, V., Calderon, J.** 2002. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and normal-depleted mice. *Exp. Parasitol.* **101**: 183-92.
- **Robel, P., Bourreau, E., Corpechot, C., Dang, D. C., Halberg, F., Clarke, C.** 1987. Neurosteroids : 3  $\beta$ -hidroxy- $\Delta^5$ -derivates in rat and monkey brain. *J. Steroid Biochem.* **27**: 649-55.
- **Roberts, C. W., Cruickshank, S. M., Alexander, J.** 1995. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect. Immun.* **63**: 2549-55.
- **Roberts, C. W., Satoskar, A., Alexander, J.** 1996. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitol Today.* **12**: 382-388.
- **Roberts, C. W., Walker, W., Alexander, J.** 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 476-88.
- **Robinson, B., Cutolo, M.** 1999. Should dehydroepiandrosterone replacement therapy be provided with glucocorticoids?. *Rheumatology.* **38**: 488-95.
- **Rojas-Dotor, S., Rico, G., Pérez, J., Velázquez, J., Silva, R., Morales, E., Kretschmer, R.** 2006. Cytokine expression in CD4(+) cells exposed to the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* **98**: 493-5.
- **Romero-Caballero, R., García-Yañez, Y.** 2008. Evolución histórica de la amibiasis. *En Amibiasis en el siglo XXI.* R. Romero-Caballero ed. Sociedad Mexicana de Parasitología., México, D. F. pp 11-15<sup>a</sup>.
- **Romero-Caballero, R.** 2008. Tratamiento. *En Amibiasis en el siglo XXI.* R. Romero-Caballero ed. Sociedad Mexicana de Parasitología., México, D. F. pp 197-210<sup>b</sup>.
- **Saavedra, L. E., Pérez, M. R.** 1996. Energy production in *Entamoeba histolytica* : New perspectives in rational drug design. *Arch. Med. Res.* **27**: 257-64.
- **Salata, R. A., Ravdin, J. I.** 1998. Immunoprophylaxis. *En Amebiasis.* Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin ed. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York. pp 785-92.
- **Santos, C. D., Levy, A. M., Toldo, M. P., Azevedo, A. P., do Prado, J. C.** 2007. Haematological and histopathological findings after ovariectomy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Vet Parasitol.* **143**: 222-228.
- **Sapino, A., Cassoni, P., Ferrero, E., Bongiovanni, M., Righi, L., Fortunati, N., Crafa, P., Chiarle, R., Bussolati, G.** 2003. Estrogen receptor alpha is a novel marker expressed by follicular dendritic cells in lymph nodes and tumor-associated lymphoid infiltrates. *Am J Pathol.* **163**: 1313-1320.
- **Satoskar, A., Al-Quassi, H. H., Alexander, J.** 1998. Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN-gamma production by female but not male DBA/2 mice. *Immunol. Cell Biol.* **76**:159-66.
- **Schuurs, A. H., Verheul, H. A.** 1990. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid. Biochem.* **35**: 157-72.
- **Scotti, M. A., Place, N. J., Demas, G. E.** 2007. Short-day increases in aggression are independent of circulating gonadal steroids in female Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Horm Behav.* **52**: 183-90.
- **Seydel, K. B., Smith, S. J., Stanley, S. L. Jr.** 2000. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect. Immun.* **68**: 400-2.
- **Sharma, M., Vohra, H., Bhasin, D.** 2005. Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology.* **131**:783-96.
- **Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V., Martínez-Palomo, A.** 1992. Early invasive intestinal amebiasis in Mongolian gerbils. *Arch. Med. Res.* **23**:187-90.
- **Shiddo, S. A., Aden Mohamed, A., Akuffo, H. O., Mohamud, K. A., Herzi, A. A., Herzi Mohamed, H., Huldtt, G., Nilsson, L. A., Ouchterlony, O., Thorstensson, R.** 1995. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of markers of infection and disease manifestations in a village in an endemic area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 361-5.
- **Shiff, C. J., Cmelik, S. H., Ley, H. E., Kriel, R. L.** 1972. The influence of human skin lipids on the cercarial penetration responses of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **58**: 476-80.

- **Sim, S., Yong, T. S., Park, S. J., Im, K. I., Kong, Y., Ryu, J. S., Min, D. Y., Shin, M. H.** 2005. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* **174**: 4279-88
- **Sogin, M. L., Gunderson, J. H.** 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA *Giardia lamblia*. *Science.* **243**:75-7.
- **Sourla, A. Martel, C. Labrie, F.** 1998. Almost exclusive androgenic action of dehydroepiandrosterone in the rat mammary gland. *Endocrinology.* **139**: 753-64.
- **Spellberg, B., Edwards, J. E.** 2001. Type 1/Type 2 Immunity in infections diseases. *Clin Inf Dis.* **32**: 76-102.
- **Stanley Jr, S. L.** 2003. Amoebiasis. *Lancet.* **361**:1025-34.
- **Sulcova, J., Hill, M., Starka, L.** 1997. Age sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J. Endocrinol.* **154**: 57-52.
- **Svec, F., Porter, J. R.** 1998. The actions of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **218**: 174-91.
- **Tanimoto-Weki, M., Vázquez-Saavedra, J. A., Calderón-Lara, P., Aguirre-García, J.** 1973. Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amibiano axénico en el hámster. *Arch. Invest. Méd.* **4**:147-54.
- **Tannenbaum, C., Barrett-Connor, E., Laughlin, A. G., Platt, W. R.** A longitudinal study of dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) change in older men and women: the Rancho Bernardo Study. *Eur. J. Endocrinol.* **151**: 717-25.
- **Tian, W. N., Braunstein, L. D., Pnsg, J., Stuhlmeier, K. M. Xi, Q. C., Tian, X., Stanton, R. C.** 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol. Chem.* **273**: 10609-17.
- **Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velazquez, F., Martínez-Palomo, A.** 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* **117**:81-91.
- **Verthelyi, D.** 2001. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int. Immunopharmacol.* **1**: 983-93.
- **Wang, W., Keller, K., Chadee, K.** 1992. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect Immun.* **60**: 3169-74.
- **Wang, W., Keller, K., Chadee, K.** 1994. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology.* **83**: 601-10.
- **Wang, W., Chadee, K.** 1995. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect. Immun.* **63**: 1089-94.
- **Webster, M., Libranda-Ramirez, B.D., Aligui, G. D., Olveda, R. M., Ouma, J. H., Kariuki. H. C., Kimani, G., Olds, G. R., Fulford, A. J., Butterworth, A. E., Dunne, D. W.** 1997. The influence of sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in human populations in Kenya and the Philippines. *Parasitology.* **114**: 383-93.
- **Weigle, K. A., Santrich, C., Martinez, F., Valderrama, L., Saravia, N. G.** 1993. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environmental and behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. *J. Infect. Dis.* **168**: 709-14.
- **Wildling, E., Winkler, S., Kremsner, P. G., Brandts, C., Jenne, L., Wernsdorfer, W. H.** 1995. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop. Med. Parasitol.* **46**: 77-82.
- **World Health Organization.** 1969. Amebiasis. Geneva report of a WHO. Expert Committe. WHO. Tech. Rep. Ser. No. 40.
- **Wunderlich, F., Marinovski, P., Benten, W. P., Schmitt-Wrede, H. P., Mossmann, H.** 1991. Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasite. Immunol.* **13**: 357-67.
- **Yang, J. Y., Schwartz, A., Henderson. E. E.** 1993. Inhibition of HIV-1 latency reactivation by dehydroepiandrosterone (DHEA) and an analog of DHEA. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **9**: 747-54.
- **Yin, G., Guo, Z., Yin, L., Zhao, J., Qiao, Z., Frank, W.** 1998. Effect of testosterone on *Leishmania donovani* infection levels of murine bone marrow derived-macrophages. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* **16**: 251-5.
- **Yoshida, S., Honda, A., Matsuzaki, Y., Fukushima, S., Tanaka, N., Takagiwa, A., Fujimoto, Y., Miyazaki, H., Salen, G.** 2003. Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines. *Steroids.* **68**:73-83.

- **Zhang, H., Zhao, J., Wang, P., Qiao, Z.** 2001. Effect of testosterone on *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitol. Res.* **87**: 674-6.
- **Zhang Z, Mahajan S, Zhang X, Stanley SL Jr.** 2003. 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.* **71**: 5355-9.
- **Zuk, M., McKean, K. A.** 1996. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int. J. Parasitol.* **26**: 1009-24.

# **APÉNDICE**

## **Artículos publicados**

## The genome project of *Taenia solium*

Hugo Aguilar-Díaz<sup>a</sup>, Raúl J. Bobes<sup>a</sup>, Julio C. Carrero<sup>a</sup>, Rafael Camacho-Carranza<sup>a</sup>,  
Claudia Cervantes<sup>a</sup>, Miguel A. Cevallos<sup>b</sup>, Guillermo Dávila<sup>b</sup>, Mauricio Rodríguez-Dorantes<sup>a</sup>,  
Galileo Escobedo<sup>a</sup>, José Luis Fernández<sup>b</sup>, Gladis Fragoso<sup>a</sup>, Paul Gaytán<sup>c</sup>, Alejandro Garciarubio<sup>c</sup>,  
Victor M. González<sup>b</sup>, Lorena González<sup>c</sup>, Marco V. José<sup>a</sup>, Lucía Jiménez<sup>d</sup>, Juan P. Lacleste<sup>a,\*</sup>,  
Abraham Landa<sup>d</sup>, Carlos Larralde<sup>a</sup>, Jorge Morales-Montor<sup>a</sup>, Enrique Morett<sup>c</sup>,  
Pedro Ostoa-Saloma<sup>a</sup>, Edda Sciutto<sup>a</sup>, Rosa I. Santamaría<sup>b</sup>, Xavier Soberón<sup>c</sup>,  
Patricia de la Torre<sup>a</sup>, Víctor Valdés<sup>e</sup>, Jorge Yáñez<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>c</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>d</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>e</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Available online 6 December 2005

### Abstract

We have constituted a consortium of key laboratories at the National Autonomous University of Mexico to carry out a genomic project for *Taenia solium*. This project will provide powerful resources for the study of taeniasis/cysticercosis, and, in conjunction with the *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* genome project of expressed sequence tags (ESTs), will mark the advent of genomics for cestode parasites. Our project is planned in two consecutive stages. The first stage is being carried out to determine some basic parameters of the *T. solium* genome. Afterwards, we will evaluate the best strategy for the second stage, a full blown genome project. We have estimated the *T. solium* genome size by two different approaches: cytofluorometry on isolated cyton nuclei, as well as a probabilistic calculation based on ~2000 sequenced genomic clones, ~3000 ESTs, resulting in size estimates of 270 and 251 Mb, respectively. In terms of sequencing, our goal for the first stage is to characterize several thousand EST's (from adult worm and cysticerci cDNA libraries) and genomic clones. Results obtained so far from about 16,000 sequenced ESTs from the adult stage, show that only about 40% of the *T. solium* coding sequences have a previously sequenced homologue. Many of the best hits are found with mammalian genes, especially with humans. However, 1.5% of the hits lack homologues in humans, making these genes immediate candidates for investigation on pharmaco-therapy, diagnostics and vaccination. Most *T. solium* ESTs are related to gene regulation, and signal transduction. Other important functions are housekeeping, metabolism, cell division, cytoskeleton, proteases, vacuolar transport, hormone response, and extracellular matrix activities. Preliminary results also suggest that the genome of *T. solium* is not highly repetitive.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Parasite; Genomics; *Taenia solium*; Cysticercosis

### 1. The advent of parasite genomics

The emergence of genomics during the past decade was the product of the ingenious development of high throughput biochemical methods of DNA sequencing and the no less

ingenious design of powerful bioinformatics tools able to process and store large amounts of sequence data, making them accessible for the public. Only two genomes of human parasites are completely sequenced and available; for 4 more genomes, sequencing has been finished and are in the process of assembly and annotation, while 13 more are in progress, including the expressed sequence tags (ESTs) projects of the taeniids *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* [1].

\* Corresponding author. Tel.: +52 5 5622 3862; fax: +52 5 5550 6447.

E-mail address: [lacleste@biomedicas.unam.mx](mailto:lacleste@biomedicas.unam.mx) (J.P. Lacleste).

We now approach the possibility of a holistic understanding of parasitism through genomics (Parasite Genomics) as a fascinating perspective in biology, with implications for human health and economy [2]. Parasite Genomics will aid to address fundamental questions such as the origin and evolution of parasites [3,4]; the molecular basis of host–parasite specificity [5]; the definition and dynamics of the parasites host range [6]; the mechanisms of parasite pathogenesis [7]; the various mechanisms that parasites use to evade the host's immune response [8]; the signaling that controls the regulation of genes in the differentiation stages within the parasite life cycle in concert with those of the hosts physiology [9]; the complete antigen profile of a given parasite for vaccine and diagnostics development [10–12]; the complete and precise connectivity between the host and the parasite metabolic pathways for a strategic drug design [13], among others.

## 2. Comparative parasite genomics

Some contributions on human parasites come from phylogenetical and evolutionary studies of Comparative Genomics: comparison among parasite genomes help to understand evolutionary events that generated genetic diversity [4]; some gene sequences associated with the parasite's survival in its host display high levels of identity among related parasite species [8]; other genes are clearly associated to symbiotic parties including parasites [3]. Comparative studies among parasites have also identified potentially useful sequences for multiple diagnosis of parasite species [14]. Host–parasite meta-genomes establish a plastic network of interactions, largely through mutual regulation of gene expression, to deal with selective pressures from inside and outside a given host–parasite relationship [15]. The set of genes which code for different proteins in parasites shows remarkable concordance with the requirements imposed by the environmental niche in which the parasite resides within the host, a feature possibly involved in host, cell and tissue specificity of the parasite [16]. Horizontal gene transfer between parasites and hosts, some involving viral–bacterial–parasite–host chains might be of great consequence for the evolution of hosts and parasites [17].

The strategies that parasites use to evade the host defense mechanisms are diverse, some involving modification of their displayed antigens as well as of the host physiology [8]. *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum* provide prime examples of antigen variation within the same host, which results from the successive activation of genes that code for different surface antigens, allowing them to expose hundreds of antigen variants and evade the hosts immune response [8,18]. The evolution of parasitism certainly involves a series of adaptations, including the loss of genes, as indicated by the absence of proteins widely distributed in eukaryotes [19]. Parasitism seems to involve “an increasing employment of the metabolic machinery of the host for most of the parasite's requirements, although not all losses are easily explained” [4]. As a result of the loss of genes and lineage-specific innovation, parasites proteomes are somewhat different from other non-parasitic eukaryotes that have similar number

of genes. Parasite's proteome has a great component associated with pathogenesis, evasion of immune response and post-transcriptional regulation [4]. There is a debate concerning the processes by which identical duplicated genes diverge in sequence and function. It is clear that after gene duplication, one copy can be subjected to silencing by degenerative mutation, but also, both copies can be preserved through natural selection, specially if one suffered mutations that slightly alter its function (paralog conversion), resulting in new properties. As an example, it has been suggested that there is a connection between the rates of intron gain/loss and protein evolution in malaria parasites [20].

An intriguing aspect of parasitism is the parasite's restricted host range, or host specificity, which varies from several to a single host species. A number of plausible mechanisms may be involved but hard data qualifying the speculations are still scarce. The availability of complete genomes of both parasite and host may enlighten the issue of specificity, when based on their differences and on their similarities, as well as recognize possible parasite niches within other eukaryotes [21]. Thus, complete genomes of potential hosts, when compared with established hosts, may allow for predictions for the most likely expansion of the parasites' host range based on their homology.

## 3. *Taenia solium*

Cestodes are Platyhelminthes that originally parasitized a number of predator–prey associations. It is conceivable that *T. solium* eventually colonized humans that scavenged their kills, and their associated parasites were passed intraspecifically to other humans and to the first domesticated pigs [22]. Progressively, the population growth of human species, the intensive rearing of pigs, the facilitation of human migration carrying along the porcine stock and rustic forms of rearing, firmly rooted the parasite and distributed it worldwide [23].

The metacestode stage (cysticercus) of the tapeworm *T. solium* causes neurocysticercosis in humans, a debilitating and not rarely mortal disease of insidious onset, difficult diagnosis and not thoroughly resolved by treatment. It is claimed to be the Third World's major parasite responsible for brain disorders. Nowadays *T. solium* infects ~50 million people worldwide and millions of their porcine livestock, and is now considered an emergent disease in developed countries mainly brought-in by migrant workers from countries where the disease is endemic [24]. Practically neglected for decades in the twentieth century [25], research on *T. solium* in the last decades has recruited scientists from all over the world [26].

Because of the *T. solium* great damaging impact on human health and economy of developing countries, most of the current research focuses on the study of clinical aspects of the human disease and in developing diagnostic, therapeutic and prophylactic technologies. Studies on the biology of the parasite are underway in laboratories of Mexico, where many important questions could find an answer, and provide stronger strategies for control. To this end, we have constituted a consortium of key laboratories at the National Autonomous University of Mexico to carry out a genomic project for *T.*



*solium*. This project will provide powerful resources for the study of taeniasis/cysticercosis, and, in conjunction with the *E. granulosus* and *E. multilocularis* genome project of EST, will mark the beginning of genomics for cestode parasites. Our project is planned in two consecutive stages. The first stage is being carried out to determine some basic parameters of the *T. solium* genome: size, karyotype, gene density, diversity of repeated sequences, highly abundant transcripts, intron density and average size, etc. Afterwards, we will evaluate the best strategy for the second stage, a full blown genome project.

We have estimated the genome size by two different approaches: cytofluorometry on isolated cyton nuclei from *T. solium* metacestodes, stained with propidium iodide, and by means of probabilistic calculations on the coding density of the genome (based on ~2000 sequenced genomic clones, ~3000 ESTs, and a tentative gene number of 17,000), resulting in size estimates of 270 and 251 Mb, respectively.

In terms of sequencing, our goal for the first stage is to characterize several thousand ESTs (from adult worm and cysticerci cDNA libraries) and genomic clones. Results obtained so far from about 16,000 ESTs reads from an adult worm cDNA library, show that only about 40% of the *T. solium* coding sequences have a previously sequenced homologue in the nr protein database. The hit rate with SwissProt is about 24%, with many of the best hits to mammalian genes, especially humans. However, ~1.5% of the SwissProt hits lack homologues in humans, making these genes immediate candidates for investigation on pharmaco-therapy, diagnostics and vaccination. As expected for a metazoan eukaryote, many *T. solium* ESTs are related to gene regulation and signal transduction. Other important functions are protein synthesis, housekeeping, metabolism, cell division, cytoskeleton, proteases, vacuolar transport, hormone response, and extracellular matrix activities.

