

TEMA 24. Introducción a la parasitología. Protistas.

Microbiología Clínica 2017-2018

Mirabai Cuenca Ardura

Inés Palacios Blanco

Henar Tomero Sanz



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular



ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. Introducción a la Parasitología.....	3
2. Quimioterapia y resistencia a drogas en protozoos parásitos.....	5
2.1. Aspectos de la resistencia a fármacos en protistas.....	6
2.2. P-glicoproteínas.....	8
2.3. Resistencia a arsenicales y a antimoniales	10
2.4. Resistencia a antifolatos.....	11
2.5. Resistencia a inhibidores de ornitina descarboxilasa	13
3. Inhibición de la apoptosis por parásitos protozoos intracelulares.....	14
3.1. Vías que conducen a la apoptosis.....	16
3.2. Inhibición de la apoptosis.....	18
3.3. Parásitos que interfieren con las vías apoptóticas.....	21
4. La muerte celular programada en organismos parásitos unicelulares.....	22
5. Los exosomas: vehículos de comunicación entre parásito y hospedador.....	26
6. Apéndice.....	31
7. Referencias.....	32

1. Introducción a la Parasitología

Pocas personas son conscientes de que hay de largo muchas más clases de parásitos que de organismos no parásitos en el mundo. Incluso si se excluyen los virus y las rickettsias, que son todos parásitos, y las muchas clases de bacterias y hongos parásitos, los parásitos son aún la mayoría.

En general la vía parasitaria de vida es **altamente exitosa**, dado que evolucionó independientemente en casi cada uno de los filum de animales, desde protozoos a artrópodos y cordados, al igual que en muchos grupos de plantas.

Los organismos que no son parásitos son normalmente hospedadores. Los humanos, por ejemplo, son hospedadores de más de un centenar de tipos de parásitos, sin contar tampoco virus, bacterias y hongos.

Los **protozoos parásitos** matan o debilitan más gente en el mundo que cualquier otro grupo de organismos.

Los protozoos son eucariotas monocelulares que tradicionalmente se consideraban un único filum de animales, aunque se reconocía que este grupo era un gran ensamblaje heterogéneo que con casi toda certeza era no monofilético. De hecho, el propio término “protozoo” está en cuestión y se recomienda utilizar el término “**protista**”, que sirve para referirse a cualquier microbio eucariota unicelular. Estos, si dejamos a un lado a las bacterias, suponen la mayor diversidad de organismos actualmente existentes. Hasta ahora han sido descritas unas 66.000 especies de protistas, de las cuales unas 10.000 son parásitos.

En la figura 1 se muestran los **seis supergrupos** en los que actualmente se dividen los organismos **eucariotas**: Ofistocontes, amebozoa, excavados, arcaeplástidos, SAR (grupo formado por estramenopilos, alveolados y rizarios) y el grupo CCTH (también denominado Hacrobia).

Los parásitos que se van a estudiar en el bloque de Parasitología se encuentran localizados en los siguientes grupos. *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* se localizan en el supergrupo SAR, en un subgrupo denominado Apicomplexa. *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* pertenecen al supergrupo de los Excavados y se encuadran en el grupo de los Euglenozoa. Finalmente, *Entamoeba histolytica* está dentro del supergrupo de los Amebazoa y en el grupo de los Arcamoeba.

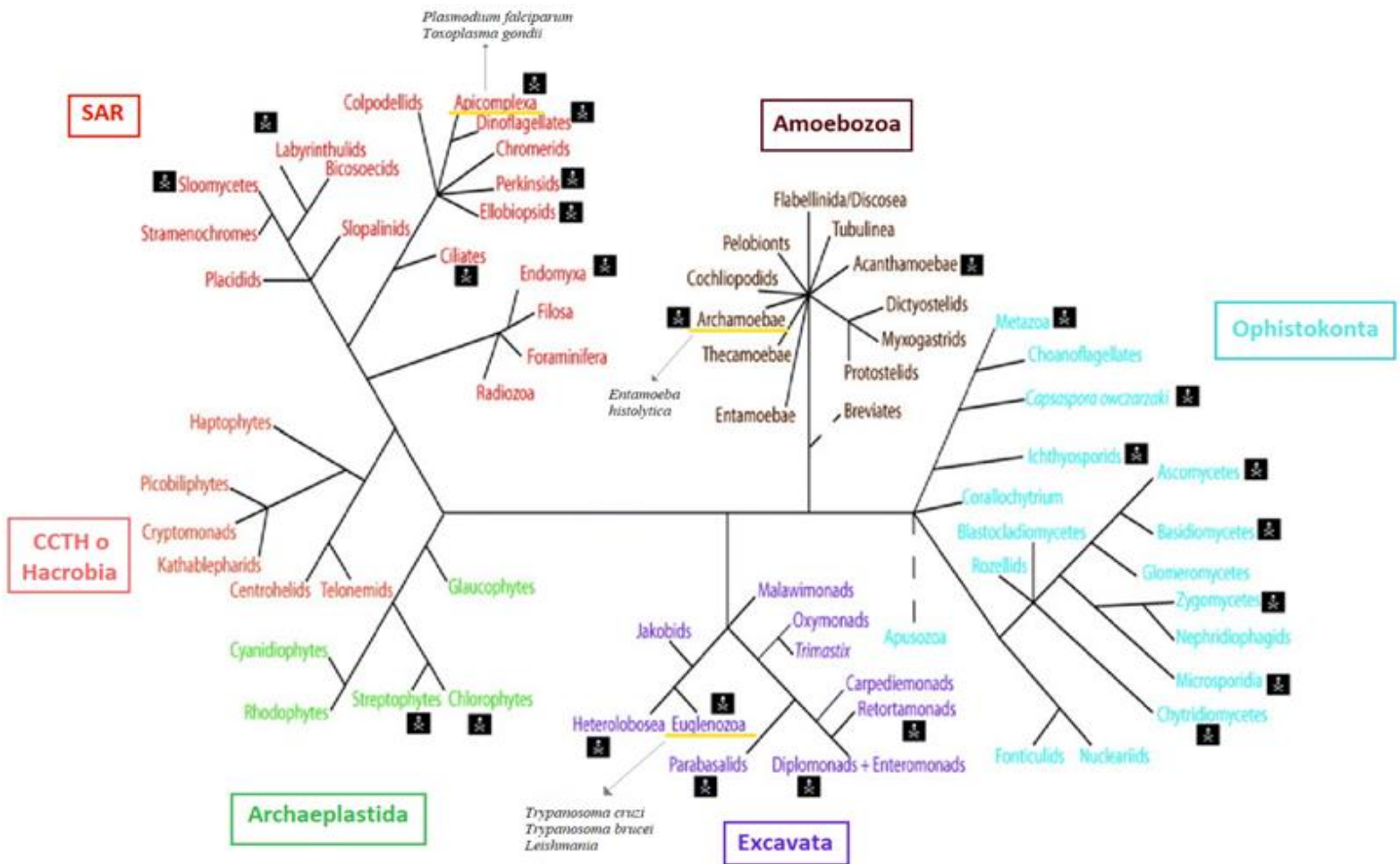


Figura 1. Árbol filogenético sin raíz de eucariotas. Este esquema de la diversidad eucariota muestra la clasificación para los 6 supergrupos y los grupos que los componen. Este árbol está basado en los resultados de numerosos análisis genómicos a gran escala y filogenéticos y en datos estructurales comparativos. Los “flags Jolly Roger” que aparecen al lado de los grupos taxonómicos denotan la presencia de parásitos de importancia para la agricultura o el ser humano. **Modificada de Walker et al. 2011.**

Los protozoos parásitos son responsables de algunas de las más devastadoras enfermedades de humanos y animales domésticos. Entre las enfermedades más serias que afectan a más de un cuarto de la población del mundo están las indicadas en la tabla 1:

Parásito	Enfermedad
<i>Plasmodium</i> spp.	Malaria
<i>Leishmania</i> spp.	Leishmaniosis cutánea, mucocutánea y visceral
<i>Trypanosoma brucei</i>	Enfermedad africana del sueño
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Enfermedad de Chagas
<i>Entamoeba</i> spp.	Disentería amebiana
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis

Tabla 1. Principales enfermedades infecciosas causadas por parásitos unicelulares.

Los protozoos parásitos son la causa de **enormes pérdidas de vidas y de productividad** de animales domésticos, tanto mamíferos como de aves.

Como veremos, todos presentan ciclos de vida complejos, muy bien orquestados, y a menudo establecen **relaciones parásito-hospedador** muy bien balanceadas que conducen a infecciones crónicas.

2. Quimioterapia y resistencia a drogas en protozoos parásitos

La mayor línea de defensa actualmente disponible frente a los protozoos parásitos es la **quimioterapia**. Hay esperanzas de que **vacunas** efectivas frente a enfermedades parasitarias en humanos puedan estar disponibles, ya que sí existen para combatir protozoos animales (tal y como se ilustra en el Apéndice 1), pero tales vacunas están siendo lentas en llegar, y, dado que los protozoos ya tienen unos ciclos evolutivos muy balanceados con sus hospedadores, cabe preguntarse si los aficionados a vacunas no están subestimando la habilidad de los protozoos para eludir al sistema inmunitario del mamífero. Además, la mayoría de las enfermedades protozoarias en humanos son **crónicas** y ocurren en pacientes inmunocompetentes, lo que nos habla de la dificultad de encontrar tales sistemas vacunales. Por consiguiente, a día de hoy, la única vía eficaz para combatir estas patologías es el tratamiento con fármacos.

Aunque los protozoos son eucariotas que normalmente contienen muchos de los orgánulos y vías metabólicas de sus hospedadores, las **diferencias bioquímicas entre el parásito y el hospedador** son lo suficientemente grandes para dejar una amplia ventana para el desarrollo de **drogas específicas** de parásito.

Hay que tener en cuenta que los protozoos difieren mucho más de una célula humana que de células de hongos o plantas. Sobre una escala evolutiva deducida a partir de las diferencias en los rRNAs de la subunidad menor, los protozoos tales como *Giardia lamblia* y *Trypanosoma brucei* son casi tan similares a *E. coli* como a humanos, tal y como esquematiza la Figura 2. Es decir, todos los parásitos que vamos a estudiar en este tema están evolutivamente muy alejados de nosotros. Esto hace relativamente sencillo

encontrar fármacos eficaces frente a estos parásitos con pocos o ningún efecto secundario.