Results from the sequencing of genomic clones indicate that coding density for the *T. solium* genome appears relatively high: ~9% of all nucleotides are involved in protein coding. Intron size and number within genes appears unexceptional. Preliminary results also suggest that highly repetitive sequences comprise less than 5% of the genome. Many genes show duplications with highly divergent introns, suggesting that these events are not recent. As the project has been conceived as an assemblage of human and physical resources in parasitology, molecular biology and bioinformatics, all data and materials are immediately available to members of the consortium. Information obtained will be annotated and made public soon. At present, there is no generally agreed method as to how this might be done and several schemes are being considered [27].

Development of the project will result in a series of useful products including: cDNA coding sequences to be used as templates for the study of individual genes; as the project is planned to include extensive sequencing of ESTs from eggs, larval and adult stages, maintaining a plasmid backup for each identified coding sequence. Templates will be available upon request to the consortium for future use. Synthetic oligonucleotides from identified ESTs will be produced for the study of

gene expression or transcriptional analysis through microarrays. A database containing updated information of the sequencing progress, include all genomic and ESTs sequences, BAC maps, as well as repositories of other data generated by the consortium.

These tools will make proteomics more accessible for the study of the cysticerci responses to different conditions: drug treatment, stress, human vs. pig, geography (cysticerci from different countries), interaction with human hormones, etc. Other questions such as host-parasite gene transfer, parasitism-specific and host-specificity genes, analysis of promoter genes for the development of transformation vectors to express particular proteins or the possible use of cysticerci as bioreactors.

#### 4. Concluding remark

*T. solium* disease poses unique biological questions and medical needs as to merit the development of a complete genome project. The consortium for the *T. solium* genome project wishes to use this international symposium on Cestode Parasites to make a worldwide call for collaborative research.

#### Acknowledgments

This project is supported by a special grant IMPULSA 3, UNAM.

#### References

- [1] Expressed Sequence Tag (EST) analysis of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Echinococcus/>.
- [2] Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* 2004; 22(306):640–3.
- [3] Bird DM, Opperman CH, Davies KG. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. *Int J Parasitol* 2003;30: 1269–76.
- [4] Templeton TJ, Iyer LM, Anantharaman V, Enomoto S, Abrahante JE, Subramanian GM, et al. Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome Res* 2004;14:1686–95.
- [5] Janssen CS, Phillips RS, Turner CM, Barrett MP. *Plasmodium* interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. *Nucleic Acids Res* 2004;26:5712–20.
- [6] Fallon SM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *J Parasitol* 2003;89:1044–7.
- [7] Ahmed N, Hasnain SE. Genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: old threats and new trends. *Indian J Med Res* 2004;120:207–12.
- [8] Kraemer SM, Smith JD. Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the *Plasmodium falciparum* var gene family. *Mol Microbiol* 2003;50:1527–38.
- [9] Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki LS, Alves JM, Serrano MG, et al. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 2004;28:1107–12 (Erratum in: *Nature* 2004; 18: 415).
- [10] Blake DP, Hesketh P, Archer A, Carroll F, Smith AL, Shirley MW. Parasite genetics and the immune host: recombination between antigenic types of *Eimeria maxima* as an entree to the identification of protective antigens. *Mol Biochem Parasitol* 2004;138:143–52.
- [11] Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, et al. A. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine

- targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol* 2003;33:621–40.
- [12] Abbasi I, Branzburg A, Campos-Ponce M, Abdel Hafez SK, Raoul F, Craig PS, et al. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:324–30.
- [13] Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 2004;12:79.
- [14] Walther M, Muller R. Diagnosis of human filariases (except onchocerciasis). *Adv Parasitol* 2003;53:149–93.
- [15] Daily JP, Le Roch KG, Sarr O, Fang X, Zhou Y, Ndir O, et al. In vivo transcriptional profiling of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2004;5:30.
- [16] Chemale G, van Rossum AJ, Jefferies JR, Barrett J, Brophy PM, Ferreira HB, et al. Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics* 2003;3:1633–6.
- [17] Scholl EH, Thorne JL, McCarter JP, Bird DM. Horizontally transferred genes in plant-parasitic nematodes: a high-throughput genomic approach. *Genome Biol* 2003;4.
- [18] Donelson JE. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop* 2003;85:391–404.
- [19] Waters E, Hohn MJ, Ahel I, Graham DE, Adams MD, Barnstead M, et al. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12984–8.
- [20] Castillo-Davis CI, Bedford TB, Hartl DL. Accelerated rates of intron gain/loss and protein evolution in duplicate genes in human and mouse malaria parasites. *Mol Biol Evol* 2004;21:1422–7.
- [21] Coppel RL, Black CG. Parasite genomes. *Int J Parasitol* 2005;35:465–79.
- [22] Hoberg EP. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socio-economic significance. *Microbes Infect* 2002;4:859–66.
- [23] Sciuotto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleite JP, Sotelo J, Aluja A, et al. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2000;2:1875–90.
- [24] White Jr AC. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infect Dis* 1997;24:101–13.
- [25] Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran E. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press; 1982.
- [26] Sciuotto E, Fragoso G, Fleury A, Chavarria A, Vega R, Yañez O, et al. *Taenia solium* cysticercosis of humans and pigs: a review of our contributions and perspectives in the research of its complexities. *Recent Res Devel Infect Immun* 2003;1:475–97.
- [27] Berry AE, Gardner MJ, Caspers GJ, Roos DS, Berriman M. Curation of the *Plasmodium falciparum* genome. *Trends Parasitol* 2004;20:548–52.



## Original article

Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*Julio C. Carrero<sup>a</sup>, Claudia Cervantes<sup>a</sup>, Norma Moreno-Mendoza<sup>b</sup>, Emma Saavedra<sup>c</sup>, Jorge Morales-Montor<sup>a</sup>, Juan P. Lacleste<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., AP 70228, 04510 Mexico D.F., Mexico<sup>b</sup> Department of Cellular Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., AP 70228, 04510 Mexico D.F., Mexico<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Cardiología, 14080 Mexico D.F., Mexico

Received 23 June 2005; accepted 27 June 2005

Available online 04 October 2005

## Abstract

In vitro exposure of *Entamoeba histolytica* trophozoites to the sex steroids 17 $\beta$ -estradiol, progesterone, and dehydrotestosterone had little effect on parasite viability or proliferation. However, treatment with the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA) markedly inhibited parasite proliferation, adherence and motility, and at a certain dose it induced trophozoite lysis. The opposite effect on proliferation was found when the trophozoites were exposed to cortisol. Moreover, DHEA decreased while cortisol increased the parasite's DNA synthesis determined by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. Trophozoite lysis by DHEA appeared to be caused by a necrotic rather than an apoptotic process, as observed in propidium iodide and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling assays. A possible mechanism of action was derived from experiments demonstrating that the activity of a putative 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase detected in trophozoite extracts was inhibited in the presence of DHEA. Contrary to its in vitro inhibitory effect, in vivo administration of DHEA to infected hamsters resulted in exacerbation of the amebic liver abscesses. These results demonstrated that androgen steroids act directly upon *E. histolytica* growth and viability, and may shed new light on some age and gender differences in disease progression, as well as finding application in the drug treatment of human amebiasis.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*; Steroid hormones; DHEA; Cortisol; Proliferation; 3-Hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase

## 1. Introduction

The host–parasite interplay in human amebiasis is extremely complex and the immune response has traditionally been considered paramount in controlling the infection and limiting the pathogenesis [1]. Paradoxically, the immune response has also been involved as a cause of pathogenesis, at least in the experimental models of amebic liver abscess

(ALA) in hamster [2] and intracecal amebiasis in mice [3]. The outcome of the amebic infection mostly depends on a balance between the host immune response and the virulence of the infecting inocula, which varies among isolates of *Entamoeba histolytica* from different sources [4]. Many details about this complex interplay remain to be elucidated.

Recent studies have invoked the interaction between the neuroendocrine and the immune systems as a new protagonist in the regulation of anti-parasite responses [5]. For instance, it has been shown that the hypothalamic–pituitary–adrenal axis modulates the immune response [6], whereas the hypothalamic–pituitary–gonadal axis is sensitive to it [7]. Hormones produced by both axes have been involved in the regulation of host–parasite interactions, particularly in schistosomiasis and cysticercosis [8,9].

The possibility of direct effects of sexual and adrenal-steroid hormones on parasite physiology, without interven-

**Abbreviations:** ALA, amebic liver abscess; Cor, cortisol; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEA-S, dehydroepiandrosterone sulfate; DHT, dehydrotestosterone; E2, 17 $\beta$ -estradiol; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA; P4, progesterone; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling.

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

E-mail address: [lacleste@servidor.unam.mx](mailto:lacleste@servidor.unam.mx) (J.P. Lacleste).

tion of the immune system, should not be ruled out. In fact, in vitro assays have shown diverse effects of sex and adrenal steroids on parasite growth and proliferation. For example, estrogen, testosterone and progesterone treatment on insects stimulated the proliferation of their protozoan and helminth parasites [10]. Similarly, 17 alpha and beta-estradiol stimulated growth of *Trichomonas vaginalis*, whereas progesterone and testosterone were inhibitory [11]. In vivo treatment of the rodent *Calomys callosus* with progesterone, estrogens or a combination of both, resulted in decreased *Trypanosoma cruzi* parasitemia [12], whereas *Leishmania major* systemic infection of mice was strongly affected by testosterone [13]. In vitro treatment of *P. falciparum* merozoites with cortisol, insulin, estradiol, progesterone and testosterone, resulted in considerable rise in the production of gametocytes, and therefore in the proliferation of this parasite [14]. In contrast, dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA-sulfate (DHEA-S) and its analog 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterone have shown antimalarial activity against several strains of *Plasmodium falciparum* in vitro and *P. berghei* in vivo [15]. Interestingly, high circulating levels of DHEA-S in Kenyan pubertal girls correlated with lower *P. falciparum*'s parasitemia suggesting a predictive role for this hormone in malaria [16]. Proliferation and survival of *Cryptosporidium parvum* in multiple animal models were also down-regulated by treatment with DHEA [17–19].

Little is known about the influence of hormones on amebiasis, with the exception of some former studies revealing progesterone as a promoter of trophozoite migration from cecum to liver in animal models [20]. No studies focusing on the direct effect of hormones on *E. histolytica* are available, in spite of the fact that incidence of intestinal amebiasis is considerably higher in infants and old people [21], or that ALA and other amebic invasive diseases (ameboma, colonic perforation, appendicitis, peritonitis) are more frequent in adults and three to four times more common in males than in females [22–24]. As the ratio of human asymptomatic infection appears to be equal between males and females [23] and the rate of general intestinal infection higher in females [24], the reason of the increased frequency of invasive amebiasis in males is disconcerting. The goal of the present study was to investigate if sexual and adrenal steroid hormones have a direct in vitro effect upon amebic reproduction, viability and infectivity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Culture grade human steroid hormones 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), progesterone (P<sub>4</sub>), dehydrotestosterone (DHT), DHEA and cortisol (Cor) were purchased from Sigma, St. Louis, MO. Water soluble E<sub>2</sub>, and P<sub>4</sub>, were dissolved in AIM-V cell culture medium (GIBCO), while T<sub>4</sub>, DHT, DHEA and Cor were dissolved in ethanol to the desired stock concentration, and

sterilized by passage through a 0.2 mm millipore filter. Tritiated thymidine (methyl-<sup>3</sup>H TDR, sp act. 247.9 GBq mmol<sup>-1</sup>) was purchased from NEN, Boston, MA; the apoptosis and necrosis kit were from Roche, Indianapolis, IN; 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA (HMG-CoA), glucose-6-phosphate, NADP<sup>+</sup> and NADPH were from Sigma, St. Louis, MO. All other reagents were purchased from common commercial sources.

### 2.2. Culture and harvesting of *E. histolytica* trophozoites

Axenic HM1:IMSS *E. histolytica* trophozoites were maintained in TYI-S-33 medium supplemented with 15% adult bovine serum (Biofluids), 3% Diamond's vitamin mix (JRH, Biosciences), 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin sulfate at 37 °C in anaerobic conditions. Trophozoites grown for 72 h (log-phase) were harvested by ice-chilling the tubes for 10 min and centrifugation at 150  $\times$  g during 5 min at 4 °C.

### 2.3. Treatment of trophozoites with hormones

Harvested trophozoites (1  $\times$  10<sup>5</sup>) were cultured during 72 h at 37 °C in 2 ml of fresh supplemented TYI-S-33 medium added with different concentrations of E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> and DHT (0.1, 1, 5, 10, 20, 50 and 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>); DHEA (0.01, 0.1, 3, 6, 12, 25, 50 and 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) and Cor (0.1, 1, 10, 25, 50, 100 and 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Control cultures of amebas were grown in the presence of the same amount of the hormone vehicle (AIM-V and ethanol), never exceeding 5% of the total volume, and run in parallel with the experimental groups. Viable trophozoites were counted each 24 h by ice-chilling the tubes during 5 min and counting amebas from an aliquot of 100  $\mu$ l in the presence of Trypan blue stain under light microscope. Each experiment was run in triplicate and was repeated at least three times. The minimal dose affecting the viability of the trophozoites, was determined from dose–response curves for each hormone, to be used in subsequent experiments.

### 2.4. Incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine

HM1:IMSS trophozoites (1  $\times$  10<sup>5</sup>) were grown under the conditions described above in 200  $\mu$ l of media in 96-well plates. Triplicates of some wells were added with DHEA or Cor at 50  $\mu$ g per well and incubated for 12 h at 37 °C before the cultures were pulsed with 1  $\mu$ Ci per well <sup>3</sup>H-thymidine prepared in TYI-S-33 medium. After incubation for 24 h, the plates were chilled on ice for 5 min and the cells harvested on glass fiber filters (Wallac Oy, Turku, Finland) using an automatic cell harvester (Skatron Instruments, Mod 11028, Oslo, Norway). Dry filters were soaked with scintillation liquid, introduced in sample bags, sealed, and the <sup>3</sup>H-thymidine incorporated to the ameba DNA was determined in a 1205 Betaplate scintillation counter (Wallac Mod 1205, Turku, Finland).

### 2.5. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling (TUNEL) and propidium iodide stainings

Trophozoites from cultures treated with  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  DHEA for 2, 12, 24 and 48 h were harvested by ice-chilling and centrifugation, washed three times in cold phosphate buffer (PBS) pH 7.4, counted under light microscope, adjusted to  $1 \times 10^6$  per ml, and fixed in 4% paraformaldehyde. For TUNEL, a fraction of the fixed trophozoites was permeabilized by treatment with Triton X-100 followed by labeling with a commercially available fluorescence-based TUNEL kit following the manufacturer's instructions. Another fraction of fixed trophozoites was stained with propidium iodide at  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  for 3 min, washed three times in cold-PBS by centrifugation, mounted on slides and viewed under fluorescent light using a rhodamine filter.

### 2.6. Detection of amebic enzymes HMG-CoA reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and their inhibition by DHEA

Trophozoites in logarithmic phase of growth (72 h) were harvested by ice-chilling and washed three times with cold-PBS by centrifugation at  $150 \times g$  during 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . The parasites ( $1 \times 10^8$ ) were resuspended in 5 ml of a buffer containing a protease inhibitor (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0, 5 mM DTT and 1 mM PMSF), lysed by several cycles of freezing in liquid nitrogen–thawing, centrifuged at  $39,000 \times g$  during 20 min, and the supernatant immediately used for determination of protein concentration (Bradford method) and detection of the enzymes. HMG-CoA reductase activity was determined at  $37^\circ\text{C}$  by adding different concentrations of the extract (7.5, 15, 30, 60, 90 and  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) to the reaction buffer mix (150 mM Naphosphate, 75 mM NaCl and 10 mM each of acetic acid, MES and TRIS adjusted at pH 6.0), 0.15 mM NADPH, 1 mM EDTA and 10 mM DTT. The reaction was initiated by adding different concentrations of HMG-CoA. NADPH oxidation by HMG-CoA reductase activity was monitored at 340 nm in a spectrophotometer. Spurious NADPH oxidation was always subtracted before adding a specific substrate. The enzyme pH dependency was carried out in the same buffer mix adjusted at 0.5 pH intervals. The stability of the enzyme activity was not altered during the period of the assay (2–3 min) at the low and high pH values. G6PDH enzyme activity was determined at  $37^\circ\text{C}$  by adding different concentrations of trophozoite extract (7.5, 15, 30, 60, 90 and  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) to the reaction buffer containing 0.1 M Tris-HCl pH 8.1, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and 1 mM  $\text{NADP}^+$ . The reaction was initiated by adding different concentrations of glucose-6-phosphate. NADPH production by G6PDH was determined at 340 nm in a spectrophotometer. Inhibition of HMG-CoA reductase by DHEA was determined by adding variable concentrations (0.025–0.4 mM) of this hormone dissolved in ethanol. Control reactions were performed in presence of the same volume of ethanol used with DHEA.

### 2.7. Treatment of hamsters with DHEA and induction of ALA

Groups of six 6–8-week-old male golden hamsters (*Mesocricetus aureatus*) of about 100 g each were intraperitoneally treated with 1, 60 and  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  of DHEA prepared in  $100 \mu\text{l}$  of pure ethanol during 10 days. Control groups with the same number of animals received only  $100 \mu\text{l}$  of pure ethanol. On day 3 of treatment, and previous to the administration of the corresponding daily dose, all animals were infected for induction of ALA. In brief, the hamsters were anaesthetized with anesthesal ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and the portal vein was exposed by laparotomy under aseptic conditions. Trophozoites ( $5 \times 10^5$ ) washed three times in PBS and resuspended in  $200 \mu\text{l}$  were directly inoculated into the portal vein using a tuberculin syringe, and a gel-foam pad was immediately applied at the site of inoculation to avoid bleeding and loss of amebas. Hamsters were sacrificed after 10 days using excess anesthesia. Percent of liver damage was obtained by dividing the total liver weight by the weight of the abscesses of each liver. For histological analysis, liver samples were fixed in 10% formaldehyde in PBS and embedded in paraffin. Tissue sections were evaluated under light microscopy using hematoxylin–eosin staining.