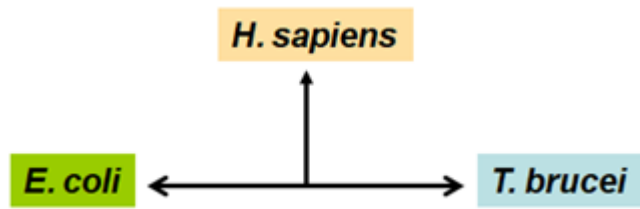


Figura 2. Esquema ilustrativo de la distancia evolutiva existente entre *Trypanosoma brucei* y *Escherichia coli*, que es muy similar a la que existe entre *T. brucei* y *Homo sapiens*. Esto explica la relativa facilidad de encontrar drogas específicas contra los parásitos, con pocos o ningún efecto secundario en humanos.

Por ello, no resulta sorprendente que existan drogas bastante efectivas para el tratamiento de muchas de estas enfermedades protozoarias. Sin embargo, el panorama se está enturbiando debido a la gran capacidad de estos parásitos de desarrollar **resistencias**, que supera en algunos casos la de las bacterias.

Aunque los **estudios de los mecanismos de resistencia** a drogas no pueden evitarla, sí pueden ayudar a realizar un tratamiento más racional a tres niveles:

- 1) El desarrollo de herramientas de diagnóstico para **reconocer la resistencia de forma temprana en la infección** e impedir la pérdida de tiempo con quimioterapia inútil y, a menudo, tóxica.
- 2) Indicar modos de **uso más racional** de drogas y combinaciones de drogas para minimizar el desarrollo de resistencias.
- 3) Encontrar **blancos de drogas** para el desarrollo de nuevos fármacos que no sean afectados por los mecanismos de defensa o resistencia más comunes.

2.1. Aspectos de la resistencia a fármacos en protistas

Para interferir con la multiplicación del parásito, una droga debe **encontrar al parásito** (a menudo dentro de una célula hospedadora) y **alcanzar su diana** dentro del parásito. Normalmente la droga debe **atravesar la membrana** del parásito, alcanzar una concentración suficiente y, a menudo, **ser activada** en el interior. Después de que la droga haya alcanzado su blanco, el parásito debe quedar lo suficientemente incapacitado para que sea matado por las defensas del hospedador o morir espontáneamente.

Cada una de estas etapas le da al parásito oportunidades para interferir con la acción de la droga, lo que resulta en la aparición de resistencia a la droga.

Los principales **mecanismos bioquímicos** responsables **de la resistencia** a drogas se ilustran en la Figura 3 y se detallan a continuación:

TEMA 24: Introducción a la parasitología. Protistas

- A) **Localización en “santuarios”** → Los patógenos, en particular los parásitos, pueden evadir la acción de drogas escondiéndose en santuarios (lugares de nuestro organismo de difícil acceso para las drogas) tales como el cerebro. El cerebro constituye un buen “santuario” porque muchas drogas no traspasan la barrera hematoencefálica.
- B) **Pérdida de sistemas de entrada** → Los fármacos entran en las células por sistemas de transporte o por difusión. Como consecuencia, la entrada de la droga puede ser frustrada por pérdida de los sistemas de entrada -en caso de que el fármaco entre a través de un transportador- o alteración de la composición de membrana -que cambia la permeabilidad de la misma para evitar la difusión pasiva del fármaco-.
- C) **Inactivación, secreción, etc.** → Una vez dentro del protista, las drogas pueden ser inactivadas, excretadas, modificadas y excretadas.
- D) **Supresión de mecanismos de activación** → Muchos fármacos tienen que activarse en el interior del parásito con alguna enzima (estaban en forma de pro-fármacos). Estos mecanismos de activación de drogas pueden ser suprimidos o perdidos, con lo que el parásito se volverá resistente.
- E) **Alteración de la unión del fármaco a su diana** → La interacción de la droga con su molécula blanco puede hacerse menos efectiva al aumentar el nivel de substratos que compiten con el fármaco o al alterar la molécula diana, de manera que sea menos sensible a la droga pero mantenga su actividad.
- F) **Rodeo del bloqueo** → El parásito puede aprender a vivir con un blanco bloqueado por un fármaco rodeando el bloqueo, es decir, a través de una vía alternativa que resulte en el mismo producto.
- G) **Activación de sistemas de reparación de daños** → El parásito puede hacer más eficientes sus sistemas de reparación ante los daños producidos por las drogas.

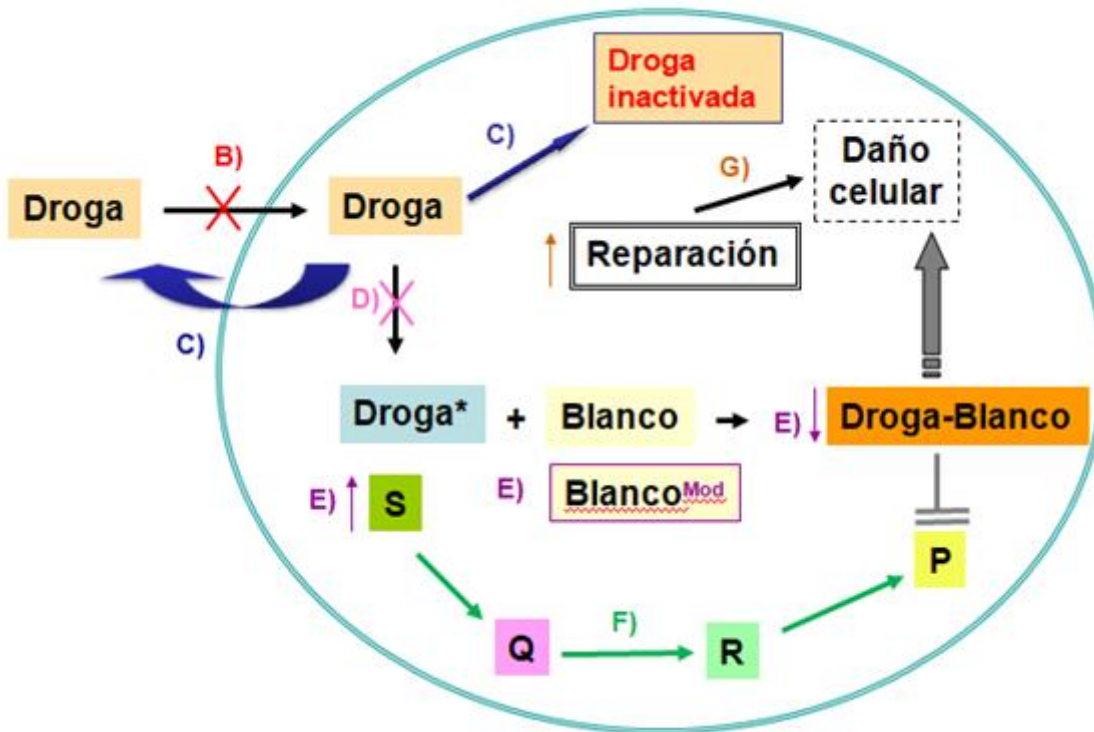


Figura 3. Esquema simplificado sobre los principales mecanismos bioquímicos de resistencia a fármacos en protistas, exceptuando el de localización del parásito en lugares de difícil acceso (“santuarios”) en el organismo. Las letras se corresponden con los mecanismos citados en el texto: **B)** pérdida de sistemas de entrada; **C)** inactivación o secreción de la droga; **D)** supresión de mecanismos de activación; **E)** alteración de la unión de la droga a su diana; **F)** rodeo del bloqueo; **G)** activación de sistemas de reparación de daños. **Modificada de figura en Borst & Ouellette (1995).**

A continuación se refieren algunos ejemplos que ilustran estos mecanismos de resistencia.

2.2. P-glicoproteínas

La importancia de las **P-glicoproteínas** y transportadores transmembrana relacionados para la **resistencia a drogas en distintos organismos** (no solo en parásitos) ha sido ampliamente demostrada desde que esta clase de proteínas fue descubierta en células tumorales de hámster con resistencia a múltiples drogas.

Las P-glicoproteínas pertenecen a una familia de transportadores que contienen el "cassette" de unión al nucleótido de adenina (transportadores ABC, "Adenine nucleotide Binding Cassette") y también son conocidas como ATPasas de tráfico ([Figura 4](#)).

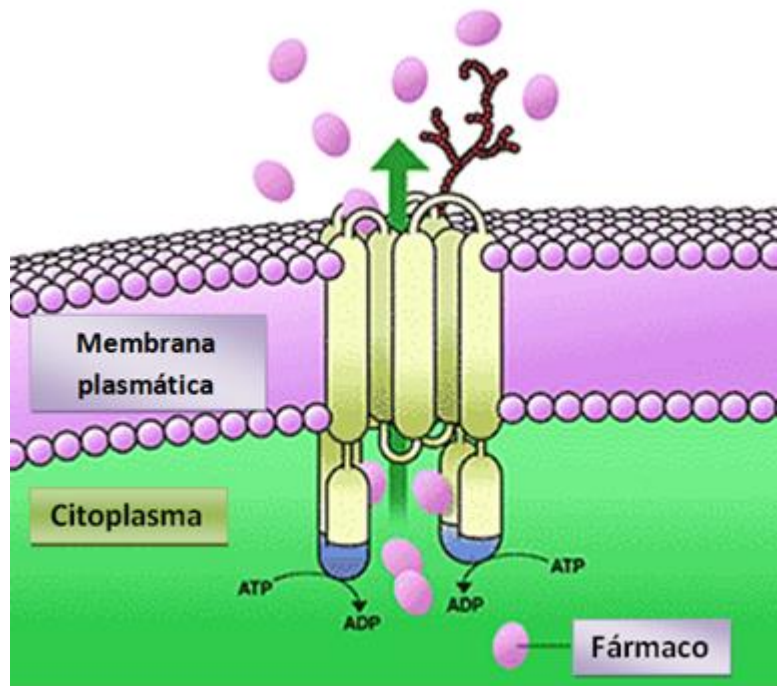


Figura 4. Dibujo esquemático de una P-glicoproteína. Estos transportadores se sirven de la energía procedente de la hidrólisis del ATP para translocar el fármaco desde el citoplasma al exterior de la célula, en contra de gradiente de concentración. Así, confieren resistencia a la droga, ya que esta no puede alcanzar una concentración intracelular suficiente y no llega a ser tóxica para el protista.

La resistencia a drogas es causada por la habilidad de las P-glicoproteínas por excluir drogas en contra de gradiente de concentración de forma dependiente de ATP, lo que resulta en una disminución de la concentración intracelular de droga en contacto con la molécula diana. Así, el fármaco nunca llega a ser tóxico para la célula tumoral o el parásito.

Hasta ahora se han descrito P-glicoproteínas en *Entamoeba*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Trichomonas* y *Trypanosoma*.

Así, por ejemplo, está el caso de la **resistencia a cloroquina**. La cloroquina es la droga de elección para el tratamiento de la **malaria**. Sin embargo, la emergencia de resistencia a esta droga en *Plasmodium falciparum* ha impedido un avance en el control de la malaria. Hacía tiempo que se conocía que el mecanismo predominante de resistencia a cloroquina se debía a una disminución en la cantidad de droga dentro del parásito. En 1987, dos observaciones pusieron de manifiesto que este mecanismo parecía estar relacionado con un proceso ligado a las P-glicoproteínas: 1) se vio que el flujo hacia el exterior de cloroquina aumentaba en los parásitos resistentes; 2) experimentos demostraron que el verapamil (un agente inhibidor de P-glicoproteínas para revertir la resistencia a múltiples drogas en células animales) y compuestos similares eran capaces de restaurar la sensibilidad a cloroquina en los parásitos resistentes.

Todo esto apuntaba a que las especies de *Plasmodium* resistentes a la cloroquina **sobreexpresaban una P-glicoproteína** encargada de sacar la droga (concretamente, la Pgh1, debido a la amplificación de su gen codificante *pfmdr1*), de manera que esta no pudiera afectar al parásito.

Es más, en abril de 2017, se publicó un estudio en el que se demuestra cómo ciertos polimorfismos y determinados cambios epigenéticos en ABCB1, un gen que codifica para otra P-glicoproteína, influyen la susceptibilidad a la malaria causada por *Plasmodium falciparum*.

2.3. Resistencia a arsenicales y a antimoniales

Los **oxianiones** en la forma de arsenicales aromáticos o drogas que contienen el metal relacionado **antimonio** son aún drogas de primera línea en el tratamiento de **tripanosomiosis** (enfermedad del sueño) y **leishmaniosis**.

El mecanismo de acción de estas drogas tampoco está muy claro, aunque parece afectarse la actividad de la **tripanotion-reductasa**. El tripanotion (Figura 5) es la principal molécula que contiene grupos tiólicos en el tripanosoma y es esencial para mantener un ambiente reductor intracelular, de forma similar al papel desempeñado por el glutatión en otras células eucarióticas.

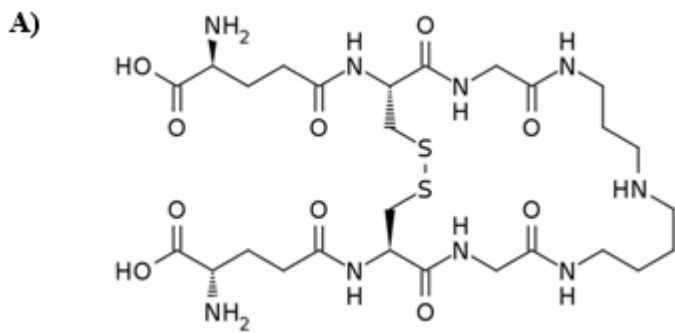
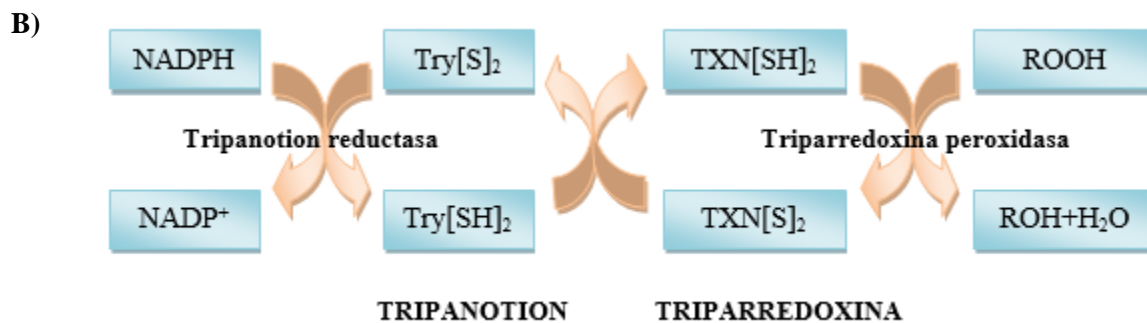


Figura 5. A) Estructura molecular del tripanotion. Sus grupos tiólicos, que aquí se presentan formando un puente disulfuro, son esenciales para mantener el estado reductor intracelular. El papel del tripanotion en protistas se asemeja al del glutatión en mamíferos.

B) Sistema redox basado en tripanotion característico de los tripanosomas. La tripanotion reductasa utiliza el poder reductor del NADPH para reducir el tripanotion. El tripanotion, al oxidarse, genera un intermedio reducido denominado triparredoxina. La triparredoxina es posteriormente oxidada por la triparredoxina peroxidasa para dar lugar a una molécula reducida y agua. **Modificada de Birkholtz et al. (2011)**



Debido a que la tripanotion-reductasa no existe en mamíferos, estas drogas **no provocan efectos secundarios**.

No obstante, hay parásitos resistentes a estos fármacos. En *T. brucei*, la resistencia a estas drogas parece estar asociada a la pérdida de un **sistema de transporte de adenosina**. Esto sugiere que este transportador es el que utilizan estos fármacos para entrar a la célula y que, por consiguiente, es bloqueado por el parásito.

Por otro lado, la falta de respuesta a antimoniales pentavalentes en *Leishmania* spp. se conoce desde hace tiempo, y se han aislado parásitos resistentes a antimoniales de pacientes que no respondían a la terapia. La resistencia en estos mutantes es estable en la ausencia de droga y se debe predominantemente a la acumulación disminuida de droga causada por un aumento en el flujo hacia el exterior.

Leishmania spp. a menudo responden a la selección de droga mediante la amplificación de partes específicas de su genoma, que presenta una gran plasticidad y es capaz de escindir ciertas regiones y replicarlas de forma extracromosomal, amplificándolas y conduciendo a la sobreexpresión de determinados genes. En concreto, varios amplicones fueron observados en *Leishmania* seleccionadas por su resistencia a oxianiones. El primer locus de amplificación caracterizado codifica para una P-glicoproteína llamada **PgpA**. Sin embargo, la implicación de esta proteína en el fenotipo de resistencia a drogas no ha podido ser demostrada. Más bien, la resistencia a estas drogas parece ser multifactorial.

2.4. Resistencia a antifolatos

La **dihidrofolato reductasa** (DHFR) y la **timidilato sintasa** (TS) catalizan reacciones consecutivas en la síntesis *de novo* de **dTMP**, por lo que son claves para la síntesis de DNA. Estas reacciones se ilustran en la [Figura 6](#). En protozoos, a diferencia con lo que ocurre con la mayoría de otras células, las dos enzimas están fusionadas, lo que origina la proteína DHFR-TS.

Las identidades de secuencia entre las DHFRs de microbios y mamíferos son pequeñas, lo que explica la eficacia y selectividad de los **antifolatos**- nombre que reciben las sustancias que inhiben a la DHFR. Por consiguiente, la enzima DHFR que cataliza la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato es una importante diana de la quimioterapia. Las drogas anti-DHFR (antifolatos) son muy empleadas en el tratamiento de infecciones parasitarias causadas por *P. falciparum* (uno de los agentes responsables de la **malaria**) y *Toxoplasma gondii* (responsable de la **toxoplasmosis**) en humanos.

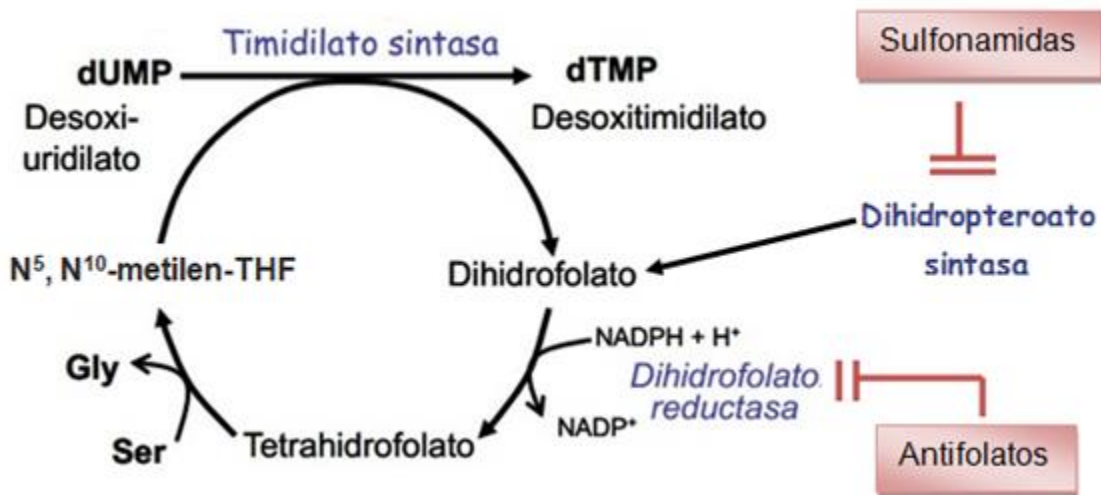


Figura 6. Papel de la dihidrofolato reductasa y de la timidilato sintasa en el metabolismo de nucleótidos. Cabe mencionar que estas dos actividades enzimáticas están contenidas dentro de la misma enzima bifuncional en protistas. También se indican los pasos de la vía sobre los que actúan los distintos inhibidores mencionados en el texto: antifolatos y sulfonamidas.

Modificada de la página web “BQ: García Padilla Johann – Unidad 2: Metabolismo de nucleótidos” (disponible online en <https://sites.google.com/site/bqgarciapadillajohann/unidad2?tmpl=%2Fsystem%2Fapp%2Ftemplates%2Fprint%2F&showPrintDialog=1>).