### 2.8. Statistical analysis

Hormone dose–response time curves were estimated in three independent experiments performed with trophozoites that were recently obtained from ALA. Four sex steroids and two adrenal steroids were tested at five different doses; each dose was run in triplicate. The response variable used in statistical analysis was the number of trophozoites at each hormone dose and the time of exposure in each experiment. Experiments of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation were also performed in triplicate. Differences between groups were estimated by the ANOVA test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effect of hormones on viability and growth of *E. histolytica* trophozoites

In order to determine the direct effect of steroid hormones on *E. histolytica*, HM1:IMSS trophozoites were grown in the presence of several sex hormones:  $\text{E}_2$ ,  $\text{P}_4$  and DTH and adrenal hormones Cor and DHEA, testing a wide range of concentrations. The hormone concentrations tested were within the range reported in the serum of feminized mice [25]. Trophozoite growth was not affected by the sex hormones during the 72 h of experimentation at any of the seven concentrations tested ( $0.1$ – $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), with the sole exception of DTH at the highest dose of  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , with which parasite proliferation was totally inhibited after 24 and 48 h of treat-

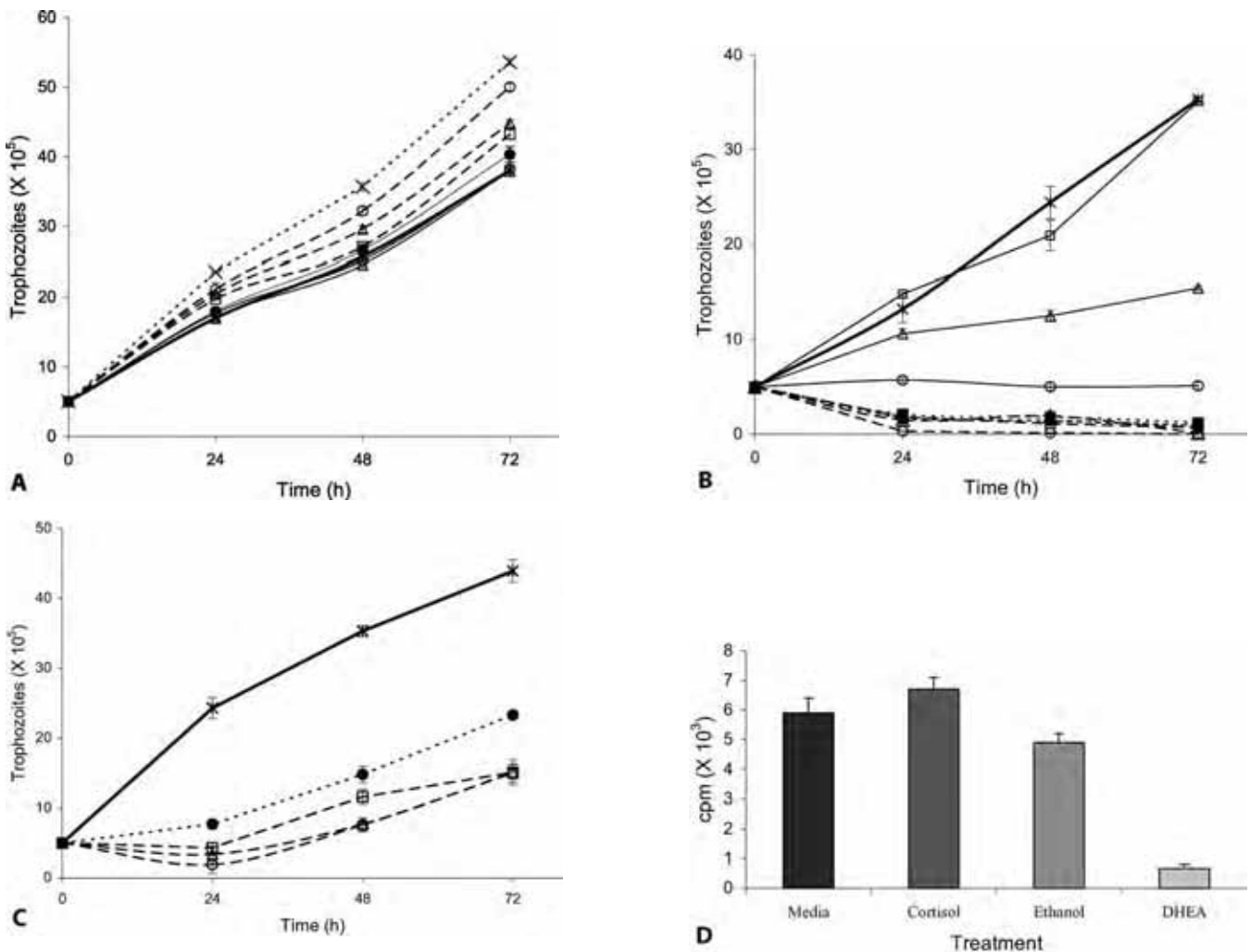


Fig. 1. Effect of human adrenal steroid hormones on the proliferation of *E. histolytica* trophozoites. Parasites were cultured in the absence (---\*) or in the presence of 0.01 (---□---), 0.1 (---△---), 1 (---○---), 2.5 (---■---), 5 (---▲---), 10 (---●---), 25 (---□---), 50 (---△---), 100 (---○---) and 200 (---x---) mg/ml of cortisol (A) or dehydroepiandrosterone (B). The recovery of trophozoites treated for 72 h with the indicated doses of DHEA, and then transferred to fresh medium without hormones is shown in C. Viable cells were counted under light microscopy in the presence of Trypan blue. Values represent the mean  $\pm$  S.D.;  $N = 9$  in each case. In D, the synthesis of DNA in trophozoites treated for 24 h with 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of the hormones was determined by incorporation of tritiated thymidine. Values represent the mean  $\pm$  S.D.;  $N = 3$  in each case.

ment, with a slight recovery at 72 h (not shown). Trophozoites treated with sex hormones were apparently normal in morphology, adherence and motility (not shown).

In contrast, treatment of trophozoites with adrenal hormones affected parasite growth in diverse ways. Thus, Cor induced a slight but constant dose-dependent increase in growth compared to untreated trophozoites, reaching a 66% increase at 72 h with the highest dose of 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Fig. 1A). Significant differences in growth were also observed after 48 h of treatment at doses  $\geq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The opposite effect was observed when trophozoites were treated with DHEA, inhibiting growth even at doses as low as 0.1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Fig. 1B). Significant inhibition compared to the control cultures, was observed with DHEA concentrations  $\geq 0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  at 48–72 h or with  $\geq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , at 24 h. Viability was also affected with all DHEA concentrations in a dose-dependent manner, resulting in 100% of death after 72 h with 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  or after 24 h with 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Fig. 1B). These results demonstrated that

the adrenal hormones Cor and DHEA influence the growth of *E. histolytica* trophozoites, being highly susceptible to down-regulation by DHEA. Under light microscopy, trophozoites treated with Cor were apparently normal in comparison with those treated with DHEA, which showed internal disorganization, loss of motility and adherence, or were completely lysed (not shown). However, trophozoites that survived after 72 h of treatment with DHEA were able to recover when washed and re-cultured in fresh medium without DHEA. Recovery was inversely proportional to the concentration of DHEA used in the initial treatment, suggesting that the deleterious effects of the hormone on trophozoites were reversible (Fig. 1C).

### 3.2. <sup>3</sup>H-thymidine incorporation by trophozoites

Tritiated-thymidine incorporation was evaluated in trophozoites exposed to 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of each tested hormone. As

expected, thymidine incorporation results correlated with those from the viability assays described above; DHEA decreased  $^3\text{H}$ -thymidine uptake by 84%, whereas Cor increased it by 15% (Fig. 1D). Sexual hormones  $\text{E}_2$ ,  $\text{P}_4$ , and DHT showed no significant effect on trophozoite proliferation (not shown).

### 3.3. Characterization of trophozoite death exposed to DHEA

Considering the well-known apoptotic effect of DHEA on several mammalian cell lines [26,27], assays were carried out to determine if this hormone caused trophozoite death by this process or if parasites died due to other causes. As shown in Fig. 2, no fluorescence in the nuclei of treated trophozoites, or abnormal nuclear ultra-structure were seen with TUNEL assays and electron microscopy, respectively. Moreover, incorporation of propidium iodide was observed in most dead parasites (Fig. 2), suggesting that trophozoite treatment with DHEA resulted in non-apoptotic cell death.

### 3.4. Kinetic characterization of *E. histolytica* HMG-CoA reductase activity and its inhibition by DHEA

As previously reported by Reeves [28], G6PDH activity was not detected in the trophozoite extracts, despite several variations in the standard kinetic assay such as changes in the pH of the reaction buffer, lower or higher than usual substrate concentrations, or replacing  $\text{NAD}^+$  for  $\text{NADP}^+$  as cofactor (data not shown). In contrast, a fairly constant HMG-CoA

reductase-like activity was detected in all amoeba extracts tested using spectrophotometric standard kinetic assay conditions. This putative HMG-CoA reductase-like activity measured at  $37^\circ\text{C}$  in freshly prepared clarified extracts with saturating concentration of the substrate HMG-CoA, exhibited rates of  $36.3 \pm 10.4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$  ( $N = 4$ ). The optimal pH of this activity was between 6.0 and 7.0 (not shown). The saturation curve for HMG-CoA displayed hyperbolic kinetics with a  $K_m$  value between 0.4 and 1.0 mM (not shown). A proportional increase in HMG-CoA reductase-like activity was observed with each HMG-CoA addition. However, the enzyme was inhibited at substrate concentrations above 1 mM (not shown).

A representative experiment of the effect of DHEA on HMG-CoA reductase activity at different substrate concentration is shown in Fig. 3A. Double reciprocal ( $1/v$  vs.  $1/[S]$ ) and Dixon ( $1/v$  vs.  $[I]$ ) plots of these type of experiments indicated a competitive or mixed-type inhibition of HMG-CoA by DHEA (data not shown). The effect of DHEA at the highest concentration of substrate tested (0.4 mM) fitted to a first-order exponential decay equation, displayed an  $\text{IC}_{50}$  value of  $71 \mu\text{M}$  ( $N = 2$ ) (Fig. 3B). These results indicate that *E. histolytica* contains active HMG-CoA reductase-like activity which is inhibitable by micromolar concentrations of DHEA.

### 3.5. Effect of DHEA on the development of experimental ALA in hamsters

Preliminary assays in which hamsters were intraperitoneally injected with different amounts of DHEA showed rapid

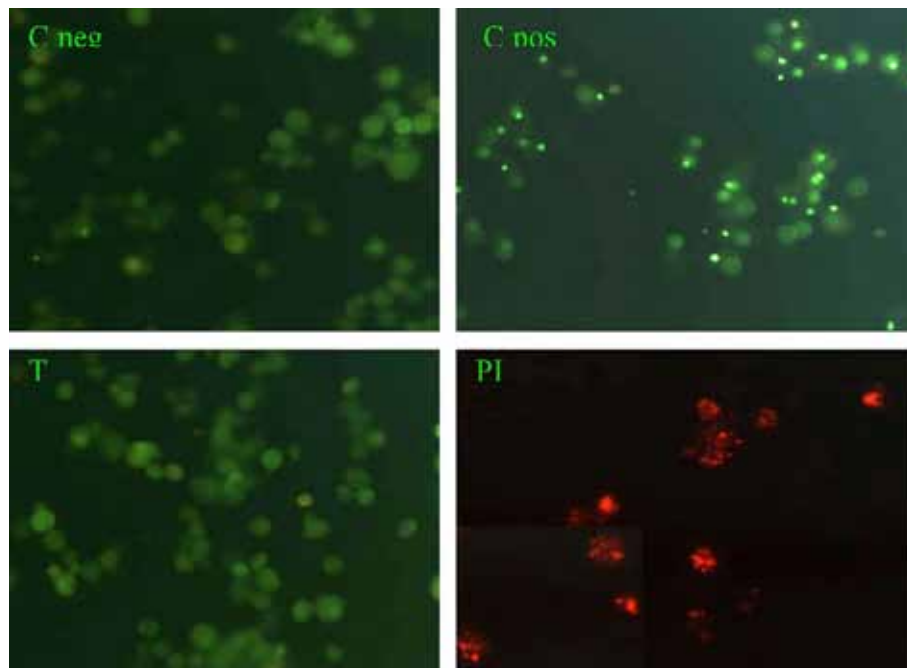


Fig. 2. Evaluation of apoptosis and necrosis in *E. histolytica* trophozoites treated with DHEA. Trophozoites treated with DHEA at  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  during 24 h were washed and processed for a TUNEL assay or propidium iodide staining as described in Section 2. Cneg: trophozoites treated with DHEA but not stained; Cpos: trophozoites treated with DNase; T: trophozoites treated with DHEA and processed for TUNEL; PI: trophozoites treated with DHEA and processed for propidium iodide staining. Magnification:  $20\times$ .

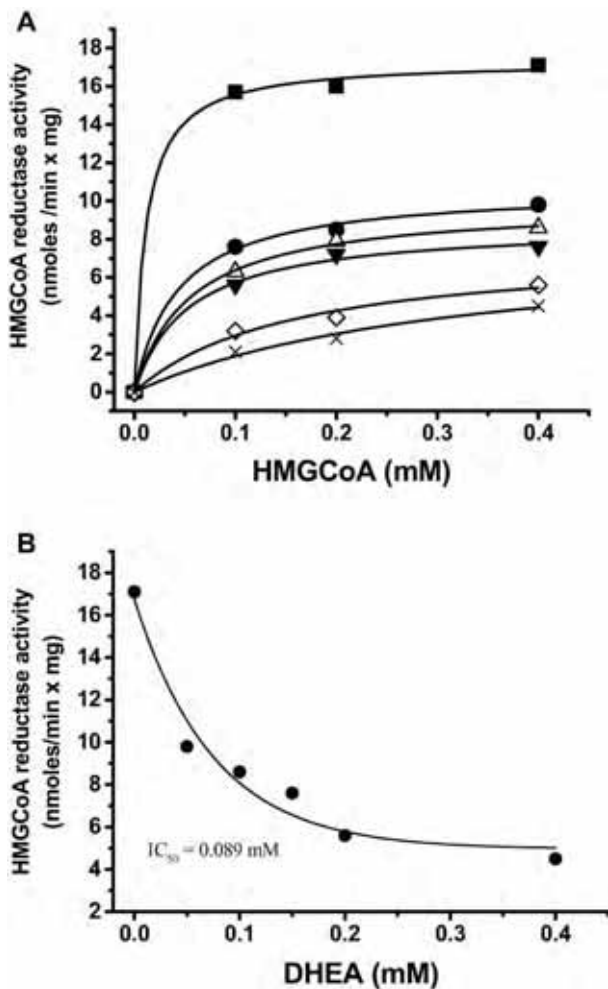


Fig. 3. Effect of DHEA on the activity of the *E. histolytica* HMG-CoA reductase. A: Dose response curve in clarified extracts of trophozoites incubated in the absence (■) or in the presence of 50 (●), 100 (△), 150 (▼), 200 (◇) and 400 (x)  $\mu\text{M}$  of DHEA. B: Determination of the  $\text{IC}_{50}$  for the HMG-CoA reductase at an HMG-CoA concentration of 0.4 mM, adjusting to a first order decay.

production of adherent tissue surrounding intestines, making uncertain the access to the intraportal vein and posing additional difficulties during the surgical procedure (not shown). In subsequent assays, three different doses of DHEA were subcutaneously injected following different protocols (see Section 2). In general, DHEA treatment produced exacerbation of the ALA characterized by increased number of trophozoites in the lesions, compared to untreated controls (Fig. 4A, B). The extension of liver injury and inflammatory infiltrate mainly represented by polymorphonuclear cells and lymphocytes (Fig. 4C, D) correlated with the amount of DHEA administered. ALA exacerbation was also evidenced by an increase in the extension of damage and in the size and weight of the livers (hepatomegaly) in hamsters treated with DHEA (Table 1). Finally, DHEA also increased the percent of successful ALA after intraportal challenge with trophozoites in treated hamsters in comparison to untreated counterparts (Table 1).

#### 4. Discussion

Interest in the influence of sexual dimorphism, particularly of hormones, on host–parasite relationships is currently growing. In this paper, we present evidence on the direct in vitro effect of the adrenal hormones DHEA and Cor on growth and viability of *E. histolytica* trophozoites. Opposite effects were found, DHEA proved to be a potent inhibitor of trophozoite proliferation, starting at doses as low as  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , and Cor a weak stimulator acting only at high concentrations (over  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Sexual steroid hormones  $\text{E}_2$ ,  $\text{P}_4$  and DHT did not affect the growth of trophozoites, except for a minimal decrease produced by DHT at supra-physiological doses of  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . These results suggest that host circulating hormones of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis influence the outcome of the in vivo infection through an effect on *E. histolytica* trophozoites. Nevertheless, we were unable to demonstrate differences in the magnitude and severity of ALA between female and male as well as between young and old hamsters, using the protocol of infection described in Section 2 (not shown).

Direct effects of hormones on growth and viability have been shown in several other parasite organisms. The effects are as diverse as the parasites, specially when dealing with sexual hormones. In contrast, the adrenal hormone DHEA has been shown to mediate only inhibitory actions on parasites *S. mansoni* [9] and *Plasmodium* sp. [29]. Moreover, in vivo evidence on the anti-malarial effect of DHEA came from the inverse correlation found in young women from Kenya, between the levels of blood-circulating DHEA and the parasitemia [16]. A direct stimulatory effect of the stress-released glucocorticoid Cor, similar to the effect described here, has also been shown for *P. falciparum* gametocytes, particularly in choloquine-resistant strains [14].

The mechanism underlying the potent inhibitory effect of DHEA on trophozoite proliferation remains unknown. Previous reports have shown that DHEA inhibits at least two metabolic enzymes, G6PDH and HMG-CoA reductase, in various tumor cell lines [30,31]. In agreement with earlier reports on *E. histolytica* metabolism [28], G6PDH activity was not detected in cytosolic trophozoite extracts even after exhaustive testing. Our results showed that DHEA inhibited a putative HMG-CoA reductase activity in *E. histolytica* trophozoites extracts (Fig. 3). This is the first report of an HMG-CoA reductase-like activity in *E. histolytica*, which is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of mevalonic acid, a precursor of a large family of compounds including cholesterol [32]. Impaired cholesterol synthesis has been related to deficiencies in cell membrane production and activation of DNA polymerases, thereby affecting cellular duplication [33]. Considering previous reports showing that trophozoites are unable to synthesize cholesterol de novo [30], the presence of an HMG-CoA reductase in *E. histolytica* described here seems questionable. However, some lines of evidence support the notion that the activity detected in the trophozoite extracts is related to an HMG-CoA reductase: 1. The reaction was started



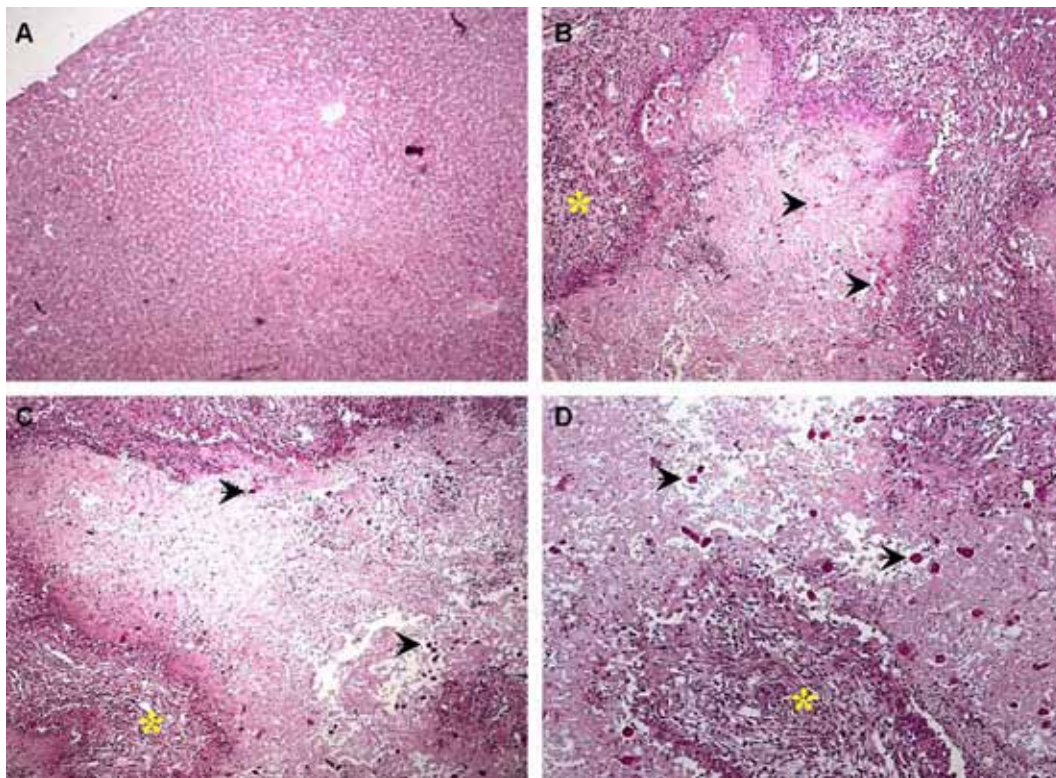


Fig. 4. Effect of DHEA on the development of ALA in hamsters. Tissue sections of ALAs from untreated (A), untreated and infected (B) or treated and infected hamsters with  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  of DHEA (C and D). Some trophozoites are indicated by arrows and inflammatory infiltrate by asterisks. A and B:  $10\times$ ; C and D:  $20\times$ .

with the specific substrate (HMG-CoA) in such way that the small unspecific NADPH-oxidase activities, also present in the trophozoite extracts, were subtracted. 2. Substrate concentrations above  $1 \text{ mM}$  were inhibitory, which is in agreement with the modulation of this enzyme activity described in other organisms [34]. 3. Other possible HMG-CoA-consuming enzymes, such as HMG-CoA synthase and thiolase, have not been reported so far for *E. histolytica* and their activity is not directly associated with NADPH oxidation. 4. The use of acetyl-CoA instead of HMG-CoA in our kinetic assay resulted in NADPH-dependent activity similar to HMG-CoA reductase-like activity that was inhibited by  $5 \text{ mM}$  pyrazole, an inhibitor of NADPH-dependent alcohol dehydrogenases (data not shown). This activity was not inhibited by  $0.4 \text{ mM}$  DHEA (data not shown), suggesting that the NADPH oxidation observed in the presence of HMG-CoA is not related

to the NADPH-dependent alcohol dehydrogenase activity. This assay was performed because acetyl-CoA derived from HMG-CoA decay could act as substrate for aldehyde dehydrogenase to produce acetaldehyde, which could be subsequently transformed to alcohol by NADPH-dependent alcohol dehydrogenase, a well-documented pathway in *E. histolytica* [28]. The presence of an NADPH-dependent HMG-CoA-consuming activity mediated by acetyl-CoA seems unlikely as it requires saturating concentrations of the specific substrates for these coupling enzymes. Therefore, the HMG-CoA reductase-like activity present in the trophozoite extract appears to be a different molecular entity to the NADPH-alcohol dehydrogenase activity.

Although we were unable to identify a coding sequence for HMG-CoA reductase, in the database of the *E. histolytica* genome sequence project (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>), genes encoding other putative enzymes usually located downstream of HMG-CoA reductase and involved in biosynthesis of isoprenoids were predicted from the genome sequence analysis [35]. Moreover, no homologues for one third of the ameba predicted proteins could be identified in public databases [35]. The presence of a HMG-CoA reductase in the *E. histolytica* trophozoites cannot be ruled out.

In addition to the inhibition of enzyme activities, DHEA also induces apoptosis of BV-2 cells in vitro [27]. Apoptosis has been recently reported to occur in protozoa lacking mitochondria [36], however, no evidence concerning apoptosis in *E. histolytica* trophozoites is available. Therefore, we also

Table 1

Macroscopic features of livers from hamsters that were initially treated with different daily doses of DHEA and then infected through the portal vein with *E. histolytica* trophozoites

DHEA dose ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	ALA <sup>a</sup>	Liver weight (g) (mean $\pm$ S.D.)	Lesion score <sup>b</sup> (mean $\pm$ S.D.)
0	8/10	$3.7 \pm 0.18$	$82 \pm 3.5$
1	5/5	$5.7 \pm 2.0$	$85 \pm 6$
60	5/5	$6.2 \pm 1.4^c$	$93 \pm 3^c$
120	10/10	$7.9 \pm 1.4^c$	$98 \pm 1.2^c$

<sup>a</sup> ALA: amebic liver abscess.

<sup>b</sup> Percent of damaged liver.

<sup>c</sup>  $P < 0.05$  when compared with the untreated group.

investigated without success if DHEA caused apoptosis of trophozoites through TUNEL (Fig. 2) and ultrastructural observation (not shown). Another possibility would be the occurrence of nuclear hormone receptors, particularly an androgen receptor, in *E. histolytica* trophozoites; DHEA could modify the expression of genes resulting in growth arrest. Recent reports have evidenced in some parasites the presence of hormone receptors and hormone-controlled expression of genes involved in replication. Hormone receptors have been described for *Onchocerca volvulus* [37] and *T. crassiceps* [38]. Expression of the AP-1 complex genes (*c-fos* and *c-jun*) is stimulated by E2 or P4 and suppressed by DHT in *T. crassiceps* [38]. Experiments directed to explore these possibilities in *E. histolytica* are presently being conducted in our laboratory. One possibility that should not be ruled out is the metabolic modification of DHEA by the trophozoites to generate a derivative compound carrying the anti-amebic effect. This interesting phenomenon was recently described in the cestodes *T. crassiceps* and *T. solium* [39].

Particularly interesting was the observation that DHEA exacerbates the amebic hepatic abscess in hamsters (Fig. 4). Moreover, trophozoites recovered from hepatic tissue in TYI-S-33 medium were apparently normal in adherence, motility, protease secretion and infectivity (not shown). The hamster's response to DHEA, i.e. up-regulation of the cellular immune response, could contribute to ALA exacerbation.

The cellular immune response has been directly involved with the development of damage in ALA [2]. Related studies are scarce, an example is the cryptosporidial infection in immunosuppressed rats, mice and Syrian golden hamsters [17–19,40]. More recently, the effect of DHEA on the murine infection by *Toxoplasma gondii* was also studied [41]. In all cases, DHEA decreased the number of encysted parasites in mice brains, through an apparent up-regulation of the host immune response, which in turn palliated the infection. However, considering the hepatotoxic and carcinogenic effects of DHEA after long term treatment of rats [42], an influence on the development of the ALAs through these mechanisms cannot be ruled out.

We are still far from being able to determine the role of hormones in the human infection by *E. histolytica*. However, the results presented here constitute a first approximation to unravel the host factors associated with the increased susceptibility of the human male to invasive amebiasis episodes.

## Acknowledgments

We thank M. Nequiz for supplying HM1:IMSS trophozoites, B. Sánchez-Hernández for statistical assistance and I. Perez Montfort for editorial correction of the manuscript. This work was partially supported by research grants from CONACYT (41693-M: J.P.L. and J.C.C. and grant 40072-Q: J.M.M.), DGAPA UNAM (IN206102-3: J.P.L. and J.C.C. and grant IN208103-3: J.M.M.) and Fundación Miguel Alemán, A.C. (J.P.L.). C.C.R. is a Ph.D. fellow from CONACyT.

## References

- [1] E. Meerovitch, K. Chadee, in: J.I. Ravdin (Ed.), *Amebiasis: Human Infection by Entamoeba histolytica*, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1988, pp. 425–437.
- [2] V. Tsutsumi, R. Mena-Lopez, F. Anaya-Velazquez, A. Martínez-Palomo, Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation, *Am. J. Pathol.* 117 (1984) 81–89.
- [3] E.R. Houpt, D.J. Glembocki, T.J. Obrig, C.A. Moskaluk, L.A. Lockhart, R.L. Wright, R.M. Seaner, T.R. Keepers, T.D. Wilkins, W.A. Petri Jr., The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells, *J. Immunol.* 169 (2002) 4496–4503.
- [4] P.F. Ayeh-Kumi, I.M. Ali, L.A. Lockhart, C.A. Gilchrist, W.A. Petri Jr., R. Haque, *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene, *Exp. Parasitol.* 2 (2001) 80–88.
- [5] S.L. Klein, Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection, *Parasite Immunol.* 26 (2004) 247–264.
- [6] H.O. Besedovsky, A. Del rey, Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses, *Endocr. Rev.* 17 (1996) 64–102.
- [7] F. Homo-Delarche, F. Fitzpatrick, N. Christeff, E.A. Nunez, J.F. Bach, M. Dardenne, Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40 (1991) 619–637.
- [8] S. Eloi-Santos, N.J. Olsen, R. Correa-Oliveira, D.G. Colley, *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice, *Exp. Parasitol.* 75 (1992) 168–175.
- [9] J. Morales-Montor, F. Mohamed, A. Ghaleb, S. Baig, C. Hallal-Calleros, R.T. Damian, In vitro effects of hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) hormones on *S. mansoni*, *J. Parasitol.* 87 (2001) 1132–1139.
- [10] P.O. Lawrence, Hormonal effects on insects and other endoparasites in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27A (1991) 487–496.
- [11] M.G. Martinotti, D. Savoia, Effect of some steroids hormones on the growth of *Trichomonas vaginalis*, *G. Bacteriol. Virol. Immunol.* 78 (1985) 52–59.
- [12] J.C. Do Prado Jr., M. De P. Leal, J.A. Anselmo-Franci, H.F. de Andrade Jr., J.K. Kloetzel, Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*, *Parasitol. Res.* 84 (1998) 100–105.
- [13] A.B. Mock, A.C. Nacy, Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections, *Infect. Immun.* 56 (1998) 3316–3319.
- [14] S.M. Maswoswe, W. Peters, D.C. Warhust, Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79 (1985) 607–616.
- [15] D. Freilich, S. Ferris, M. Wallace, S. Leach, A. Kallen, J. Frincke, C. Ahlem, M. Hacker, D. Nelson, J. Herbert, 16 Alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63 (2000) 280–283.
- [16] T. Leenstra, F.O. Ter Kuile, S.K. Kariuki, C.P. Nixon, A.J. Oloo, P.A. Kager, J.D. Kurtis, Dehydroepiandrosterone sulfate levels associated with decreased malaria parasite density and increased hemoglobin concentration in pubertal girls from western Kenya, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 297–304.
- [17] K.R. Rasmussen, E.G. Martin, M.J. Arrowood, M.C. Healey, Effects of dexamethasone and dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*, *J. Protozool.* 38 (1991) 157S–159S.
- [18] K.R. Rasmussen, M.C. Healey, Dehydroepiandrosterone-induced reduction of *Cryptosporidium parvum* infections in aged Syrian golden hamsters, *J. Parasitol.* 78 (1992) 554–557.
- [19] K.R. Rasmussen, M.C. Healey, L. Cheng, S. Yang, Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*, *J. Parasitol.* 81 (1995) 429–433.

- [20] N.J. Gill, N.K. Ganguly, R.C. Mahajan, S.R. Bhusnurmath, J.B. Dilawari, Progesterone-induced amoebic liver abscess in guinea-pigs—a new model, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77 (1983) 53–58.
- [21] J.A. Walsh, in: J.L. Ravdin (Ed.), *Amebiasis: Human Infection by Entamoeba histolytica*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1988, pp. 91–126.
- [22] M.A. Hughes, W.A. Petri Jr., Amebic liver abscess, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 14 (2000) 565–582.
- [23] R. Acuna-Soto, J.H. Maguire, D.H. Wirth, Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis, *Am. J. Gastroenterol.* 95 (2000) 1277–1283.
- [24] J. Blessmann, P. Van Linh, P.A. Nu, H.D. Thi, B. Muller-Myhsok, H. Buss, E. Tannich, Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amoebic liver abscess in central Vietnam, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (2002) 578–583.
- [25] C. Larralde, J. Morales, I. Terrazas, T. Govezensky, M.C. Romano, Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52 (1995) 575–580.
- [26] F. Catalina, V. Kumar, L. Milewich, M. Bennett, Food restriction-like effects of dehydroepiandrosterone: decreased lymphocyte numbers and functions with increased apoptosis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221 (1999) 326–335.
- [27] N.C. Yang, K.C. Jeng, W.M. Ho, M.L. Hu, ATP depletion is an important factor in DHEA-induced growth inhibition and apoptosis in BV-2 cells, *Life Sci.* 70 (2002) 1979–1988.
- [28] R.E. Reeves, *Metabolism of Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, *Adv. Parasitol.* 23 (1984) 105–142.
- [29] K. Ayi, G. Giribaldi, A. Skorokhod, E. Schwarzer, P.T. Prendergast, P. Arese, 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterone, an antimalarial analogue of the hormone dehydroepiandrosterone, enhances phagocytosis of ring stage parasitized erythrocytes: a novel mechanism for antimalarial activity, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 3180–3184.
- [30] M. Di Monaco, A. Pizzini, V. Gatto, L. Leonardi, M. Gallo, E. Brignardello, G. Boccuzzi, Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition in the antiproliferative effects of dehydroepiandrosterone on human breast cancer cells, *Br. J. Cancer* 75 (1997) 589–592.
- [31] S. Yoshida, A. Honda, Y. Matsuzaki, S. Fukushima, N. Tanaka, A. Takagiwa, Y. Fujimoto, H. Miyazaki, G. Salen, Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines, *Steroids* 68 (2003) 73–83.
- [32] J.L. Goldstein, M.S. Brown, Regulation of the mevalonate pathway, *Nature* 343 (1990) 425–430.
- [33] F. Schroeder, A.A. Frolov, E.J. Murphy, B.P. Atshaves, J.R. Jefferson, L. Pu, W.G. Wood, W.B. Foxworth, A.B. Kier, Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 213 (1996) 150–177.
- [34] A. Montalvetti, J. Pena-Diaz, R. Hurtado, L.M. Ruiz-Perez, D. Gonzalez-Pacanoska, Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *Biochem. J.* 349 (2000) 27–34.
- [35] B. Loftus, I. Anderson, R. Davies, U.C. Alsmark, J. Samuelson, P. Amedeo, P. Roncaglia, M. Berriman, R.P. Hirt, B.J. Mann, T. Nozaki, B. Suh, M. Pop, M. Duchene, J. Ackers, E. Tannich, M. Leippe, M. Hofer, I. Bruchhaus, U. Willhoeft, A. Bhattacharya, T. Chillingworth, C. Churcher, Z. Hance, B. Harris, D. Harris, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, R. Squares, S. Whitehead, M.A. Quail, E. Rabbinowitsch, H. Norbertczak, C. Price, Z. Wang, N. Guillen, C. Gilchrist, S.E. Stroup, S. Bhattacharya, A. Lohia, P.G. Foster, T. Sicheritz-Ponten, C. Weber, U. Singh, C. Mukherjee, N.M. El-Sayed, W.A. Petri Jr., C.G. Clark, T.M. Embley, B. Barrell, C.M. Fraser, N. Hall, The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*, *Nature* 433 (2005) 865–868.
- [36] O. Chose, C.O. Sarde, C. Noel, D. Gerbod, J.C. Jimenez, C. Brenner, M. Capron, E. Viscogliosi, A. Roseto, Cell death in protists without mitochondria, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010 (2003) 121–125.
- [37] T.R. Unnasch, J. Bradley, J. Beauchamp, R. Tuan, M.W. Kennedy, Characterization of a putative nuclear receptor from *Onchocerca volvulus*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 104 (1999) 259–269.
- [38] J. Morales-Montor, G. Escobedo, M. Rodríguez-Dorantes, N. Tellez-Ascencio, M.A. Cerbón, C. Larralde, Differential expression of AP-1 transcription factor genes c-fos and c-jun in the helminth parasites *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*, *Parasitology* 129 (2004) 233–243.
- [39] M.C. Romano, R.A. Valdez, A.L. Cartas, Y. Gomez, C. Larralde, Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85 (2003) 221–225.
- [40] G.J. Leitch, Q. He, Putative anticryptosporidial agents tested with an immunodeficient mouse model, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) 865–867.
- [41] A.M. Khalifa, I.R. Ibrahim, E.D. el-Kerdany, Coccidial infection in immunosuppressed mice: prophylaxis and treatment with dehydroepiandrosterone, *East. Mediterr. Health J.* 6 (2000) 908–918.
- [42] D. Mayer, K. Forstner, K. Koppow, Induction and modulation of hepatic preneoplasia and neoplasia in the rat by dehydroepiandrosterone, *Toxicol. Pathol.* 31 (2003) 103–112.

## Review Article

# The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*

J. C. CARRERO,<sup>1</sup> C. CERVANTES-REBOLLEDO,<sup>1</sup> H. AGUILAR-DÍAZ,<sup>1</sup> M. Y. DÍAZ-GALLARDO,<sup>2</sup> J. P. LACLETTE<sup>1</sup> & J. MORALES-MONTOR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México AP 70228, México,

<sup>2</sup>Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

## SUMMARY

*Intestinal infection with the protozoan parasite Entamoeba histolytica elicits a local immune response with rising of specific secretory IgA (sIgA) antibodies detectable in several compartments associated to mucosa. Anti-amoebic sIgA antibodies have been reported in faeces, saliva, bile and breast milk from dysenteric patients and research trying to elucidate their role in protection has recently intensified. IgA antibodies inhibit the in vitro adherence of E. histolytica trophozoites to epithelial cell monolayers by recognizing several membrane antigens, including the galactose-binding lectin (Gal-lectin), main surface molecule involved in adherence, and the serine and cysteine-rich proteins, all of them potential vaccine candidates. In fact, the presence of sIgA anti-Gal lectin in faeces of patients recovered from amoebic liver abscess (ALA) was associated with immunity to E. dispar. Moreover, the combined nasal and intraperitoneal vaccination of C3H/HeJ mice with native and recombinant Gal-lectin protected mice against an intracecal challenge with virulent E. histolytica trophozoites, protection that seemed to be associated with the induction of specific intestinal sIgA antibodies. Therefore, the stimulation of intestinal secretory response by mucosal delivery of amoebic antigens has been positioned as a promising strategy for inducing protection against human amoebiasis.*

**Keywords** amoebiasis, intestinal immunity, secretory IgA, vaccination

*Correspondence:* Carrero Julio Cesar, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México AP 70228, México D.F. 04510 (e-mail: carrero@servidor.unam.mx).