Los inhibidores de DHFR a menudo se emplean combinados con **sulfonamidas**. Las sulfonamidas son inhibidores de la enzima **dihidropteroato sintasa** (DHPS), y la inhibición de esta enzima bloquea la síntesis *de novo* de dihidrofolatos. Así, antifolatos y sulfonamidas actúan sinérgicamente para disminuir el "pool" de folatos reducidos y, eventualmente, parar la síntesis de dTMP y de DNA.

Debido a sus diversas aplicaciones clínicas y su extensivo empleo, los antifolatos y la resistencia a antifolatos han sido estudiados intensivamente. Los **mecanismos de resistencia** más comúnmente encontrados son la disminución en la entrada de la droga debido a **alteraciones en el transporte**, la sobreexpresión de DHFR y la producción de una DHFR alterada con afinidad disminuida para los antifolatos. Algunos de estos mecanismos pueden coexistir en la misma célula.

Hasta ahora se han descrito varias mutaciones puntuales en la proteína DHFR de *P. falciparum* asociadas a la resistencia a las drogas piremetamina y cicloguanil. Son cambios aminoacídicos en la parte de la enzima que interaccionaría con estos antifolatos, resultando en una **DHFR alterada** con afinidad disminuida para estas drogas pero con actividad enzimática.

Por otra parte, un mecanismo común por el que *Leishmania major* responde al antifolato metotrexato es mediante **amplificación del gen dhfr-ts**. Por tanto, como la proteína está en exceso, el fármaco no es tan eficaz y el parásito se comporta como resistente y no responde adecuadamente al

tratamiento. Esta sobreproducción de DHFR-TS a veces también va acompañada por mutaciones puntuales en la proteína que se han asociado con la resistencia a la droga metotrexato.

También existen ejemplos de resistencia a antifolatos en *Trypanosoma brucei*. Recientemente, se ha visto que este parásito posee una familia de transportadores de folatos, TbFT1-3, que contribuyen a la captación de los antifolatos. La **pérdida de función de estos transportadores** es un mecanismo de resistencia a antifolatos clásicos, como el metotrexato, en tripanosomas. Sorprendentemente, la pérdida de función de TbFT1-3 aumenta la susceptibilidad del parásito a otros antifolatos denominados “no clásicos”, como la pirimetamina. Este estudio indica que los folatos y los antifolatos clásicos presentan una estructura muy similar y por ello comparten un mecanismo de transporte común a través de los transportadores de folatos, mientras que este no es el caso de los antifolatos no clásicos, que son lipofílicos y pueden entrar en las células bien mediante difusión pasiva o bien mediante difusión facilitada. Por este motivo, la pérdida de función de un transportador de folatos disminuye la entrada de estos en la célula pero no evita la entrada de los antifolatos no clásicos, aumentando así la susceptibilidad de *T. brucei* a estas drogas puesto que tienen menor cantidad de folatos para competir por la DHFR-TS. En cambio, esa pérdida de función de TbFT1-3 también reduce la captación de los antifolatos clásicos, lo que disminuye la concentración intracelular de estas drogas y su potencia contra la diana intracelular.

2.5. Resistencia a inhibidores de ornitina descarboxilasa

La **ornitina descarboxilasa** (ODC) es una enzima que cataliza la conversión de **ornitina** en la poliamina **putrescina**. La conversión siguiente de putrescina en espermidina requiere S-adenosilmetionina. La conjugación de espermidina y glutatión en tripanosomátidos conduce a la formación de **tripanotion**. Este proceso de formación de tripanotion aparece esquematizado en la [Figura 7](#).

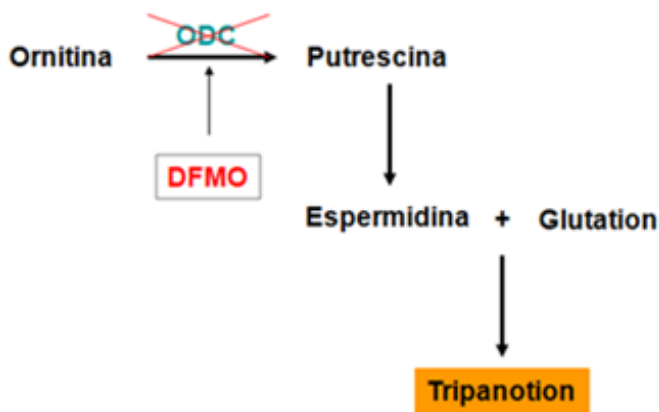


Figura 7. Ruta biosintética del tripanotion en protistas. Se ilustra el modo de acción de la DL- α -difluorometilornitina (DFMO), un efectivo agente antitripanosomal que inhibe a la ornitina descarboxilasa (ODC) e impide la formación de putrescina a partir de ornitina y, con ello, la producción de tripanotion.

Un inhibidor específico de la ornitina descarboxilasa, el DL- α -**difluorometilornitina** (DFMO, o eflornitina), se desarrolló como un agente antitumoral, pero también se ha encontrado que es altamente efectivo como agente antitripanosomal.

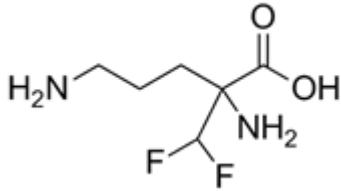


Figura 8. Estructura molecular de la eflornitina (DFMO).

La falta de poliaminas, esenciales para la síntesis de tripanotion, parece ser una razón suficiente para que los tripanosomas mueran en presencia de DFMO.

El DFMO es un **sustrato suicida**, y su selectividad reside en la larga vida media de la ornitina descarboxilasa de los tripanosomas, que carece de la extensión C-terminal (una secuencia PEST), que confiere una corta vida media a las enzimas de mamíferos. Es decir, en mamíferos, la ODC tiene una **secuencia PEST** que la manda a degradación muy rápidamente mientras que, en los tripanosomas, la ODC carece de dicha secuencia y, por consiguiente, tarda más en degradarse. Esto hace que la ODC pueda ser inhibida en las células de los parásitos pero no en las de los mamíferos, donde se está renovando continuamente.

Las líneas de tripanosomas seleccionadas *in vitro* por su **resistencia a DFMO** presentan una **entrada reducida de DFMO** con un **aumento en la concentración intracelular de ornitina** (competidor del DFMO por la enzima). El transportador implicado no ha sido identificado, aunque datos recientes indican que la droga podría entrar utilizando un transportador de aminoácidos, cuya expresión resulta silenciada en las cepas resistentes.

Aunque los inhibidores de la ODC se emplean sobre todo para el tratamiento de la enfermedad del sueño, también se han utilizado alguna vez de forma experimental frente a leishmaniasis. Así, se ha visto que *Leishmania donovani* seleccionada por su resistencia a DFMO presenta una **amplificación del gen de la ornitina descarboxilasa**, lo que se correlaciona con un aumento de la actividad enzimática.

3. Inhibición de la apoptosis por parásitos protozoos intracelulares

Los parásitos que residen en el interior de células del hospedador evitan la acción directa del sistema inmunitario, por lo que podríamos pensar que están más protegidos, en comparación con los parásitos extracelulares. Sin embargo, la célula infectada tiene la capacidad de combatir al patógeno invasor iniciando su propia muerte, un proceso que es conocido como **muerte celular programada** o **apoptosis**. Las células

apoptóticas son reconocidas y fagocitadas por macrófagos, eliminándose así al parásito junto con la célula infectada. Este mecanismo de defensa de la célula hospedadora impuso una presión selectiva sobre los parásitos que, como consecuencia, han adquirido estrategias para modular el programa apoptótico de la célula hospedadora.

Entre los protozoos parásitos intracelulares que se ha visto que inhiben el programa apoptótico de la célula hospedadora están *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp., *Theileria* sp., *Cryptosporidium parvum* y el microsporidio *Nosema algerae*. Aunque estos parásitos difieren en sus mecanismos de entrada en la célula hospedadora y en su localización intracelular, parece que activan las mismas vías para inhibir la apoptosis de sus células hospedadoras.

La muerte celular apoptótica se debe distinguir de la **muerte celular necrótica** (Figura 9). La muerte celular necrótica es una forma patológica de muerte celular que se produce tras daño celular grave, y se caracteriza por una hinchazón rápida de la célula y lisis, mientras que la apoptosis se caracteriza por una autodigestión celular controlada a través de la activación de proteasas endógenas. El núcleo experimenta condensación y las endonucleasas son activadas y comienzan a fragmentar la cromatina nuclear en oligonucleosomas.

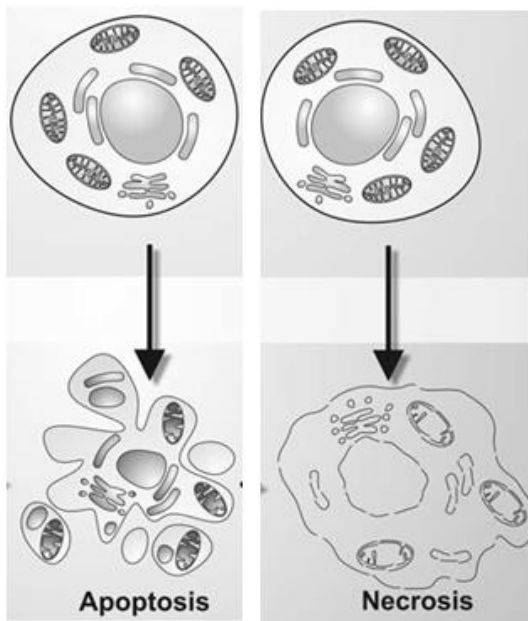


Figura 9. La muerte celular apoptótica y necrótica se pueden distinguir basándonos en criterios morfológicos. La apoptosis típicamente muestra fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos; la necrosis se caracteriza por una hinchazón y rotura de la membrana.

Modificada de Kepp et al (2009).

Contrario a las células necróticas, las células apoptóticas mantienen la integridad de su membrana plasmática. Aunque sí se pierde la asimetría de la membrana, lo que supone un aumento de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana. Finalmente, la célula se fragmenta en vesículas conocidas como **cuerpos apoptóticos**, que van a ser tomados por los fagocitos debido a la presencia de PS sobre su

superficie celular, lo que además va a evitar la activación de una respuesta inflamatoria. La muerte celular necrótica, por el contrario, al producirse la rotura de la membrana celular y liberarse los contenidos celulares, se induce una respuesta inflamatoria (Tabla 2).