*Received:* 21 February 2007

*Accepted for publication:* 25 April 2007

## INTRODUCTION

*Entamoeba histolytica* is a protozoan parasite that resides in human intestine causing amoebiasis, one of the main intestinal infections responsible for children morbidity and death worldwide. The parasite infects, together with the morphologically similar but not pathogenic *E. dispar*, around 10% of the world population and accounts for 100 000 deaths each year (1). Several aspects of this host–parasite relationship such as parasite virulence and host susceptibility are poorly understood, and no effective vaccination strategies exist in humans. Interestingly, only in few cases individuals infected with the pathogenic *E. histolytica* develop symptoms, and the asymptomatic individual course with an infection similar to that caused by the commensal *E. dispar* amoeba (a nonpathogenic commensal organism), and in children, with low level of *E. histolytica* intestinal re-infection and faster resolution of the intestinal amoebic disease. It is important to point out to the reader that, immunity developed against *E. histolytica*, cannot prevent a symptomatic *E. dispar* infection. Thus, we want to emphasize that, immunity developed against pathogenic amoeba, excludes a nonpathogenic commensal, such as *E. dispar* (2). The reason of this discrepancy is still unknown, but it has been associated to multiple phenotype variability in the virulence of isolates from different areas, to the differences in the susceptibility of the human population to the infection due to a natural resistant genetic background or the raising of a protective immune response. In this sense, the mucosal immune response and particularly the sIgA antibodies could mediate protection against this enteric parasite as has been demonstrated for other intestinal infections (3).

This review will attempt to briefly highlight what is known about the secretory immune response during the infection with *E. histolytica* and its possible role in protection against human intestinal amoebiasis.

## INTESTINAL INFECTION WITH *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Despite a significant amount of research invested toward vaccine development, amoebiasis remains a common and debilitating parasitic infection throughout many parts of the developing world. Chemotherapy with metronidazole remains highly effective, but the high re-infection rate after treatment remains problematic. Estimates place the current number of infections at ~50 million people, with high number of children in developing countries considered at risk. However, though very conspicuous, this is not the most important intestinal infectious disease in children, and there are others infectious diseases, that can be much more threatening for children's health, such as rotavirus.

The majority of work with amoebiasis and immunity has been in the hamster model. Infected hamsters with amoeba mount a vigorous Th-1 response, driven by high levels of IL-12, IL-2 and IFN- $\gamma$ . These are likely the result of antigen presentation events mediated by activated APCs migrating to the lymph nodes from the site of trophozoite penetration. Immunity undergoes a well-documented shift toward a Th-2 type phenotype as the infection goes from acute to chronic, with increasing levels of IL-10 being recorded. As a consequence of this modulation hepatic-portal fibrosis is significantly reduced, suggesting an attempt by the host to attenuate pathology in affected tissues. In humans the mechanisms are less clear, although antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) involving a balance between IgG4 and IgE seems to play a larger role than in hamsters. As might be predicted, a balance between the Th-1 and Th-2 responses is suggested to present the optimal response.

Amoebiasis is acquired with the ingestion of water or food containing *E. histolytica* mature cysts. After reaching the last part of the small intestine and suffer a nuclear division, each cyst releases eight trophozoites that colonize the proximal part of the large intestine. As mentioned before, in most cases the *E. histolytica* trophozoites attach to the mucus and epithelial cells without penetrating the mucosa and therefore causing any symptom, similar to the infection with the nonpathogenic *E. dispar*. In the other cases, the trophozoites attach to the epithelium through the galactose-binding lectin (Gal-lectin) and begin an invasive process that depends on the release of cysteine proteases, amoebapore, collagenases, acid phosphatases and other hydrolytic enzymes, such as carbohydrate hydrolases (2,4). The invasion is followed by an acute inflammatory process that recruits neutrophils, plasma cells, eosinophils, macrophages and lymphocytes, which can contribute to the tissue damage by uncontrolled release of their toxic products (5). The mucosa is destroyed and the parasite spreads in the tissue forming a typical flask-shape ulcer associated with

diarrhoea containing mucus and blood (amoebic dysentery; AD). For a still unknown reason, in about 10% of *E. histolytica* infected patients, the trophozoites go beyond the submucosa and reach the mesenteric blood vessels, and through the portal vein, migrate to other organs, mainly the liver and occasionally to the lungs, brain and genitals, where they cause amoebic abscesses. Most lethal cases by *E. histolytica* are due to the amoebic liver abscess (ALA), which is three to four times more frequent in adult males than females, and almost absent in children and elder people, in contrast to the intestinal infection, which is rarely lethal and less frequent in adults (6,7). In any case, the trophozoites that reach the distal part of the large intestine suffer an encystment process, controlled by unknown luminal conditions that result in the formation of tetranucleated mature infective cysts which are passed with the faecal material. The complete process of intestinal infection by *E. histolytica*, whatever symptomatic or asymptomatic, is accompanied by the development of a secretory immune response characterized by the presence of specific anti-amoeba sIgA antibodies in several compartments of the gut-associated lymphoid tissue (GALT).

## SECRETORY IgA (sIgA) AND LOCAL IMMUNITY

sIgA is considered the first line of specific defence against natural infections in the vast area occupied by mucosal surfaces (3). This immunoglobulin is mainly dimeric, with the two subunits joined by the J chain, and also containing the secretory component S responsible for its intracellular transportation in the epithelial cells and release to the secretory fluids. Together, they form a macromolecule highly resistant to the action of proteases, characteristic to the microenvironment where the sIgA antibodies exert their action. This immunoglobulin represents up to 90% of the antibodies present in secretions and has a broad spectrum of action against virus, bacteria, fungi and parasites, as well as environmental and dietary antigens (3,9). Mucins and sIgA can retain microorganisms inside the mucus layer avoiding their contact or inhibiting their adherence to the gut epithelium and allowing their elimination with the intestinal peristalsis. Multiple evidences suggest that human sIgA in colostrum and milk plays a critical role in the passive immune protection of the newborns against multiple oral and inhaled microorganisms until the production by the newborns of their own batch of specific sIgA antibodies (10,11). Therefore, the use of immunization strategies focused on inducing the production of specific sIgA antibodies at mucosal surfaces has largely been proposed as a potential mechanism for the development of vaccines against pathogens gaining entrance to the body through the oral, nasal and urogenital routes (12). The polio vaccine was

the earliest evidence in humans of an oral delivery resulting in the raising of mucosal anti-polio IgA antibodies that correlate with protection (13). Protection against bacteria such as *Neisseria meningitidis* (14), *Streptococcus pneumoniae* (15), enterotoxigenic *Escherichia coli* (16) and *Bordetella pertussis* (17) has been obtained with sIgA antibodies, alone or in combination with immune cells, and protection against the oral deposition of S mutants in mice has been achieved by using recombinant anti-adherent IgA antibodies produced in plants, suggesting a potential application in limiting dental caries (18). Moreover, immunity in mice against the nematodes *Trichiuris muris* or *Trichinella britovi* by the passive transfer of specific sIgA monoclonal antibodies into the intraperitoneal cavity previous to the challenge has also been reported (19,20). Similar role in protection against *Giardia muris* has been derived from studies in mice genetically deficient for IgA production where the intestinal infection cannot be resolved, in comparison with nondeficient mice which easily resolve the infection during the early stages (21). The anti-giardial mechanism of sIgA antibodies appears to include detachment from the intestinal epithelium and/or immobilization of trophozoites, avoiding the colonization of the small intestine surface. The same anti-adherent mechanism appears to be responsible for the sIgA-dependent protection of orally immunized pigs against ocular keratitis caused by *Acanthamoeba castellanii*, a free-living amoeba. Thus, amoeba-specific sIgA antibodies in tears correlated with protection and inhibited the adherence to *A. castellanii* trophozoites to Chinese hamster corneal epithelial cells (22). Also, recently it has been discussed the possible use of an adherence-blocking vaccine against *E. histolytica* in different animal models (23).

#### SECRETORY IMMUNE RESPONSE IN THE INFECTION BY *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

The pathogenicity of *E. histolytica* results from a complex set of events, including adhesion to the gut epithelium through the Gal-lectin, lysis of the epithelial cells via amoebapore action, degradation of matrix by the action of neutral cysteine proteinases and other lytic enzymes, and penetration into the mucosa. Another mechanism of immune evasion used by the amoeba, is the proteolytic digestion of IgA by proteases (24). During this process, the activation of the immune response is induced due to the release of inflammatory cytokines by host epithelial cells, initiating an acute inflammatory process that has been studied in several animal models (25) and in human intestinal xenografts (26). Anti-amoeba humoral immune response can be elicited in both compartments, intestinal and systemic, depending on the level of intestinal and extraintestinal tissue invasion by this protozoan. Thus, seroepidemiologic studies

have shown that most patients with invasive amoebiasis develop specific circulatory antibodies, basically of the IgG isotype, which may persist for several years (27). Moreover, 80% of patients with ALA also show high levels of anti-amoeba IgA antibodies in saliva (28) suggesting that sIgA antibodies are developed during the episode of intestinal infection previous or concomitant with the hepatic episode. However, the basic problem that the patients get the disease although they mount an IgA and IgG immune response has been explained by immune evasion mechanisms, such as the capping and shedding of surface-bound antibodies (29). On the other hand, almost all of invasive colonic infections elicit a mucosal anti-amoeba sIgA antibody response, from which about the half of patients also develop high levels of serum anti-amoeba IgG and IgA antibodies apparently due to the release of trophozoite antigens in the blood stream following the mucosal invasion (27). The anti-amoebic sIgA antibodies can be detected in secretions of several compartments belonging to the GALT such as ileum, colon and faeces of patients with ALA as well as calostrum, milk and saliva from patients with amoebic dysentery. Moreover, the search of those antibodies in the different body fluids has been intended as a diagnostic tool of intestinal amoebiasis (30).

Initial studies suggested that the sIgA response raised during the intestinal infection with *E. histolytica* was short-lasting, remaining just for few weeks. However, recent studies have demonstrated that this response is long-lasting, up to 1 year, and noteworthy, its persistence could protect against intestinal re-infection with *E. histolytica* in patients of endemic areas (28–31). Moreover, sIgA response, particularly evaluated against the Gal-lectin, was also sustained by over 18 months in patients cured of ALA and it was associated to immunity against the nonpathogenic *E. dispar*; however, immunity against *E. histolytica* could not be determined in that study (32). Thus, several evidences point out to sIgA antibodies as protectors against *E. histolytica* infection (Table 1). However, it should be pointed out that, whereas it has been shown in animal studies that IgG antibodies can protect from amoebic disease, this has not been demonstrated in the case of IgA antibodies, and most of the evidence regarding this issue is indirect.

Indirect evidence comes from one study showing that newborns living in an endemic area were protected against the amoebic intestinal infection during breastfeeding (33). Direct evidence comes from studies showing that sIgA isolated from salivas of patients with intestinal amoebiasis diminished *in vitro* the adhesion of virulent trophozoites to epithelial cells avoiding their destruction (34), purified sIgA reduce proteolytic activity of parasite extracts (35), and that the raising of this type of antibodies by immunization is associated with protection in experimental models against intestinal colonization (36) and, interestingly, against ALA

**Table 1** Evidences of sIgA-based protection against *E. histolytica* infection

Source of sIgA	Evidence	Possible mechanism of action	sIgA specificity	Reference
Human colostrums	Absence of intestinal infection in newborns while breastfeeding	Passive transference of anti-amoebic sIgA antibodies that prevent intestinal colonization	Multiple amoebic proteins	33
Human saliva	Inhibition of adherence and cytolysis	Blocking of surface adhesins	Multiple amoebic proteins	34
Human saliva	Inhibition of amoeba proteolytic activity	Steric blocking of active sites of proteases	Cysteine proteases	35
Mice intestine (induction of sIgA by oral immunization)	Protection against intracecal challenge	Inhibition of adherence and cecum colonization	Galactose-binding lectin	36
Gerbil intestine (induction of sIgA by oral immunization)	Protection against amoebic liver abscess	Induction of systemic immunity by oral route	Serine-rich <i>Entamoeba histolytica</i> protein (SREHP)	37
Human intestine	Reduction in re-infection rates and faster control of the infection	Inhibition of adherence and intestine colonization	Carbohydrate-recognition domain of the galactose-binding lectin	31,32,38–41

(37). However, recent field studies in children suffering amoebiasis by the Petri group in Dhaka, Bangladesh, have provided the best evidence of association between the raising of sIgA anti-Gal lectin and development of acquired immunity against the intestinal infection with *E. histolytica*. In one of those studies, almost all the subjects (63 out of 64) containing faecal sIgA that recognize the carbohydrate-recognition domain (CRD) of the Gal-lectin, were protected against re-infection over a period of 1 year in comparison with the subjects lacking those antibodies (33 out of 246). In contrast, the incidence of intestinal infection was much lower in children lacking serum anti-Gal lectin IgG antibodies (4.3%) when compared to the children with such antibodies (17.8%), suggesting that no development of systemic acquired immunity occurs during an intestinal episode as consequence of no tissue invasion in those children (31). This interesting finding of immunity against intestinal *E. histolytica* colonization was corroborated by the same group in a 4-year prospective study looking for the incidence of *E. histolytica* diarrhoeal disease in 289 children from the same population (38,39). During the first year of study, it was observed that only 14 out of 43 children recovered from a diarrhoeal event by *E. histolytica* but not *E. dispar*, experienced a second event with this parasite, suggesting the development of immunity against the disease by natural infection (38). After 4 years of monitoring, it was observed that most of the infections and diarrhoeal diseases by *E. histolytica* were self-limited and the raising of sIgA anti-Gal lectin CRD was short-lived; however, a clear correlation between those

secretory antibodies and the control of the intestinal amoebic disease could also be observed (39). On the other hand, a longitudinal study conducted by the Tannich group in 383 randomly selected asymptomatic adults from Vietnam demonstrated an *E. histolytica* prevalence of 11%. In this infected population (43 individuals), a gradual decrease in the level of infection along with the absence of invasive amoebiasis were also observed; however, the rate of re-infection in this population was almost threefold higher than in the whole studied (40). More recently, the Ravdin group reported interesting findings on the dynamics of intestinal anti-lectin sIgA production in patients cured of amoebic liver abscess and asymptomatic *E. histolytica* and *E. dispar* infected people (41). They found transitory peaks of specific sIgA lasting 3–6 months, being the patients cured of ALA those that showed higher and more extended and frequent peaks, followed by the *E. histolytica* asymptotically infected individuals, and finally, by the *E. dispar* infected persons. Accordingly to the findings by the Petri's group mentioned before, the occurrence of the sIgA peaks was always associated to the resolution of the intestinal infection, and therefore, to mucosal immunity against both *Entamoeba* species.

The significance of these field studies showing the development of mucosal immunity by natural infection with *E. histolytica* (clinical or asymptomatic) is enormous considering that such observations open the possibility to use amoebic antigens, and particularly the Gal-lectin, for developing an oral vaccine against the intestinal infection with *E. histolytica*

based on the induction of protective sIgA antibodies. In this sense, a protection assay carried out in the C3H/HeJ mouse model of amoebic colitis (42) showed that the combination of oral and nasal immunization with the native Gal-lectin or a 64-kDa recombinant fragment (LecA) using cholera toxin and Freund's adjuvant conferred protection against amoebic intestinal colonization (36). Higher level of protection (100% in some cases) was obtained with the native Gal-lectin when it was compared to LecA. It is noteworthy that protection correlated with the development of faecal anti-Gal lectin IgA antibodies previous to the intracecal challenge with amoebas, as it was found in the human *in vivo* studies mentioned before. Moreover, a role for CD4+ T lymphocytes in cecal pathology was also found in the same model (43) suggesting a role for the cellular immune response in the tissue damage presented during invasive amoebiasis (43,44). However, it is also interesting to mention that, although the Gal-lectin could be a very good antigen to be used as a prototype vaccine, Lotter *et al.* showed that that induction of IgG antibodies against a particular fragment of the lectin was anti-protective (45), which opens up the possibility of the use not of the whole molecule, but only of the fragment that could have protective activity.

Although there are not a plethora of studies in which cellular immune response participation in amoebiasis have been described, it has been postulated that some cytokines are necessary to induce resistance in this infection. Thus, as reviewed by Ivory *et al.* (46), IL-10 has been postulated as one of the most important immune factors mediating nonhaemopoietic cells resistance in experimental models of amoebiasis. The IL-10 resistance in mouse experimental amoebiasis, it is associated to two lines of immune barriers: the first line of resistance is conferred by the intestinal epithelial lining and the second by the underlying immune cells. Thus, the contribution of IL-10 to innate resistance is through the physiological effects on intestinal epithelial cells and induction of a protective barrier to infection. Also this cytokine might inhibit the adverse effects of luminal amoebic antigens. One important aspect of the IL-10 effect in amoebiasis, is that there is no apparent correlation between inflammation and amoeba scores (46).

### SECRETORY IgA (sIgA)-BASED VACCINE

One of the intricate puzzles in amoebiasis, is the role of inflammation. However, researches reach the consensus that mucosal inflammation helps to contain the infection at an early stage, at the cost of extensive mucosal destruction. The inflammation induced by amoeba infection in the gut, is driven by a T helper (Th)2 cell phenotype. Whether this inflammation is primarily because of the Th2 response or because of the enhanced parasite survival, resulting from

the lack of protective Th1 response has not been completely elucidated.

It is interesting to point out that it has been reported that multiple cytokines, including obligatory TGF- $\beta$  and IL-10, IL-4, IL-5 and IL-6, are required to promote IgA class switching and maturation, and thus, induce protective mucosal immunity (47). This mucosal immunity may be closely related to the mucosal epithelium. In there, IgA may be able to function at different levels. There is the possibility of luminal sIgA preventing adhesion and entry of amoebic antigens into the epithelium, that IgA in the lamina propria binds and excretes amoebic antigens to the lumen or that IgA in its transit through the epithelium, could neutralize amoebic proinflammatory antigens or directly inhibiting amoeba reproduction. Another interesting intrinsic property of IgA, it is its ability to trigger the release of inflammatory cytokines (47). Thus, the necessity for development of a vaccine against amoebiasis is unquestionable. Amoebiasis is the third cause of death by protozoan parasites worldwide and its incidence is still increasing, probably due to the recent description of ALA cases unresponsive to metronidazole treatment (41). The nature of this resistance is unknown, but it could be due to development of a multidrug resistance phenotype (MDR) in trophozoites exposed to metronidazole, or to the natural existence of genetically resistant strains. In this sense, the study done in children from Dhaka mentioned before, demonstrated the presence of 62 PCR polymorphic variants of the *E. histolytica* serine-rich protein in 119 faecal samples (31), one of the proteins considered as vaccine candidate. Even when this variability increase the difficulty of designing a multiregional effective anti-amoebic vaccine, there are several issues related to the life cycle of this parasite that support the possibility of eradicate amoebiasis with a vaccine: (i) the parasite have only two stages, cyst and trophozoites; (ii) the human is the only definitive host; and (iii) there is no intermediary host, neither vectors, nor natural reservoirs. This means that an anti-colonizing vaccine should result in protection against invasive amoebiasis, inhibition or reduction in the encystment level, and decrease in the potential to transmit the infection into the population. As *E. histolytica* is an enteric invasive parasite, the vaccine has to prevent the adhesion of trophozoites to the colonic epithelium and their invasiveness by inducing the production of amoebic adherence-blocking sIgA antibodies at the intestinal mucosa. Therefore, an oral or nasal delivery system with a mucosal adjuvant will be the most convenient strategy in order to stimulate GALT. From the studies mentioned before and similar others it is clear that the Gal-binding lectin is the best candidate for the development of an anti-amoeba vaccine (36,49–51). The lectin, located in the surface of trophozoites, mediates the adherence of trophozoites to target cells and is the target of

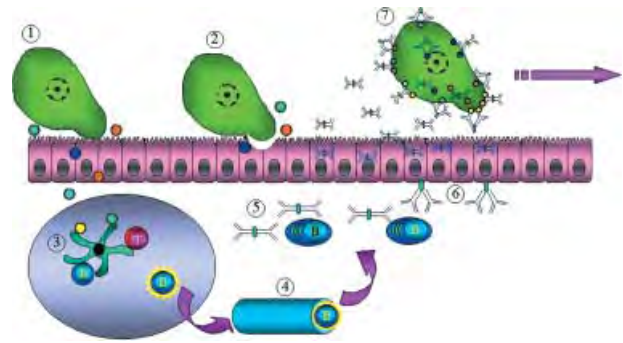


sIgA-based protection against intestinal and hepatic experimental amoebiasis, among other important functions. However, other amoebic proteins are also recognized by human sIgA that confer protection, but at less extension (49,51, Table 1). One of them is the 29 kDa cysteine-rich protein, actually known as peroxiredoxine as it is mainly located on the surface of the amoeba (52). The other one is the 25 kDa serine-rich protein, a membrane protein with multiple octapeptide and dodecapeptide tandem repeats that appears to be involved in immune evasion. The serine-rich surface protein was originally described as 46/52 kDa, but it has a variable length due to different repeat numbers. Both proteins are highly immunogenic, conferring 50% and 100% of protection against ALA in gerbils, respectively (reviewed in (49,51)). Interestingly, both proteins were identified by immunoscreening with sIgA antibodies from saliva of patients with intestinal amoebiasis, suggesting that they are able to induce secretory immune responses in human mucosa (53). In addition, cytosolic proteins such as cyclophilin, 70 kDa heat-shock protein, enolase, 1- $\alpha$  elongation and ribosomal protein L23a were also recognized by the human sIgA antibodies, suggesting that internal amoebic antigens are also immunogenic at mucosal surfaces (53). With the exception of the Gal-lectin, the potential of all this antigens in protection against intestinal amoebiasis has not been addressed.

The selection of a mucosal adjuvant or a delivery system suitable in humans that enhance the secretory response is also a crucial point (54). Most studies on protection against amoebiasis have used either complete or subunit B cholera toxin. However, their use as well as the use of analogs of cholera toxin and other bacterial toxins (i.e. heat-labile enterotoxin) is limited in humans. Microparticles and polymerized liposomes could be more acceptable alternatives; however, their potential as adjuvants is far lower than that of toxins. Other possibility is the use of noninfective viral or bacterial systems displaying the amoebic antigens on their surfaces that function as adjuvants by themselves (55), or the use of transgenic plants expressing the antigens in the edible fruits or infected with the transgenic virus (56,57). These systems of mucosal delivery antigens have been successfully used for protection against several infectious agents, from bacteria to protozoa, but not in amoebiasis. Therefore, the potential of these strategies for the delivery of an anti-amoeba vaccine in human have to be further considered.

## CONCLUSIONS

The evidences presented above illustrate the importance of the secretory immune response during amoebiasis, and could give ways to possible new mechanisms of parasite control in an immunocompetent host. The above evidence



**Figure 1** Proposed model of IgA-based protection against intestinal infection by *Entamoeba histolytica*. Following excystation, trophozoites move to the colon and attach to the mucosa surface by adhesins, including the galactose-binding lectin (1). Once bound, the active trophozoites release proteolytic enzymes that disrupt the epithelial tissue and let them penetrate the mucosa, at the same time that trophozoites phagocytose the tissular debris (2). In this model of protection, antigens secreted or released from lysed trophozoites are taken up by dendritic cells in Peyer's patches underlying the mucosa; the antigens are then processed and presented to local T and B lymphocytes (3). Activated B lymphocytes exit the Peyer's patches through lymphatic vessels, become plasma cells in peripheral blood and then return to the lamina propria by homing receptors (4). The plasmatic cells distributed in the lamina propria produce dimeric specific secretory IgA antibodies (5) that bind to the basal region of the enteric cells (secretory component, in green) and migrate throughout the enterocytes until reach the intestinal lumen, where are secreted (6). Finally, the secreted IgA antibodies bind to the amoebic surface adhesins preventing the adhesion of trophozoites to the lining epithelium, which results in the expulsion of the trophozoites with the faeces (7).

strongly suggests an important role for IgA in human and mice intestinal amoebiasis. Possible interaction between the host secretory immune response, the amoeba parasite and the systemic immune system affects the final disease outcome. However, these interactions have not been well characterized during acute or chronic amoebiasis. The interaction between the secretory immune response and the establishment of the parasite in amoebiasis may have implications in the transmission control and treatment of this worldwide spread parasitic disease in humans.

The sIgA response developed against some antigens of *E. histolytica* trophozoites during the intestinal infection in humans and experimental rodents confers temporal protection against the re-infection, probably by inhibiting the adherence of the parasite to the colonic wall. Until now, the most feasible strategy for the development of a vaccine against intestinal amoebiasis is the use of one of the three antigens recognized by human sIgA and involved in the adherence of the parasite to colonic cells, Gal-lectin, CREHP and SREHP, or their combination as the constituents of a preparation that will be delivered by oral or nasal routes

in combination with mucosal adjuvants or delivery systems in order to awake a secretory response blocking the adherence of amoebas to the intestinal wall (Figure 1). In practical matters, the complexity of the amoeba–host relationship suggests that all physiological factors (i.e. sex, age, developmental stage) should be taken into account in the design of vaccines and new drugs. Interventions aimed at the secretory immune response appear as a possible new therapeutic approach to control amoebiasis in its final host, and perhaps other enteric infections which secretory immune response is the first line of defence of the host.


## ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support: Grants 40072-Q (JMM) and 41693-M (JPL and JCC) from Programa de Fondos Sectoriales of The National Council of Science and Technology of México (CONACyT), grants IN-208103 (JMM) and IN206102-3 (JPL and JCC) from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), U.N.A.M., and a grant from Fundación Miguel Alemán, A.C. (JPL). CCR and HAD have a scholarship from CONACyT. We thank Dr Pavel Petrossian for English support.

## REFERENCES

- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; **8**: 228–238.
- Espinosa-Cantellano M & Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 318–331.
- Woof JM & Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 2006; **208**: 270–282.
- Ackers JP & Mirelman D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 367–373.
- Olivos-García A, Nequiz-Avedaño M, Tello E *et al.* Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Pathol* 2004; **77**: 66–71.
- Hughes MA & Petri WA Jr. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am* 2000; **14**: 565–582.
- Walsh JA. Epidemiology. In: Ravdin JI (eds): *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica*. New York, Edinburg, London, Melbourne, Churchill Livingstone, 1988: 91–126.
- Kelsall BL, Jackson TG, Gathiram V *et al.* Secretory immunoglobulin A antibodies to the galactose-inhibitable adherence protein in the saliva of patients with amebic liver disease. *Am J Trop Med Hyg* 1994; **51**: 454–459.
- Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol* 2003; **293**: 3–15.
- Hanson LA & Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin Neonatol* 2002; **7**: 275–281.
- Morrow AL & Rangel JM. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; **15**: 221–228.
- Holmgren J. Mucosal immunity and vaccination. *FEMS Microbiol Immunol* 1991; **4**: 1–9.
- Onorato IM, Modlin JF, McBean AM, Thoms ML, Losonsky GA & Bernier RH. Mucosal immunity induced by enhancepotency inactivated and oral polio vaccines. *J Infect Dis* 1991; **163**: 1–6.
- Vidarsson G, van der Pol WL, van den Elsen JM *et al.* Activity of human IgG and IgA subclasses in immune defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Immunol* 2001; **166**: 6250–6256.
- Lee CJ, Lee LH & Gu XX. Mucosal immunity induced by pneumococcal glycoconjugate. *Crit Rev Microbiol* 2005; **31**: 137–144.
- Byrd W, de Lorimier A, Zheng ZR & Cassels FJ. Microencapsulated subunit vaccine approach to enterotoxigenic *Escherichia coli* and other mucosal pathogens. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**: 1362–1380.
- Hellwig SM, van Spriel AB, Schellekens JF, Mooi FR & van de Winkel JG. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun* 2001; **69**: 4846–4850.
- Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K *et al.* Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 1998; **4**: 601–606.
- Roach TI, Else KJ, Wakelin D, McLaren DJ & Grecnis RK. *Trichuris muris*: antigen recognition and transfer of immunity in mice by IgA monoclonal antibodies. *Parasite Immunol* 1991; **13**: 1–12.
- Inaba T, Sato H & Kamiya H. Impeded establishment of the infective stage of *Trichinella* in the intestinal mucosa of mice by passive transfer of an IgA monoclonal antibody. *J Vet Med Sci* 2003; **65**: 1227–1231.
- Heyworth MF. Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted of helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. *J Parasitol* 1989; **75**: 246–251.
- Leher H, Kinoshita K, Alizadeh H, Zaragoza FL, He Y & Niederkorn J. Impact of oral immunization with *Acanthamoeba* antigens on parasite adhesion and corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 2337–2343.
- Petri WA Jr, Chaudhry O, Haque R & Houpt E. Adherence-blocking vaccine for amebiasis. *Arch Med Res* 2006; **37**: 288–291.
- Kelsall BL & Ravdin JI. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1993; **168**: 1319–1322.
- Tsutsumi V. *In vivo* experimental models of amebiasis. *Gac Med Mex* 1994; **130**: 450–453.
- Seydel KB, Li E, Swanson PE & 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* 1997; **65**: 1631–1639.
- Ximenez C, Leyva O, Moran P *et al.* *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; **87**: 31–39.
- Valenzuela O, Ramos F, Moran P *et al.* Persistence of secretory antiamebic antibodies in patients with past invasive intestinal or hepatic amoebiasis. *Parasitol Res* 2001; **87**: 849–852.
- Calderon J, de Lourdes Munoz M & Acosta HM. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in entamoebae. *J Exp Med* 1980; **151**: 184–193.
- Del Muro R, Acosta E, Merino E, Glender W & Ortiz-Ortiz L. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *J Infect Dis* 1990; **162**: 1360–1364.

- 31 Haque R, Duggal P, Ali IM, *et al.* Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 2002; **186**: 547–552.
- 32 Ravdin JI, Abd-Alla MD, Welles SL, Reddy S & Jackson TF. Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. *Infect Immun* 2003; **71**: 6899–6905.
- 33 Islam A, Stoll BJ, Ljungstrom I, Biswas J, Nazrul H & Huld G. The prevalence of *Entamoeba histolytica* in lactating women and in their infants in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; **82**: 99–103.
- 34 Carrero JC, Diaz MY, Viveros M *et al.* Human secretory immunoglobulin a anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infect Immun* 1994; **62**: 764–767.
- 35 Guerrero-Manriquez GG, Sánchez-Ibarra F & Ávila EE. Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity by human salivary IgA antibodies. *APMIS* 1998; **106**: 1088–1094.
- 36 Houpt E, Barroso L, Lockhart L *et al.* Prevention of intestinal amebiasis by vaccination with the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin. *Vaccine* 2004; **22**: 611–617.
- 37 Zhang T & Stanley SL Jr. 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.
- 38 Haque R, Mondal D, Kirkpatrick BD *et al.* 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* 2003; **69**: 398–405.
- 39 Haque R, Mondal D, Duggal P *et al.* *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infect Immun* 2006; **74**: 904–909.
- 40 Blessmann J, Ali IK, Nu PA *et al.* Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4745–4750.
- 41 Abd-Alla MD, Jackson TF, Rogers T, Reddy S & Ravdin JI. Mucosal immunity to asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection is associated with a peak intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response. *Infect Immun* 2006; **74**: 3897–3903.
- 42 Ghosh PK, Mancilla R & Ortiz-Ortiz L. Intestinal amebiasis: histopathologic features in experimentally infected mice. *Arch Med Res* 1994; **25**: 297–302.
- 43 Houpt ER, Glembocki DJ, Obrig TG *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.
- 44 Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F & Martinez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984; **117**: 81–91.
- 45 Lotter H, Zhang T, Seydel KB, Stanley SL Jr & Tannich E. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *J Exp Med* 1997; **185**: 1793–1801.
- 46 Ivory C, Kammanadiminti S & Chadee K. Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. *Trends Parasitol* 2007; **23**: 46–48.
- 47 Corthesy B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol* 2007; **178**: 27–32.
- 48 Hanna RM, Dahniya MH, Badr SS & El-Betagy A. Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess. *Trop Med Int Health* 2000; **5**: 578–581.
- 49 Stanley SL Jr. Progress towards development of a vaccine for amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10**: 637–649.
- 50 Petri WA Jr, Chaudhry O, Haque R & Houpt E. Adherence-blocking vaccine for amebiasis. *Arch Med Res* 2006; **37**: 288–291.
- 51 Lotter H & Tannich E. The current status of an amebiasis vaccine. *Arch Med Res* 2006; **37**: 292–296.
- 52 Choi MH, Sajed D, Poole L *et al.* An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Mol Biochem Parasitol* 2005; **143**: 80–89.
- 53 Carrero JC, Petrossian P, Acosta E, Sánchez-Zerpa M, Ortiz-Ortiz L & Lacleste JP. Cloning and characterization of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by human secretory IgA antibodies. *Parasitol Res* 2000; **86**: 330–334.
- 54 Singh M & O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 1075–1081.
- 55 Fooks AR. Development of oral vaccines for human use. *Curr Opin Mol Ther* 2000; **2**: 80–86.
- 56 Thanavala Y, Huang Z & Mason HS. Plant-derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead. *Expert Rev Vaccines* 2006; **5**: 249–260.
- 57 Azad N & Rojanasakul Y. Vaccine delivery – current trends and future. *Curr Drug Deliv* 2006; **3**: 137–146.

	P I M	1 1 2 0	B	Dispatch: 17.4.09	Journal: PIM	CE: Parasit
	Journal Name	Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 10	FE: Yalmarathy

## Gonadectomy inhibits development of experimental amoebic liver abscess in hamsters through downregulation of the inflammatory immune response

C. CERVANTES-REBOLLEDO,<sup>1</sup> N. MORENO-MENDOZA,<sup>2</sup> J. MORALES-MONTOR,<sup>1</sup> P. DE LA TORRE,<sup>1</sup> J. P. LACLETTE<sup>1</sup> & J. C. CARRERO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México; and <sup>2</sup>Department of Cellular Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

### SUMMARY

*Incidence of amoebic liver abscess (ALA) in human males is considerably higher than in females, suggesting a role for sex hormones in this parasite infection. We describe here the effect of hamster gonadectomy on the development of ALA. After monitoring the decrease of oestradiol in females and testosterone in males to undetectable levels by ELISA and RIA in serum, hamsters were intraperitoneally infected with Entamoeba histolytica trophozoites and killed 7 days later. ALA was absent in 50% of male and 15% of female gonadectomized (Gdx) hamsters, in comparison with 100% infection in non-Gdx controls. This protection against ALA in Gdx hamsters was concomitant to a comparatively scarce inflammatory infiltrate and necrosis surrounding clusters of trophozoites in the liver tissue, as well as to a lack of response of spleen cells to Con A, evaluated in proliferation assays. As tissue damage in ALA has been associated with a local inflammatory Th1 response, we determined the profile of response in hamsters by immunohistochemistry on liver sections. In contrast to strong Th1 responses in non-Gdx animals, Gdx females and males exhibited Th2 and Th3 profiles of cytokines, respectively, suggesting that protection against ALA following gonadectomy, could be related to downregulation of liver Th1 response during amoebic infection.*

**Keywords** amoebic liver abscess, cellular immune response, gonadectomy, protection, sex hormones

Correspondence: Julio C. Carrero, Departamento de Immunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México (e-mail: carrero@servidor.unam.mx).  
Disclosures: None

Received: xx Xxxxx 200x

Accepted for publication: 26 March 2009

### INTRODUCTION

Evidence is accumulating to support the notion that prevalence and intensity of parasitic infections are higher in males than in females (1–4). The interactions between the nervous, endocrine and immune systems are gaining attention as determinants for the control of parasitic infections. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis appears to be involved in these regulations through the direct action of hormones on parasite growth as well as their effect on the host immune response (1,2). Androgens in males and oestrogens in females, have received a special consideration for their immunomodulatory properties. Androgens may decrease and oestrogens may enhance the outcome of the immune response, possibly by modulating the expression of specific genes (3–5) through the binding of sex hormones to functional steroid hormone receptors expressed in innate and adaptive immune cells (6–8). The triggering of steroid receptors in immune cells by hormones induces the activation of signalling pathways, including that of the nuclear factor- $\kappa$ B, resulting in the expression of diverse cytokines and chemokines that recruits more immune cells to the site of infection and helps to shape the type of immune response, Th1 or Th2 (8,9).

*Plasmodium* spp. and *Trypanosoma cruzi* are good examples about the influence of sex hormones on the susceptibility to parasitic infections. Different vertebrate hosts infected with *Plasmodium* show a pronounced sexual dimorphism (SD) (10), translated in higher parasitaemia and mortality in males than in females, suggesting the involvement of sexual hormones and immunological differences between sexes as responsible for such outcomes (11,12). Moreover, male castration of mice reduces the parasitaemia and mortality caused by *Plasmodium* and *Trypanosoma* (13–16), whereas gonadectomy of females

increased the parasitaemia in mice infected with *T. cruzi* (16,17). Even though there is no clear evidence of SD in humans, indirect observations suggest a lower severity and frequency of illness by *T. cruzi* in women (18,19).

Amoebiasis caused by *Entamoeba histolytica* remains as one of the leading parasite diseases worldwide, responsible for about 100,000 deaths throughout the world (20). This parasite invades the intestinal mucosa causing amoebic colitis and ulcers. It may also spread to other organs, mainly the liver, resulting in amoebic liver abscess (ALA) (20). Although information is scarce, epidemiological data has pointed out that sex hormones could play a role on the development of *E. histolytica* human infections, mainly ALA. Thus, is well documented in adults that depending on the studied area and age, ALA is five to sevenfolds more prevalent in men than women (21,22). This difference is less clear in the case of intestinal amoebiasis; however, symptomatic intestinal amoebiasis in adults appears, in contrast to ALA, to be more common in women than men (20). These variations in the susceptibility associated to sex suggest that sex hormones could be involved in the developing of amoebic infection.