Apoptosis	Necrosis
Mecanismo de defensa de la célula hospedadora	Forma patológica de muerte celular tras daño celular grave
Autodigestión celular (proteasas endógenas)	Hinchazón y lisis
Integridad de la membrana	Rotura de la membrana y liberación de contenidos celulares
Respuesta no inflamatoria	Respuesta inflamatoria

Tabla 2. Cuadro comparativo entre la muerte celular por apoptosis y necrosis.

Se considera que las principales funciones de la apoptosis son:

- La **eliminación de las células durante el desarrollo** de los organismos multicelulares.
- El mantenimiento de la **homeostasis** de las células **del sistema inmunitario**.
- La **retirada de células tumorales** y células dañadas.
- La **eliminación de neuronas** en exceso, o mal conectadas, durante el desarrollo del sistema nervioso.
- Últimamente, se está poniendo de manifiesto que la apoptosis actúa como **mecanismo de defensa** frente a la infección de virus, bacterias y parásitos intracelulares.

3.1. Vías que conducen a la apoptosis

La apoptosis es un proceso celular muy regulado. En los últimos años, la maquinaria molecular responsable de la apoptosis ha sido desentrañada en gran manera, revelando el importante papel de una familia de cisteín-proteinasas intracelulares, las **caspasas**. Las caspasas se sintetizan como pro-formas (**zimógenos**) inactivas enzimáticamente y están **organizadas en cascadas**, donde una caspasa iniciadora es rota en subunidades activas que, a su vez, rompe y activa caspasas efectoras. Hasta ahora, se han descrito tres mecanismos que conducen a la activación de las caspasas y, finalmente, a la muerte celular (Figura 10):

- **La vía mediada por granzima B/perforina.** Esta vía forma parte de la muerte inducida por células T citotóxicas sobre las células blanco. La granzima B es una aspartilserín-proteasa localizada en

los gránulos de las células T citotóxicas y células NK. Tras la señalización a través del receptor de células T, las células T citotóxicas liberan granzima y perforina, una proteína que forma poros en la membrana de la célula blanco y permite a la granzima B entrar en la célula blanco. Una vez en el citoplasma de la célula blanco, la granzima B rompe, y activa, directamente a la caspasa 3.

Se ha descrito también que granzima B puede activar las caspasas de forma indirecta: granzima B activa directamente miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bid (“BH3-interacting domain death agonist”), que inducen la liberación del citocromo c de la mitocondria.

- **Vía extrínseca:** vía a través de la familia de receptores del TNF (“tumor necrosis factor”), conocidos como receptores de la muerte. Los miembros más destacados de los receptores de la muerte son **TNF-R1** y **Fas** (CD95). Mientras TNF-R1 media la muerte celular en respuestas inflamatorias, Fas está implicado en la muerte de células blanco por células T citotóxicas y en la activación de la muerte celular de células T.

La unión de Fas al Fas-ligando (FasL) sobre la célula blanco produce el reclutamiento de la caspasa 8 a través de una proteína adaptadora (**FADD**, “Fas-Associated Death Domain protein”) y la formación del **complejo DISC** (“Death-Inducing Signalling Complex”). En el caso de TNF-R1, la unión a su ligando (TNF) conduce al reclutamiento de la caspasa 8 a través de una proteína adaptadora diferente (**TRADD**, “TNF-R1-Associated Death Domain Protein”). La formación de DISC resulta en la activación proteolítica del efector Caspasa 3 y en la muerte celular (primero se activa la caspasa iniciadora caspasa 8 que se encuentra formando parte del complejo DISC, y ésta activa proteolíticamente las caspasas efectoras 3, 6 y 7).

- **Vía intrínseca:** la liberación al citoplasma de citocromo c desde la mitocondria. Las principales señales que activan la vía apoptótica mediada por la mitocondria son el daño del DNA y el estrés. Ambos eventos estimulan a la proteína supresora de tumores **p53** para reclutar **Bax** (un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) hacia la membrana mitocondrial externa. Bax facilita la liberación mitocondrial del citocromo c al citoplasma donde se une a **APAF-1** (“Apoptosis protease activating factor 1”). Esta asociación inicia el ensamblaje del llamado **apoptosoma**, que finalmente contiene APAF-1, citocromo c, Caspasa 9 y Caspasa 3. El apoptosoma activa proteolíticamente a caspasa 3 y promueve la muerte de la célula.

Aunque estas tres vías inductoras de apoptosis pueden actuar de forma independiente, resultados recientes indican la existencia de importantes interconexiones. Por ejemplo, la inducción de la apoptosis

vía FasL-Fas también puede activar la vía intrínseca: la activación de la caspasa 8 induce la salida del citocromo c al citoplasma a través de Bid.

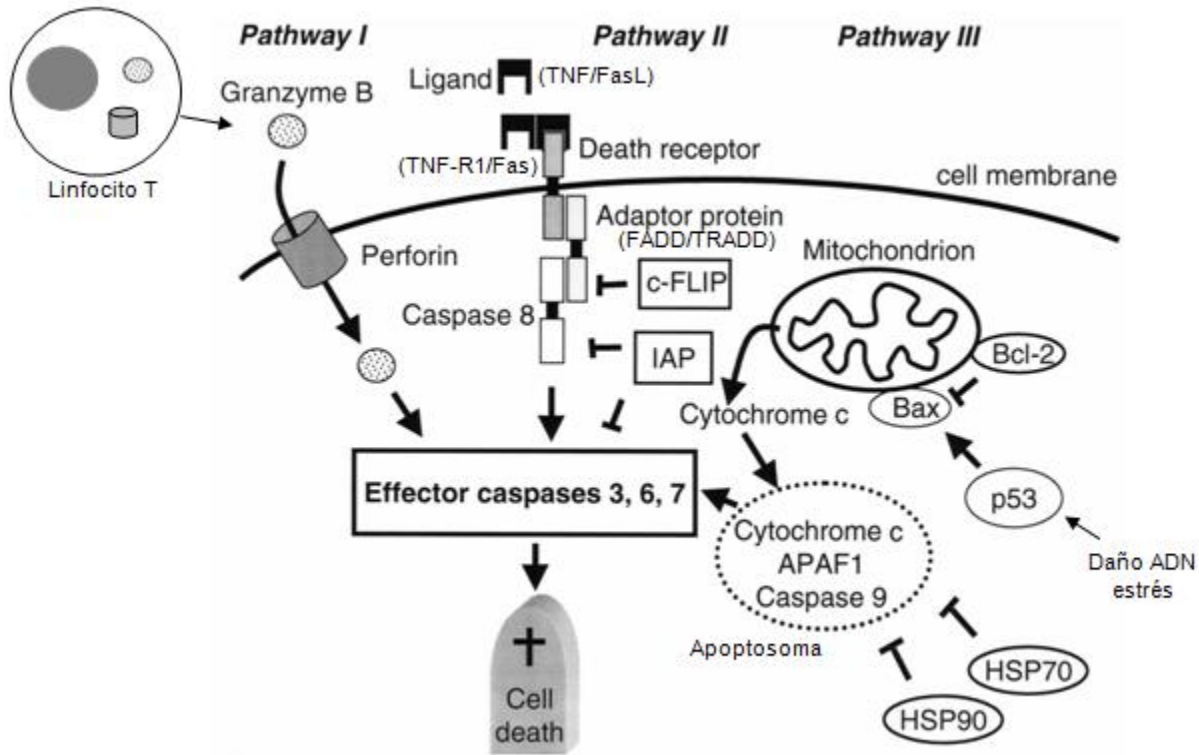


Figura 10. Las tres vías que conducen a la apoptosis.Vía 1: la granzima B es secretada por las célula T citotóxicas y entra en la célula diana con la ayuda de perforina y activa directamente a las caspasas efectoras. **Vía 2:** al unirse a su ligando (TNF/ligando Fas), los receptores de muerte (TNF-R1, Fas) se asocian con proteínas adaptadoras (FADD, TRADD (dominio de muerte asociado a TNF-R1)), las cuales unen los receptores a la caspasa 8. Todo el complejo se denomina complejo DISC (“death-inducing signalling complex”). La formación de DISC conduce al corte y activación de la caspasa 8 y, después, a la activación de las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7), las cuales inducen la muerte celular. **Vía 3:** la vía mitocondrial se activa por señales internas. El daño en el ADN o el estrés conducen a la activación de la proteína supresora de tumores p53. p53 recluta miembros pro-apoptóticos (Bax, Bad, Bid) de la familia de proteínas Bcl a la membrana mitocondrial, seguido de la liberación del citocromo c al citoplasma, donde éste se acompleja con APAF-1 y caspasa 9 para formar un apoptosoma activo. La activación del apoptosoma conduce a la activación de las caspasas efectoras. C-FLIP puede promover la supervivencia interfiriendo con el procesamiento de la caspasa 8. Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) interfieren con la vía de muerte asociándose con las caspasas iniciadoras, además de con las efectoras. Bcl-2 bloquea la liberación del citocromo c por medio de la interacción con Bax. HSP70 y HSP90 interrumpen la formación del apoptosoma uniéndose a APAF-1. **Modificada de Heussler et al. (2001).**

3.2. Inhibición de la apoptosis

Para prevenir la activación inapropiada de la apoptosis, las vías apoptóticas están reguladas por múltiples **mecanismos inhibidores o pro-supervivencia**. A continuación, vamos a ver tres de estos

mecanismos (Figura 12):

- Activación del factor NF-κB

Muchos genes que codifican para proteínas inhibidoras de la apoptosis son regulados transcripcionalmente por el factor de transcripción kappa B (NF-κB, “nuclear factor kappa B”) (Figura 11). NF-κB es un factor de transcripción heterodimérico, formado por las subunidades p50 y 65 (RelA), que se une a sitios κB localizados en los promotores de muchos genes. Se ha visto que muchos patógenos intracelulares como los virus, bacterias y parásitos emplean la vía de activación NF-κB para prolongar la vida de sus células hospedadoras.

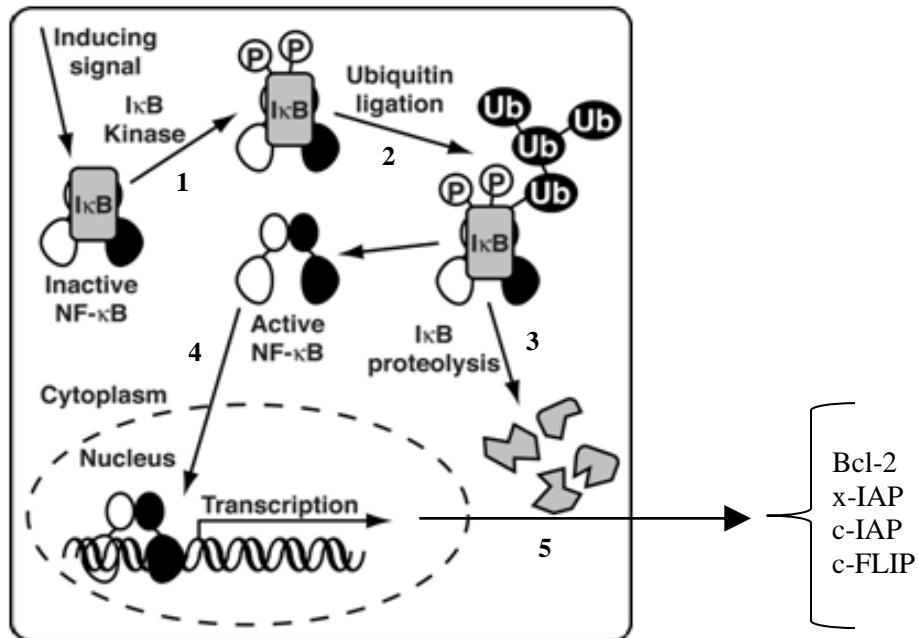


Figura 11. Inhibición de la apoptosis a través de la vía NF-κβ. 1) Tras un estímulo extra o intracelular, el señalosoma IKK se activa, provocando la fosforilación de IκB (unido a NF-κβ) y 2) permitiendo su ubiquitinación y 3) posterior degradación por proteólisis. 4) De esta manera, NF-κβ queda libre en el citoplasma, se transloca al núcleo e 5) induce la expresión de genes antiapoptóticos (Bcl-2, x-IAP, c-IAP, c-FLIP).

NF-κB es inducido por una gran variedad de estímulos extracelulares (proteínas inflamatorias) e intracelulares (patógenos). En las células no estimuladas, NF-κB es secuestrado en el citoplasma por la unión a su **inhibidor IκB**, quien enmascara la señal de localización nuclear de NF-κB. Tras un estímulo extracelular como la ligación del TNFR-1 (“TNF receptor-1”) o un estímulo intracelular como una infección con un patógeno, un complejo kinasa multisubunidad IκB, también conocido como **señalosoma IKK**, es activado. Subsiguientemente, IκB es rápidamente fosforilado, ubiquitinado y degradado

proteolíticamente, lo que permite que el NF- κ B liberado se transloque al núcleo para regular la transcripción. NF- κ B induce la expresión de genes cuyos productos (Bcl-2, x-IAP, c-IAP, c-FLIP) interfieren con las vías apoptóticas, intentando neutralizarlas, compensarlas o equilibrarlas. Veamos a continuación los mecanismos básicos a través de los cuales estas proteínas interfieren con las vías apoptóticas:

- **c-IAP y x-IAP:** pertenecen a la familia de las IAPs (“Inhibitor of Apoptosis Proteins”), proteínas de defensa frente a la apoptosis. Actúan a nivel tanto de la vía extrínseca como intrínseca:
 - **Vía Extrínseca:** c-IAP y x-IAP se unen al centro activo de caspasa 3 una vez que ésta ha sido procesada proteolíticamente y activada por caspasa 8, bloqueando así la vía apoptótica mediada por receptores de muerte. También se unen al centro activo de caspasa 7 y la bloquean.
 - **Vía Intrínseca:** c-IAP y x-IAP se unen a procaspasa 9 y previenen así su procesamiento proteolítico y activación por el citocromo c, lo que bloquea la vía apoptótica mediada por la mitocondria.

- **c-FLIP:** bloquea la vía de los receptores de muerte. Se trata de una proteína con una estructura similar a la caspasa 8 pero sin capacidad proteolítica. Su función es inhibir la activación de caspasa 8 tanto por unión y secuestro de caspasas 8 como por unión a FADD bloqueando el sitio de unión a caspasa 8.

- **Bcl-2:** proteína que inhibe a Bax, de forma que no se crean poros en la membrana mitocondrial por los que salga el citocromo c, bloqueándose así la vía.

- Proteínas de choque térmico

No relacionado con la inhibición mediada por NF- κ B de la apoptosis, una familia de inhibidores potentes de la apoptosis ha sido recientemente descrita, se trata de la familia de las **proteínas de choque térmico (HSP)**. La HSP70 afecta a la vía apoptótica a los niveles tanto de la liberación de citocromo c como de la activación de las caspasas. Los efectos anti-apoptóticos de la HSP70 y HSP90 son mediados a través de su asociación directa con APAF-1.

- Activación de PI3K

La activación de la PI3K (“Phosphoinositide 3’-kinase”) también promueve la inhibición de la

apoptosis. La PI3K activa fosforila al fosfatidil-inositolbifosfato (PIP₂) para forma PIP₃, que actúa reclutando a la proteína kinasa B (PKB, también conocida como Akt) y a la kinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK1, “phosphoinositide-dependent kinase 1”) a la membrana celular. PDK1 activa a PKB/Akt, y una vez activada, PKB/Akt fosforila (e inhibe) a Bad, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2; y se inhiben factores transcripcionales de la familia forkhead, reprimiendo la transcripción de genes codificantes para proteína pro-apoptóticas como son Bim y FasL.

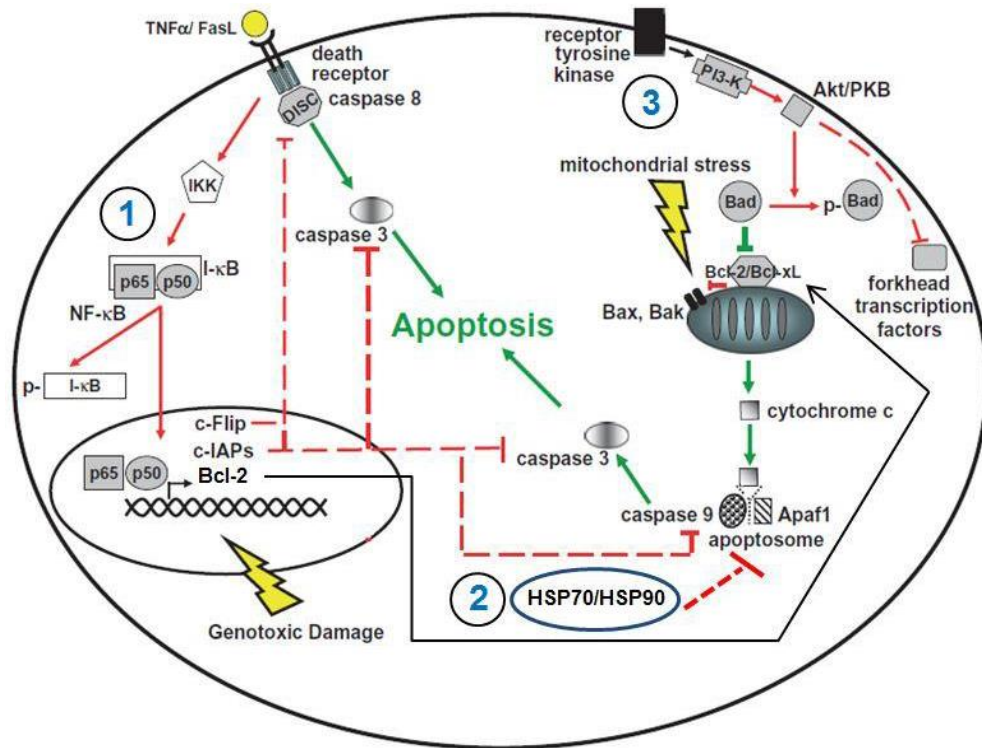


Figura 12. Esquema general que resume los tres mecanismos inhibidores de las vías apoptóticas. 1) Activación del factor de transcripción NF-κB y efecto positivo sobre la expresión de genes codificantes para proteínas antiapoptóticas (c-FLIP, c-IAPs y Bcl-2). 2) Bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis a nivel de APAF-1 por efecto de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90. 3) Inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis mediante la activación de la vía de PI3K.

Modificada de Carmen et al (2007).

3.3. Parásitos que interfieren con las vías apoptóticas

Una vez en el interior de las células muchos parásitos inducen las vías antiapoptóticas, tanto a través del factor NF-κB como de las proteínas de choque térmico, la activación de PI3K o la inducción de la expresión específica de determinadas proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. A continuación se exponen algunos ejemplos:

- **Activación del factor NF-κB.** La presencia de *Toxoplasma gondii* en el interior de las células inhibe la apoptosis. En concreto, se ha visto que se inhibe la apoptosis mediada por células T citotóxicas. Esto lo hacen a través de la activación del factor NF-κB, que conduce a la producción aumentada de los inhibidores de la apoptosis IAP-1 e IAP-2.
- **Activación de la vía PI3K.** Se ha encontrado también que *Leishmania donovani* inhibe la apoptosis de su célula hospedadora. El tratamiento de los macrófagos con lipofosfoglicano (LPG) del parásito también induce este efecto. Se ha descrito la activación de la vía PI3K por promastigotes de *Leishmania*.
También se ha descrito que esporozitos de *Plasmodium* inhiben la apoptosis por activación de la vía PI3K. Esto lo consiguen ya que estimulan la liberación de HGF (“Hepatocyte Growth Factor”), factor que se une a los receptores tirosina kinasa que activan la vía PI3K.
- **Inducción de la expresión de proteínas de choque térmico.** En infecciones con *Trypanosoma cruzi* y *L. major*, se inhibe la apoptosis a través de inducir la expresión de HSP65 de la célula hospedadora.
- **Inducción de la expresión de Bcl-2.** La cruzipaína, un factor soluble producido por *T. cruzi* induce un aumento de Bcl-2, una proteína antiapoptótica.

4. La muerte celular programada en organismos parásitos unicelulares

Como se ha mencionado la PCD (“Programmed Cell Death”) es esencial para el desarrollo, la homeostasis y la defensa de organismos multicelulares. Sin embargo, su función en organismos unicelulares es cuestionable, pues va a conducir a la muerte del organismo completo, y resulta un contrasentido pensar que el “suicidio” puede tener una ventaja para un organismo.