Noteworthy, in spite of such SD in human incidence of extraintestinal amoebiasis, very few studies have focused in determine the role of sex hormones on animal models of *E. histolytica* infection. An early report proposed that estrogens confer protection against development of ALA in hamsters (23). The only reported effect for progesterone, deals with the positive effect of this hormone in the migration of trophozoites from the intestine to the liver in gerbils (24). More recently, differences within genders in the control of ALA was reported in C57BL/6 mice. In contrast to males, females rapidly cleared the parasites, recruited higher numbers of NKTCs to the infection site, and produced higher levels of interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), suggesting a SD (22). We have previously reported an inhibitory action of dehydroepiandrosterone (DHEA) and stimulatory effect of cortisol on the *in vitro* proliferation of *E. histolytica* trophozoites. However, sex hormones such as progesterone, oestradiol and testosterone did not show effect on the *in vitro* trophozoite's proliferation (25). According with the experimental evidence presented above that supports that host sex is relevant during amoebiasis, and due to the fact that mammalian hosts' SD in amoebiasis it is a scarcely and superficially studied biological phenomenon of considerable significance for individual health, behaviour and lifestyles of several mammalian species, the object of the present study was to explore the possible SD in the a experimental model of amoebiasis in which this has not been explored before (hamster) and to look to important aspects of the immune response *in vivo* and *in vitro*. We hypothesized that differences between

sexes in hamsters could not really be detected due to the over-activation of the Th1 immune response that mask differences associated to sexual hormones, leaving open the possibility of detect differences upon gonadectomy, as resulted in our experiments.

Our findings, shows that a sexual hormone deficiency induced by gonadectomy, reduced the immune response and damage caused by *E. histolytica* in hamster liver, suggesting that immune and endocrine system interactions play a fundamental role in the establishment, development and outcome of ALA.

## MATERIALS AND METHODS

### Parasites

Axenic HM1:IMSS *E. histolytica* trophozoites were maintained in TYI-S-33 medium supplemented with 15% adult bovine serum (Biofluids), 3% Diamond's vitamin mix (JRH, Biosciences), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin sulphate at 37°C under anaerobic conditions.

### Animals

Male and female golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) of 6–8 week old and about 100 g were used. They were kept in plastic cages, with water and food being provided *ad libitum*. Animals were divided into five groups; two noninfected groups: intact and gonadectomized (Gdx); and three infected groups: infected, Gdx + infected and sham (surgery treatment without removal of gonads followed by liver infection). The number of animals for group was as follows: intact and Gdx, 20 each (10 females and 10 males); infected and Gdx + infected, 80 each (40 females and 40 males); sham, 28 each (14 females and 14 males).

### Gonadectomy

The animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of anesthesal (60 mg/kg) and testes or ovaries were bilaterally removed under sterilized conditions. The Gdx and sham hamsters were maintained for 2 weeks before used for further experiments.

### Determination of testosterone and oestradiol

Blood samples were obtained from each animal on three occasions. In the Gdx group, at the beginning of the experiment (before gonadectomy), before the infection (15 days after gonadectomy) and at killing (22 days after

gonadectomy). In the other groups, blood samples were also collected at the same days during the running experiment. Samples (0.5 mL) were obtained from the retro-orbital sinus under anaesthesia and the serum stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used. Serum testosterone levels were determined using a testosterone enzyme immunoassay (EIA) kit (Diagnostic System Laboratories, Inc., USA) and oestradiol levels using an enzyme-linked fluorescent assay (Biomerieux, Francia).

### Infection with parasites

Hamsters were infected for induction of ALA as described elsewhere. In brief, the animals were anaesthetized with anesthesal (60 mg/kg) and the portal vein was exposed by laparotomy under aseptic conditions. Trophozoites ( $5 \times 10^5$ ) washed three times in PBS and resuspended in 100  $\mu\text{L}$  PBS were directly inoculated into the portal vein using a tuberculin syringe, followed by the immediate application of a gel-foam pad at the site of inoculation in order to avoid bleeding and loss of amoebas. Hamsters were sacrificed after 7 days and the livers removed and weighed. Abscess were excised from the liver tissue and also weighed. Liver samples containing abscesses were also fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 1 h and then stored in 30% sucrose for histological analysis.

### Splenocyte proliferation

Spleens were removed and splenocyte cultures were carried out in polystyrene 96-well flat bottom plates using  $5 \times 10^5$  cells/well in RPMI medium supplemented with 10% bovine foetal serum, with or without the addition of 1  $\mu\text{g}$ /well Con A. Cultures were incubated for 48 h in wet chambers at  $37^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  and subsequently, tritiated thymidine was added (1  $\mu\text{Ci}$ /well in 20  $\mu\text{L}$  of medium). After an additional 24 h of incubation, cells were filtered in special glass filters, and collected in a cell harvester. The amount of radioactivity incorporated in the cellular DNA was assessed by using scintillation liquid and a  $\beta$ -plate counter. Each test was carried out in triplicate.

### Histological studies

Liver tissue with abscesses were embedded in paraffin and processed for histology by standard techniques. In brief, serial sections of 20  $\mu\text{m}$  thicknesses were obtained in a microtome, placed on slides coated with poly-L-lysine (Sigma), deparaffined, and finally stained with haematoxylin and eosin for light microscopy analysis.

### Immunohistochemistry

Antibodies anti-mouse IL2, IL1 $\beta$ , IL5 and TGF- $\beta$  done in rabbit, anti-mouse INF- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL12, IL10, IL6 and IL13 done in goat, and anti-mouse IL4 done in rat were used as primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, USA). Anti-rabbit IgG and anti-goat IgG conjugated with rhodamine (TRITC) and anti-rat IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (ZIMED Laboratories Inc., USA) were used as secondary antibodies. ALA-containing liver lobes were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, washed with PBS and stored in PBS containing 30% sucrose at  $4^{\circ}\text{C}$ . The next day, the samples were embedded in tissue-freezing medium (Leica, Nussloch, Germany) and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  (dry ice hexane). Serial sections of 20  $\mu\text{m}$  thicknesses were obtained using a cryomicrotome, placed on slides coated with poly-L-lysine (Sigma) and air dried. Sections were treated with 1% Triton X-100 after blocking with 1% albumin (BSA) and incubated with primary antibody overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  diluted in 1 : 1000 BSA. After rinsing in PBS, the sections were incubated with the secondary antibody during 1 h at room temperature diluted in 1 : 500 BSA, washed in PBS and embedded in DAKO fluorescent mounting medium (DAKO, USA). Liver sections processed without the primary antibody were used as negative controls.

For each group, several field images of ALA were captured and analysed by semi-quantitative immunofluorescence laser confocal microscopy. In brief, TIFF images were acquired with the TCS-SP1 software and imported into Image Pro Plus for subsequent measuring of the immunofluorescence intensity. In each image, representative areas were selected and, with the exposure times kept constant, the intensity of fluorescence was quantified and expressed as the mean pixel intensity for that region. For each animal, at least six randomly selected areas were analysed. Data was statistically analysed and values were expressed as mean  $\pm$  SE.

### Statistical analysis

Statistical significance between groups was determined by ANOVA followed by *post hoc* Tukey test. The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of mean. Differences were considered significant from a  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Amoebic liver infection by itself induces changes in the level of sex hormones in hamsters

Previous to the infection experiments, levels of oestradiol in females and testosterone in males were determined

before and after gonadectomy. Results showed physiological levels of both hormones for hamsters of 4- to 6-week old, in all animals previous to gonadectomy. Fifteen days after gonadectomy and before the infection with trophozoites, the serum concentration of oestradiol in females and testosterone in males, decreased from  $14.2 \pm 0.7$  pg/mL and  $1.2 \pm 0.2$  ng/mL, respectively, to undetectable levels, indicating that castration effectively resulted in a marked reduction in the novo synthesis of sex hormones. Once confirmed the deficiency of hormones, hamsters of all groups excluding the intreated and Gdx groups, were intraperitoneally infected with virulent trophozoites of *E. histolytica*. By the time of killing (7 days post-infection), concentration of both hormones in the Gdx animals (oestrogens in female and testosterone in males) continued undetectable (not shown). Interestingly, hormone determinations in the infected group showed that infection by itself affects the level of oestrogens and testosterone in hamsters. Blood concentrations of both hormones in females diminished significantly upon infection (oestradiol from  $15 \pm 1.6$  pg/mL to  $11.7 \pm 0.5$  pg/mL and testosterone from  $0.07 \pm 0.01$  ng/mL to  $0.03 \pm 0.01$  ng/mL;  $P < 0.05$  for both hormones). In contrast, liver infection of male hamsters resulted in a blood increase of oestradiol ( $9.6 \pm 0.4$  ng/mL before infection to  $12.7 \pm 0.5$  ng/mL at 7 days post-infection;  $P < 0.05$ ), whereas testosterone diminished drastically (from  $1.2 \pm 0.3$  ng/mL to not detectable levels;  $P < 0.05$ ). In the uninfected groups, the hormone levels remained constant throughout the experiment (data not shown).

### Hormone deficiency inhibits the development of ALA

Induction of hormonal deficiencies in hamsters by gonadectomy, resulted in a marked reduction in the number and

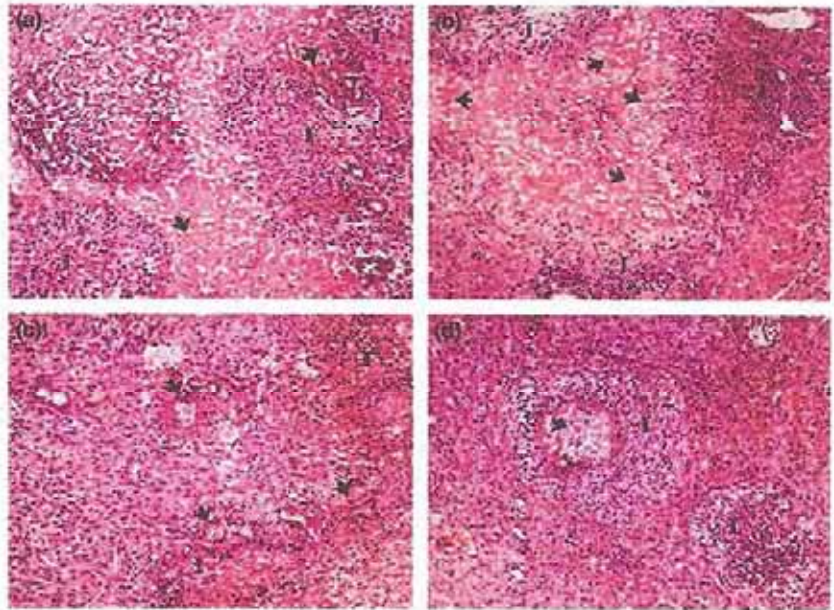
size of liver abscesses evaluated 7 days post-infection (Table 1). Thus, 19 out of 40 Gdx males and 34 out of 40 Gdx female hamsters developed any ALA, in comparison with 40 out of 40 females and 40 out of 40 males infected hamsters in the infected group (Table 1), and 14 out of 14 females and 14 out of 14 males infected animals in the sham group (not shown). Moreover, significant statistical differences were also observed in the weights of complete livers and abscesses between the Gdx animals that developed any ALA and the animals of the infected group (Table 1). Differences between sexes were also observed in the Gdx + infected group but not in the infected group. Thus, whereas the number and size of abscesses in livers was similar between sexes within the infected group hamsters (82.8% of the liver in males and 80% of the liver in females with damage), the extent of damage in the Gdx + infected group was lower in males than in females (32.8% and 45.3% respectively Table 1). Analysis of histological sections from liver abscesses of the infected group animals showed extensive necrotic damage and tissue liquefaction associated with an intensive inflammatory infiltrate, mainly represented by neutrophils and lymphocytes, throughout all the liver lobes. Scarce trophozoites distributed along the necrotic liver tissue were also observed (Figure 1a, b). In contrast, focal inflammatory infiltrates surrounding clusters of trophozoites were observed in tissue sections from ALA in the Gdx + infected group hamsters. Necrosis was scarce and also focal, only detected beneath the cluster of trophozoites and in the interphase between such clusters and the surrounding inflammatory focus (Figure 1c, d). This focal inflammation was always smaller in the ALA from Gdx males in spite of being surrounding cluster of 20 or more trophozoites, in comparison with Gdx females where the inflammation was less focal and surrounding clusters of three to four trophozo-

**Table 1** Comparison of the liver and abscess weights between not treated and gonadectomized hamsters

Group	Livers							
	ALA		Liver weight (g) <sup>a</sup>		Abscess weight (g) <sup>a</sup>		Ratio ALA/liver × 100	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Normal control	NA	NA	4.5 ± 0.5	5 ± 0.4	NA	NA	NA	NA
Gonadectomized control	NA	NA	4 ± 0.3	4.1 ± 0.3	NA	NA	NA	NA
Infected control	40/40	40/40	14 ± 2.3	11.1 ± 2.5	11.6 ± 2.7	8.9 ± 1.6	82.8%	80%
Gonadectomized and infected	19/40	34/40	7 ± 1.2*	8.6 ± 1.6*	2.3 ± 1.8*	3.9 ± 1.3*	32.8%	45.3%

<sup>a</sup>Data are presented as mean ± standard deviation. \*Statistical significant differences ( $P < 0.05$ ) are observed in the weight of the livers and abscess of the gonadectomized and infected animals respect to the infected controls (without gonadectomy). F, female; M, male; NA, not applicable; ALA, amoebic liver abscess.

COLOUR



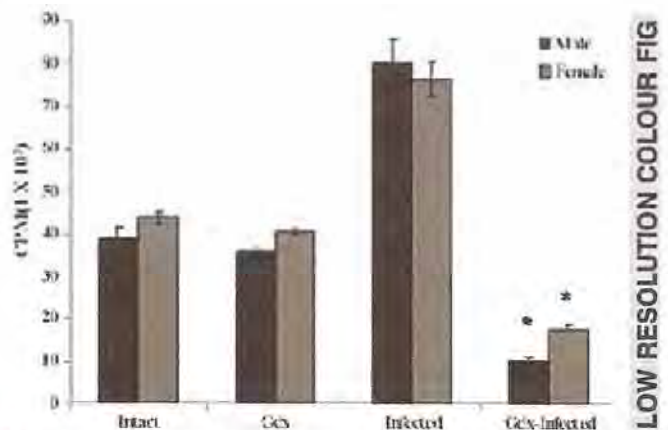
**Figure 1** Histological sections of ALA from hamsters of infected and Gdx + infected groups. Abundant inflammatory infiltrate including neutrophils, lymphocytes and macrophages with few and dispersed trophozoites are observed in ALA from female (a) and male (b) hamsters of the infected group. In contrast, moderate cellular infiltration with clusters of 3–4 trophozoites in female (c) and minimal cellular infiltration with clusters of more than 20 trophozoites in male (d) are observed in the few abscesses developed in the hamsters of the Gdx + infected group. Inflammatory infiltrate (I), trophozoites (arrows).

ites (Figure 1c, d). Differences between Gdx + infected male and female hamsters were statistically supported, suggesting that testosterone more than oestrogen may be involved in the establishment of infection and tissue damage during liver colonization by *E. histolytica* in hamsters. The weight as well as the macroscopical and histological appearance of livers from the sham group hamsters was similar to those of the infected group, whereas the Gdx group was similar to the intact group hamsters (data not shown).

**Amoebic liver infection, in the context of a hormone deficiency, downregulates cellular proliferation in hamsters**

As liver inflammatory infiltration was reduced in the Gdx + infected group hamsters, we determine the ability of immune cells in spleen for proliferation in the presence of a T-cell mitogen. Spleen cell proliferation in response to Con A was reduced 87% in males and 77% in females Gdx + infected animals compared to the infected group, which showed quite the double of proliferation than the intact and Gdx groups without noticeable gender differences (Figure 2). This result is particularly interesting because of the growing evidence suggesting that cellular immune response is the main responsible for tissue damage in hamster ALA (26,27). Furthermore, within the Gdx + infected group, spleen cell proliferation was about 40% lower in males than in females (Figure 2). These results correlate well with the less extensive damage observed in the livers of Gdx + infected males, compared

to the paired females (Figure 1). Finally, spleen cells from female and male hamsters of the Gdx group, showed similar Con A proliferation to their gender counterparts of the intact group normal controls, indicating that gonadectomy by itself did not affect this proliferative response (Figure 2).



**Figure 2** Proliferation of splenocytes from hamsters of infected and Gdx + infected groups. Splenocytes were incubated with 1 µg Con A and DNA replication determined by tritiated-thymidine uptake. Marked inhibition in T-cell proliferation is observed in both Gdx female and male hamsters in comparison with the other groups, being this inhibition significantly (\**P* < 0.05) lower in male than female hamsters. Splenocyte proliferation of hamsters of the Gdx group was similar to the intact group as well as between sexes of both groups. CPM, counts per minute.



### Hormone deficiency modulates, during infection, the cytokine expression in liver from a Th1 profile to a Th2 and Treg profiles

As tissue damage in hamster ALA has been related to a local Th1 inflammatory profile, we carried out immunohistochemical assays in tissue sections from ALA, in order to determine and compare the local profile of Th response in each group tested. The following Th1 inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), Th2 anti-inflammatory cytokines (IL-5, IL-13, IL-4 and IL-6), and regulatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ), were determined in hamsters of the intact, infected, Gdx and Gdx + infected groups. On semi-quantitative immunofluorescence laser confocal microscopy, the mean intensity of all tested Th1 cytokines was dramatically lower or absent in ALA sections from Gdx + infected males and females, in contrast to the high level of expression of these cytokines in the infected hamsters of both sexes (Table 2). This observation suggested that hormone deficiency in hamsters modified the inflammatory environment, previously proposed as responsible for liver lesions during hepatic infection by *E. histolytica* (26,27). Noteworthy, differences between sexes for the expression of Th1 cytokines were

**Table 2** Cytokine expression in livers from female and male gonadectomized and infected hamsters

Cytokines	Groups			
	Infected control <sup>a</sup>		Gonadectomized and infected <sup>a</sup>	
	M	F	M	F
<b>Th1</b>				
IL-1 $\beta$	46.5 $\pm$ 4.1	46.2 $\pm$ 2.7	0*	14.9 $\pm$ 1.1*
IL-2	56.2 $\pm$ 4.2	54.6 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.2*	3.9 $\pm$ 1.7*
INF- $\gamma$	46.6 $\pm$ 4.1	52.1 $\pm$ 3.3	0*	2.3 $\pm$ 1.1*
IL-12	53.4 $\pm$ 3.2	52.5 $\pm$ 3.8	0.2 $\pm$ 0.4*	9.4 $\pm$ 2.3*
TNF- $\alpha$	55.5 $\pm$ 1.8	42.6 $\pm$ 2.8	0*	5.6 $\pm$ 1.7*
<b>Th2</b>				
IL-5	43.7 $\pm$ 2.1	32.8 $\pm$ 3.3	0.5 $\pm$ 0.2*	9.0 $\pm$ 1.2*
IL-13	44.0 $\pm$ 3.6	25.0 $\pm$ 3.0	0.6 $\pm$ 0.2*	7.8 $\pm$ 1.5*
IL-6	28.4 $\pm$ 1.2	25.7 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 1.3*	13.4 $\pm$ 1.1*
IL-4	50.5 $\pm$ 0.6	49.8 $\pm$ 3.3	50.0 $\pm$ 0.7	40.0 $\pm$ 2.1*
<b>Treg</b>				
IL-10	8.0 $\pm$ 1.1	32.6 $\pm$ 6.1	58.5 $\pm$ 3.0*	5.0 $\pm$ 2.0*
TGF- $\beta$	30.0 $\pm$ 3.0	34.1 $\pm$ 1.5	66.6 $\pm$ 3.1*	7.0 $\pm$ 1.6*

<sup>a</sup>Fluorescence intensity data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \*Statistical significant differences ( $P < 0.05$ ) are observed in the fluorescence intensity of Th1, Th2, and regulatory cytokines of livers from male and female gonadectomized and infected hamsters respect to their gender counterpart infected without gonadectomy. F, female; M, male.

still clear in the Gdx + infected group animals. Thus, in contrast to the females where low but detectable expression of all Th1 cytokines tested was observed (Table 2), males showed null expression of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , in combination with a statistically significant decrease in the expression of IL-2 and IL-12 when compare with the expression in females (Table 2). Moreover, the level of expression of Th1 cytokines in those males was similar to that determined in the intact as well as Gdx group hamsters (basal expression of IL-2 and IL-12 and null expression of the other cytokines in both sexes; data not shown). From these results, it is conceivable to think that the lower production of Th1 inflammatory cytokines and the decreased inflammatory infiltrate in males (compared to females), is associated with the scarce or complete absence of damage in most of the Gdx + infected male hamsters (Table 2).