El proceso de PCD fue primeramente descrito en 1972 por *Kerr et al.* como el mecanismo principal de eliminación de células en organismos multicelulares. Años después fueron apareciendo evidencias sobre la existencia de PCD en organismos unicelulares como *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanoma*, *Trichomonas*, *Giardia*, *Tetrahymena* y otros. La razón de la PCD en estos organismos la podemos encontrar en el hecho de que los organismos unicelulares se organizan en **poblaciones** en las que existe una **comunicación intercelular**. Así, en cierto modo, la separación entre organismos multicelulares y unicelulares no es tan grande como a primera vista pudiera parecer. Los parásitos causan infecciones iniciadas por uno o pocos individuos con lo que la mayoría de la población comparte información genética

idéntica o muy similar. Con lo cual, aunque un organismo muera, su información genética sigue manteniéndose por los demás parásitos. Es decir, la población entera de parásitos del huésped, y no organismos individuales, son los sometidos a presión evolutiva y es por ello que el “suicidio” de un parásito puede ser permitido.

Para los organismos parásitos, la PCD puede verse como un mecanismo de **autorregulación de la virulencia**. La muerte rápida del hospedador puede resultar desastrosa para el propio parásito pues puede limitar su capacidad de propagación. Así, la muerte activada por densidad del parásito puede resultar beneficiosa para la supervivencia de la población de parásitos. Sin embargo, estos argumentos no sirven para explicar por qué los parásitos mueren por PCD y no por necrosis que no requiere energía y no está determinada genéticamente.

La razón parece estar en que la fagocitosis de parásitos **necróticos** por macrófagos, contrario a lo que ocurre tras la fagocitosis de parásitos apoptóticos, provoca una **respuesta inflamatoria** en los fagocitos. Éstos producen **citoquinas pro-inflamatorias** como el TNF- α y el IFN- γ . En cambio, los macrófagos que han fagocitado células que mueren por **apoptosis** secretan **citoquinas anti-inflamatorias**, tales como la IL-10 y TGF- β , que van a atenuar las respuestas inmunitarias frente al parásito (Figura 13).

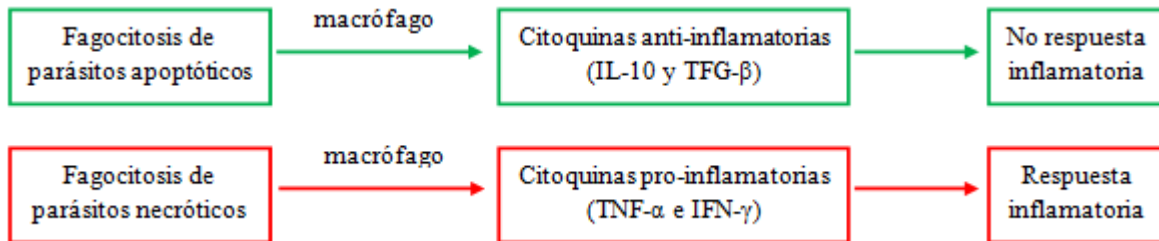


Figura 13. Esquema que resume los diferentes efectos sobre el sistema inmunitario promovidos tras la fagocitosis de parásitos apoptóticos o necróticos.

Así, se ha visto que promastigotes moribundos de *Leishmania*, que exponen fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana (hecho característico de un proceso apoptótico), inducen la liberación de TGF- β por parte de los fagocitos. Esto parece ser esencial para que el resto de la población establezca la infección, dado que la inoculación de promastigotes, seleccionados por tener un bajo contenido de PS en la membrana externa, en ratones produce una respuesta inflamatoria que conduce a la muerte de toda la población de parásitos. Datos recientes indican que PS está ausente (o presente en cantidades indetectables) en los promastigotes de *Leishmania*. Todo indicaría que la unión de anexina V, que se emplea para detectar PS en membrana, se uniría a otro fosfolípido de *Leishmania* (Figura 14).

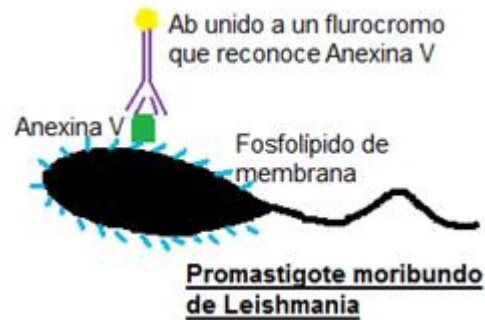


Figura 14. Esta figura representa un promastigote en estado apoptótico, que presenta altos niveles de fosfatidilserina (PS) en su membrana. La detección in vitro se realiza por la incubación de los parásitos con la Anexina V, que se une a este fosfolípido de la membrana y, a su vez, esta es reconocida por un Ab que lleva unido un fluorocromo que va a emitir fluorescencia solamente en las células que presenten el fosfolípido en la membrana, es decir, las apoptóticas.

Además, como resultado de la PCD en *Leishmania*, las **catepsinas** de las células fagocíticas van a producir fragmentos más cortos de lo habitual con lo que disminuye la presentación de antígenos del patógeno lo que conlleva a un aumento de la supervivencia y de la proliferación de los parásitos remanentes.

El que la PCD se encuentre inducida por la densidad de la población de parásitos que hay en el huésped sugiere que tiene que haber una forma de **comunicación** entre ellos. En el caso de *T. brucei* se cree que es una molécula derivada de la **prostaglandina D2** aunque todavía no se ha encontrado el receptor implicado. Esta respuesta parece estar mediada por especies reactivas de oxígeno (**ROS**) ya que al tratar los cultivos con glutatión y N-acetil-cisteína (tamponantes de ROS) se reduce la muerte de los parásitos. Es importante llegar a conocer exactamente los detalles moleculares de la PCD porque podrían abrir una nueva ventana terapéutica para eliminar parásitos sin provocar una fuerte respuesta inmunitaria en el huésped.

Una cuestión que queda por resolver es si la muerte de los parásitos es por un proceso de apoptosis o de **autofagia** (Figura 15). La autofagia fue descrita inicialmente en células eucariotas como un mecanismo de salvamento que se induce por falta de nutrientes o estrés oxidativo. La autodigestión controlada de material celular, incluidos orgánulos, puede proveer de energía a las células para su supervivencia durante varios días. Sin embargo, si las condiciones no mejoran, la autodigestión continúa y, eventualmente, puede conducir a una muerte celular autofágica.

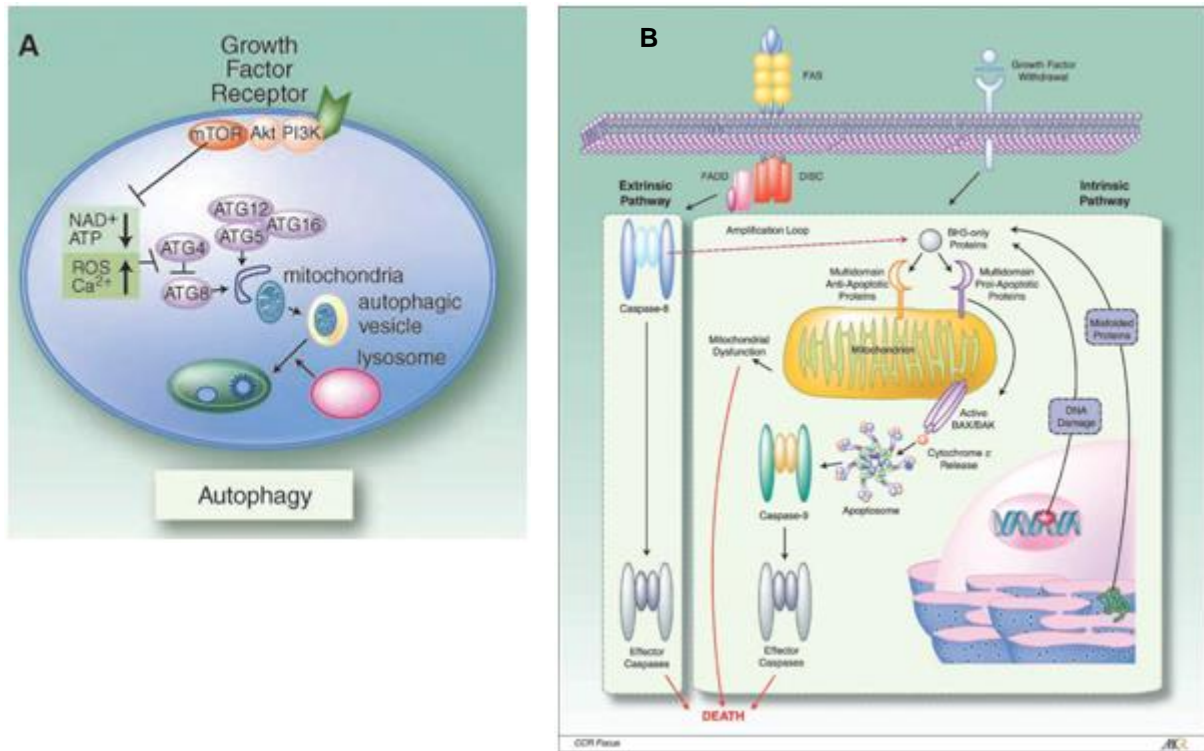


Figura 15. Componentes principales de las vías de autofagia (A) y apoptosis (B).
 A) Modificada de Amaravadi & Thompson (2007). B) Modificada de Benz et al (2007).

La cuestión se plantea porque los factores típicos de los procesos apoptóticos (receptores, caspasas, miembros de la familia Bcl-2, p53, etc.) no se encuentran en los protozoos parásitos analizados. Por otro lado, se ha visto que factores que inducen la muerte celular por autofagia, tales como la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS, “Reactive Oxygen Species”) o la falta de nutrientes, son buenos inductores de muerte celular en protozoos parásitos. Además, reguladores específicos de la autofagia, como son **TOR-kinasa** (TOR, “Target Of Rapamycin”) y **Atg8** (“Autophagy-specific gene 8”) se encuentran codificados en los genomas de estos parásitos (Figura 16).