A significant decrease in the fluorescence intensity of Th2 cytokines (with the exception of IL-4) was also observed in the ALA of Gdx + infected group hamsters, compared to the ALA of animals from the infected group that showed a Th2 cytokines expression as high as Th1, with a higher fluorescence intensity for IL-5 and IL-13 in males (Table 2). In addition, differences between sexes in the Gdx + infected group were also found: lower production of IL-13, IL-5 and IL-6 in the livers of males compared to females. In the intact and Gdx groups, Th2 cytokines were undetectable in the livers with no differences between sexes (data not shown).

Noteworthy, the expression of regulatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  was high in the ALA from Gdx + infected males compared to a partial expression in both sexes of the infected group and very low expression in the Gdx + infected females. In addition, low levels of IL-10 (8.0  $\pm$  1.1) were detected in males of the infected group when compared with the females of the same group (32.6  $\pm$  6.1) (Table 2). Probably, the increased expression of these regulatory cytokines in Gdx + infected males prevents the exacerbation of the inflammatory immune response needed for ALA development, resulting in smaller and fewer abscesses (Table 1). No signal for Treg cytokines was observed in both sexes of the intact and Gdx groups (data not shown).

## DISCUSSION

We show here that induction of sex hormone deficiency by gonadectomy of hamsters resulted in the inhibition of ALA development or in the reduction of the number and size of abscesses. This is in agreement with a number of observations in other parasitic infections showing that induction of hormonal deficiencies by gonadectomy,

influence the susceptibility of various hosts. For example, gonadectomy of male mice decreases the parasitaemia of *P. chabaudi*, *P. berghei*, *Leishmania major* and *T. cruzi*, whereas gonadectomy of females, in most cases, leads to an increase in the parasitaemia (13–17,28,29). In the case of *T. cruzi*, several animal models have shown higher levels of parasitaemia, more extensive tissue invasion, greater weight loss, and shorter survival rates in males than females (15,16). Such difference between sexes disappeared in Gdx female mice resulting in an *T. cruzi* increased parasitaemia (15,16). In addition, treatment of mice with oestradiol and progesterone decreases the number of blood trypomastigotes to the levels observed in control animals (17). Those results demonstrated that female gonadal hormones, especially oestrogen, play a fundamental role in the resistance to *T. cruzi*. In contrast, Gdx males showed lower parasitaemia compared to control animals, and hormonal replacement with testosterone restored parasitaemia to control levels, confirming the influence of male hormones in susceptibility to this infection (15).

Our results on hamster ALA are in agreement with those showing testosterone as involved in susceptibility to parasites infections. The half of Gdx + infected males did not develop any amoebic abscesses and the ALA progression in the other half was considerably reduced, suggesting that testosterone is a host factor favouring the development of ALA. Interestingly, we also observed a decrease, less marked than Gdx male hamsters, in the incidence or size of ALA in Gdx + infected female hamsters, in contrast with many models showing increased parasitaemias and symptomatology in Gdx females. Therefore, at least in the ALA hamster model, both hormones, but testosterone in a higher grade, appear to be involved in the establishment and development of the liver lesions by *E. histolytica*. This experimental observation appears grossly to correlate well with epidemiological data showing a higher incidence (up to sevenfold) of ALA in men than in women (21,22). However, experiments of hormone replacement following gonadectomy are needed before a mechanistic correlation is established (currently being carried out in our laboratory). In the meantime, proposals that a male higher exposure to infection could be responsible for this gender difference, cannot be ruled out. However, it is important to mention that the incidence of ALA still remains very high in males, even though the exposition of females to sources of amoebic infection has increased rapidly.

It is interesting that differences between sexes in ALA were only registered when the animals were Gdx. As this model has been described as highly susceptible to liver infection by amoeba, it is tempting to speculate that differences in normal animals are not detected due to an exacerbate inflammatory response that overcome any effect

due to the sex hormones. In this sense, growing evidence indicates that sex hormones modulate the function of the host immune system and thereby, influence the susceptibility or resistance to parasitic infections (3–5,30). Females appear to develop more robust and potentially protective humoral and cellular immune responses to antigenic challenges than their male counterparts. In contrast, androgens in males have frequently been related to more aggressive and damaging immune responses to microbial stimuli (31). As both sex hormones have the capacity to affect the cellular immune responses, the hormone deficiency in Gdx hamsters downregulated this response as we observed in Figure 2. Such immunosuppressive stage could be responsible (or contribute) for the observed decrease in liver inflammation, and in turn, in the reduction of the liver injuries, and the inhibition of ALAs development in the Gdx hamsters. This is in agreement with recent reports showing that the host cellular response appears to foster the establishment and development of ALA on hamsters, instead of playing a protective role (26,27).

Histological sections from the ALA of Gdx + infected males revealed a high number of aggregated trophozoites forming circles with a necrotic core, and surrounded by fibrotic tissue and local inflammatory infiltrate. A similar arrangement of the trophozoites was observed when hamsters were treated with cyclosporine A, a T-cell immunosuppressive agent that also inhibits ALA (27). Therefore, deficiency of androgens (and of oestrogens to a lower grade) in hamsters apparently results in an immunosuppressive state, that favours proliferation of trophozoites in the liver and inhibits their migration or invasive activity. In agreement with our results, immunosuppressive effects by gonadectomy was also observed in females of *Calomys callosus* infected with the 'Y' strain of *T. cruzi*, in spite of the fact, that in this case, immunosuppression induced an increase in the parasitaemia during the course of infection (16). This hypothesis is controversial to the notion that androgens play an immunosuppressive role as observed in autoimmune diseases (32,33).

In experimental ALA in hamsters, the acute inflammatory response is characterized by the presence of neutrophils, macrophages and lymphocytes, that promote destruction of the surrounding cells (26,27,34). Even though INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  activate neutrophils and macrophages *in vitro* resulting in amoebicidal activity mediated by nitric oxide (35–37), experiments *in vivo* have shown that neutrophils and macrophages are not capable of killing amoebas, probably due to the superoxide dismutase and to the oxidoreductase produced by the trophozoites, which inhibit the respiratory burst (38). It is also known that macrophages from ALA are unresponsive to TNF- $\alpha$  and bacterial LPS (38). The host's cellular immune

response against parasites is regulated by cytokines, and therefore the Th1/Th2 type polarization can result in protection or susceptibility (39). Several reports have described the ability of sex hormones to influence all cellular types of the innate and adaptive immune systems, thereby influencing a multitude of immunological functions (40,41). Moreover, sex hormones influence the development, maturation and state of activation of T lymphocytes, including the Th1/Th2 balance (42,43).

It has been reported that in the late phase of ALA in gerbils, when animals recover from an acute immunosuppression, a Th1 response and particularly IL-2 seems to be the major cytokine responsible for protection, whereas Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) seem to associate with susceptibility (44–46). However, there are no studies demonstrating such apparently roles of Th1 and Th2 responses in ALA, as well as on the role of regulatory cytokines on the susceptibility or resistance to invasive amoebiasis in hamsters. Our study sampled a broad profile of the cytokines that supposedly influence the course of amoebic liver infection in hamsters. Semi-quantitative immunohistochemical analysis on confocal images of ALA from Gdx + infected female hamsters, suggested that the deficiency of sex hormones resulted in a polarization of the cellular response to the Th2 type, which could protect the liver from the damage caused by the Th1 response developed in the animals of the infected group (Table 2). On the other hand, Gdx + infected male hamsters exhibited a high profile of regulatory cytokines, mainly TGF- $\beta$ , suggesting an even better control of the Th1 response and therefore, a higher level of protection against ALA (Table 1). The protective effect of the Th1 response found in gerbils against ALA, is observed only after 20 days post-infection (47). The course of infection in hamsters is more acute and aggressive; most of the animals die in 1–2 weeks (47). Our results support the notion that a strong Th1 response is responsible for tissue destruction as described elsewhere (26,27), being the sex hormones necessary, at least in part, for this Th1 response to take place (Gdx hamsters of both sexes did not develop a Th1 response).

Hormone deficiency could also have a direct effect on the parasite. In this regard, amoebas have the ability to modulate the expression of molecules related with virulence upon contact with host components, including hormones. In other parasites, specific hormone receptors have been shown to regulate the expression of diverse molecules (48,49). Our preliminary data indicate that a nonclassic receptor for DHEA is present in the trophozoites of *E. histolytica* (not shown). DHEA is an adrenal hormone with multiple functions able to affect the growth of several parasites, including amoeba (25,49).

Although the hamster model used here possibly does not reflect many aspects of human ALA, a set of interactions are established between the parasite, the immune system and the endocrine system, which define the outcome of the infection caused by *E. histolytica*. Evidence is presented here, showing that deficiency of sex hormones in hamsters reduces progression of ALA, possibly due to reduced inflammatory and Th1 immune responses, suggesting that interactions between the immune and endocrine systems play a fundamental role in the establishment, development and outcome of extraintestinal amoebic infection in hamsters.

The evidence presented in our work illustrates the importance of immunoendocrine interactions in an immunocompetent host. It strongly suggests an important role for sex steroids in the cytokine network. In practical matters, the complexity of the immunoendocrine interactions suggests that all physiological factors (i.e. sex, age and developmental stage) should be taken into account in the design of vaccines and new drugs. Interventions aimed at the hormonal network appear as a possible new therapeutic approach to control several immune confrontations, such as amoebiasis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by DGAPA grants IN-227707 (JCC) and IN-230207 (JPL) and CONACyT grants 61111 (JCC) and 61334 (JPL). CCR has a fellowship from CONACyT. We thank M. Nequiz for supplying HM1 : IMSS trophozoites and his assistance during the infection of hamsters. We also thank K. McGuigan for correcting the English version of the manuscript and G. Ishiura for hormone determinations.

#### REFERENCES

- 1 Homo-Delarche F, Fitzpatrick F, Christeff N, Nunez EA, Bach JF & Dardenne M. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; **40**: 619–637.
- 2 Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; **24**: 627–638.
- 3 Grossman C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J Steroid Biochem* 1989; **5**: 325–346.
- 4 Bouman A, Heineman MJ & Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 2005; **11**: 411–423.
- 5 Sapino A, Cassoni P, Ferrero E, Bongiovanni M, Righi L, Fortunati N, Crafa P, Chiarle R & Bussolati G. Estrogen receptor alpha is a novel marker expressed by follicular dendritic cells in lymph nodes and tumor-associated lymphoid infiltrates. *Am J Pathol* 2003; **163**: 1313–1320.

- 6 Wunderlich F, Benten WP, Lieberherr M, Guo Z, Stamm O, Wrehlke C, Sekeris CE & Mossmann H. Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids* 2002; **67**: 535–538.
- 7 Benten WP, Stephan C & Wunderlich F. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids* 2002; **67**: 647–654.
- 8 McKay LI & Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999; **20**: 435–459.
- 9 Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol* 2004; **26**: 247–264.
- 10 Benten WP, Ulrich P, Kühn-Velten WN, Vohr HW & Wunderlich F. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone. *J Endocrinol* 1997; **153**: 275–281.
- 11 Wunderlich F, Maurin WC, Benten WP & Schmitt-Wrede HP. Testosterone impairs efficacy of protective vaccination against *P. chabaudi* malaria. *Vaccine* 1993; **11**: 1097–1099.
- 12 Kamis AB & Ibrahim JB. Effects of testosterone on blood leukocytes in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Parasitol Res* 1989; **75**: 611–613.
- 13 Krücken J, Dkhil MA, Braun JV, Schroetel RM, El-Khadragy M, Carmeliet P, Mossmann H & Wunderlich F. Testosterone suppresses protective responses of the liver to blood-stage malaria. *Infect Immun* 2005; **73**: 436–443.
- 14 Cernetich A, Garver LS, Jedlicka AE, Klein PW, Kumar N, Scott AL & Klein SL. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. *Infect Immun* 2006; **74**: 3190–3203.
- 15 do Prado JC Jr, Levy AM, Leal MP, Bernard E & Kloetzel JK. Influence of male gonadal hormones on the parasitaemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1999; **85**: 826–829.
- 16 do Prado JC Jr, Leal MP, Anselmo-Franci JA, de Andrade Júnior HF & Kloetzel JK. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1998; **84**: 100–105.
- 17 Santos CD, Levy AM, Toldo MP, Azevedo AP & do Prado JC Jr. Haematological and histopathological findings after ovariectomy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Vet Parasitol* 2007; **143**: 222–228.
- 18 Mota EA, Guimaraes AC, Santana OO, Sherlock I, Hoff R & Weller TH. A nine year the prospective study of Chagas disease in a defined rural population in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1990; **42**: 429–440.
- 19 Castro C, Macedo V, Rezende JM & Prata A. Longitudinal radiologic study of esophagus, in an endemic area of Chagas disease, in a period of 13 years. *Rev Soc Bras Soc Med Trop* 1994; **27**: 227–233.
- 20 Radvin JI. Amoebiasis. In *Human Infection by Entamoeba Histolytica*. New York, Churchill Livingstone, 1988: 838.
- 21 Hughes MA & Petri WA Jr. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am* 2000; **14**: 565–582.
- 22 Lotter H, Jacobs T, Gaworski I & Tannich E. Sexual dimorphism in the control of amoebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun* 2006; **74**: 118–124.
- 23 González MF, Tanimoto WM, Vázquez SJA, Calderón P & Aguirre GJ. Efecto de los estrógenos en hámsteres con amibiasis en el hígado. *Arch Invest Méd* 1972; **2**: 335–244.
- 24 Gil JN, Ganguly KN, Majan RC, Bhusnurmath RS & Dilawari BJ. Progesterone-induced liver abscess in guinea-pigs-anew model. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; **77**: 53–58.
- 25 Carrero JC, Cervantes C, Moreno-Mendoza N, Saavedra E, Morales-Montor J & Laclette JP. Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*. *Microbes Infect* 2006; **8**: 323–331.
- 26 Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velazquez F & Martinez-Palomo A. Cellular bases of experimental amoebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984; **117**: 81–91.
- 27 Olivos-García A, Carrero JC, Ramos E, Nequiz M, Tello E, Montfort I & Pérez-Tamayo R. Late experimental amoebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetylcysteine. *Exp Mol Pathol* 2007; **82**: 310–315.
- 28 Wunderlich F, Marinovski P, Benten WP, Schmitt-Wrede HP & Mossmann H. Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasite Immunol* 1991; **13**: 357–367.
- 29 Mock BA & Nacy CA. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infect Immun* 1988; **56**: 3316–3319.
- 30 Roberts CW, Walker W & Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 476–488.
- 31 Marriott I & Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res* 2006; **34**: 177–192.
- 32 Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Jones TH & Channer KS. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis – immunomodulation and influence upon plaque development and stability. *J Endocrinol* 2003; **178**: 373–380.
- 33 Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Serio B & Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 2004; **13**: 635–638.
- 34 Salata RA & Ravdin JI. Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. *Rev Infect Dis* 1986; **8**: 261–272.
- 35 Denis M & Chadee K. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *J Leukoc Biol* 1989; **46**: 270–274.
- 36 Lin JY, Seguin R, Keller K & Chadee K. Tumour 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.
- 37 Ghadirian E & Denis M. In vivo activation of macrophages by IFN-gamma to kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *Parasite Immunol* 1992; **14**: 397–404.
- 38 Wang W, Keller K & Chadee K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology* 1994; **83**: 601–610.
- 39 Spellberg B & Edwards JE. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001; **32**: 76–102.
- 40 Lamason R, Zhao P, Rawat R, Davis A, Hall JC, Chae JJ, Agarwal R, Cohen P, Rosen A, Hoffman EP & Nagaraju K. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol* 2006; **7**: 2.

- 41 Roberts CW, Satoskar A & Alexander J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitol Today* 1996; **12**: 382–388.
- 42 Radojevic K, Arsenovic-Ranin N, Kosec D, Pesic V, Pilipovic I, Perisic M, Plecas-Solarovic B & Leposavic G. Neonatal castration affects intrathymic kinetics of T-cell differentiation and the spleen T-cell level. *J Endocrinol* 2007; **192**: 669–682.
- 43 Seiki K & Sakabe K. Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation. *Arch Histol Cytol* 1997; **60**: 29–38.
- 44 Kretschmer RR & Lopez-Osuna M. Effector mechanisms and immunity to amebas. In Kretschmer R (ed): *Amebiasis: Infection and Disease by E. Histolytica*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1990: 105–122.
- 45 Campbell D, Gaucher D & Chadee K. Serum from *Entamoeba histolytica*-infected gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting interleukin-2 production. *J Infect Dis* 1999; **179**: 1495–1501.
- 46 Campbell D & Chadee K. Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J Infect Dis* 1997; **175**: 1176–1183.
- 47 Tsutsumi V & Shibayama M. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. *Arch Med Res* 2006; **37**: 210–220.
- 48 de Mendonça RL, Escrivá H, Bouton D, Laudet V & Pierce RJ. Hormones and nuclear receptors in schistosome development. *Parasitol Today* 2000; **16**: 233–240.
- 49 Escobedo G, Roberts CW, Carrero JC & Morales-Montor J. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol* 2005; **21**: 588–593.