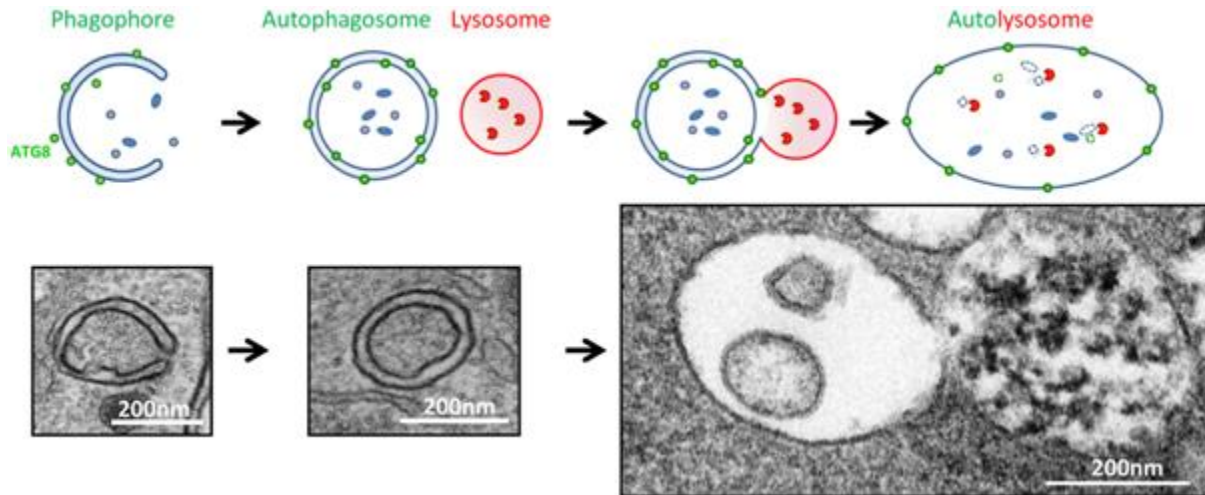


Figura 16. Formación y degradación de los autofagosomas. Arriba: representación de los pasos de la autofagia (la proteína ATG8 se representa en verde, el ‘carga’ citosólico en azul y las hidrolasas lisosomales en rojo); abajo: observaciones morfológicas por microscopía electrónica de estructuras subcelulares en taquizoitos extracelulares de *Toxoplasma*.

Imagen tomada de Besteiro (2017).

5. Los exosomas: vehículos de comunicación entre parásito y hospedador

Las vesículas extracelulares (VEs) han emergido como un mecanismo ubicuo para la transferencia de información entre células y organismos.

En los mamíferos, las EVs son un mecanismo para la comunicación célula-a-célula que ocurre bien a través de la estimulación directa de receptores sobre la superficie celular y/o mediante la transferencia de material genético, proteínas y lípidos.

Los **exosomas** son vesículas de un tamaño de 40-100 nm derivados de la vía endocítica, y que son liberados por la mayoría de los tipos celulares. Su biogénesis y dinámica se ilustra en la [figura 17 y 18](#). A nivel de los endosomas tardíos, los exosomas se generan mediante un proceso de gemación hacia el interior, que arrastra o captura contenidos citoplasmáticos que acaban en el interior de vesículas intraluminales (ILV, “intraluminal vesicles”). Cuando estos endosomas (denominados cuerpos multivesiculares o MVB (“multivesicular body”)) se fusionan con la membrana plasmática, las vesículas intraluminales son liberadas al espacio extracelular, y éstas constituyen los exosomas.

Las **microvesículas** son unas estructuras que se producen como gemación desde la membrana plasmática, que incorporan lípidos y proteínas de superficie y con un tamaño que puede alcanzar 1 μm . Aunque su biogénesis es diferente, pueden confundirse con exosomas.

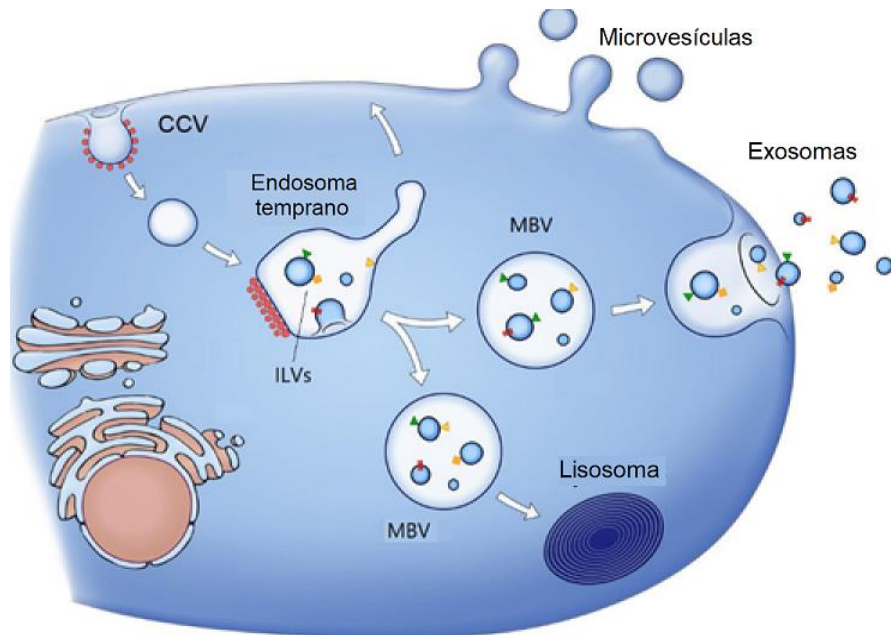


Figura 17. Biogénesis de exosomas y microvesículas. Las microvesículas (MVs) surgen directamente por gemación de la membrana plasmática. Los exosomas se forman de manera diferente. En su desarrollo hacia endosoma tardío, el endosoma temprano sufre gemaciones de su membrana hacia el interior que atrapan moléculas del citoplasma de la célula en vesículas intraluminales (ILV, “intraluminal vesicles”). Este endosoma tardío se conoce como cuerpo multivesicular (MVB). Algunos MVB se fusionarán con el lisosoma, donde el contenido es degradado; pero otros MVB se fusionarán con la membrana plasmática liberando las ILV, también llamadas exosomas, al exterior de la célula. Los puntos rojos simbolizan la clatrina asociada con las vesículas en la membrana plasmática (clathrin-coated vesicles [CCV]) o en la bicapa que recubre al endosoma. Los triángulos y rectángulos corresponden a proteínas que viajan en los exosomas.

Modificada de Raposo & Stoorvogel (2013).

Los exosomas fueron primeramente descritos en 1983 en reticulocitos como un mecanismo para la liberación de receptores de transferrina durante la maduración de estas células. En 1996 se encontró que los linfocitos B secretaban este tipo de vesículas, conteniendo moléculas MHC y antígenos, por lo que empezaron a considerarse como estructuras implicadas en la comunicación entre células del sistema inmunitario. Desde entonces, su presencia se ha demostrado en muchos casos y se han implicado también en procesos patológicos, tales como el cáncer, ya que se ha visto que algunas células tumorales secretan exosomas que transportan oncogenes. Actualmente, los exosomas y otras VEs han pasado a formar parte y ser estudiados en análisis clínicos como biomarcadores de diagnóstico, así como de su posible utilidad para el desarrollo de métodos terapéuticos tales como la liberación de fármacos o el desarrollo de vacunas.

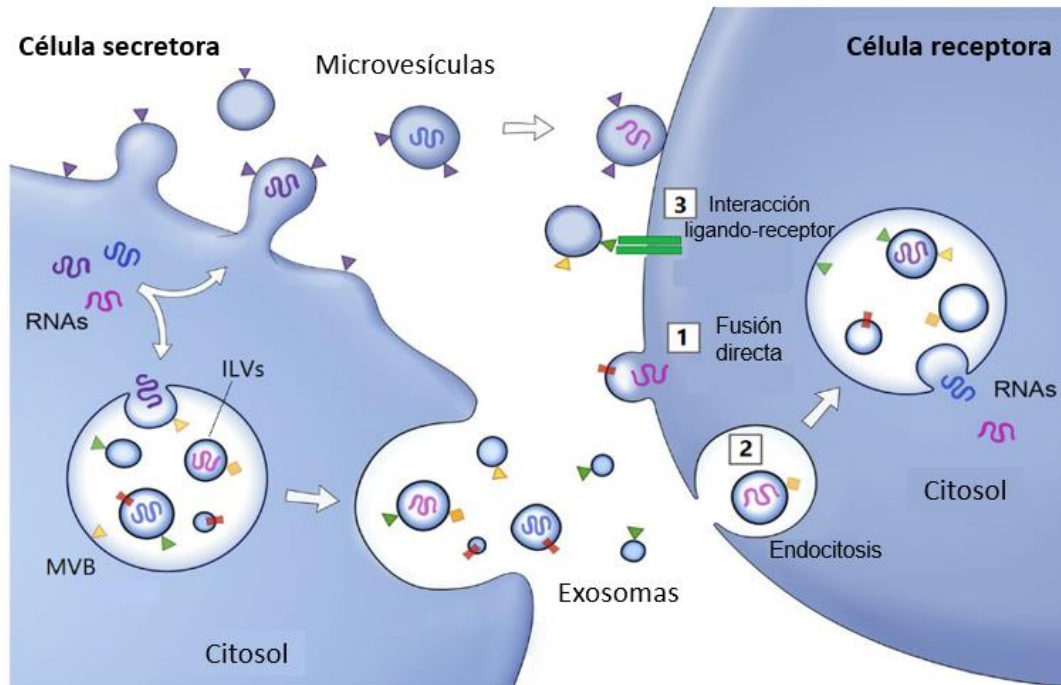


Figura 18. Esquema de la transferencia de proteínas y ácidos nucleicos por EVs (extracelular vesicles). Proteínas y moléculas de RNA son incorporadas selectivamente a las ILVs por gemación hacia el interior de la membrana del endosoma temprano, o a las microvesículas por gemación de la membrana plasmática. Los cuerpos multivesiculares (MVBs) maduros se fusionan con la membrana plasmática de la célula secretora, liberando los exosomas al espacio extracelular. Hay varias formas por las que las vesículas extracelulares o EVs pueden interaccionar con las células receptoras o diana. Las vesículas pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática de la célula receptora (1) o pueden ser internalizadas por endocitosis (2) y, posteriormente, fusionarse con la membrana de un compartimento endocítico. También pueden inducir vías de señalización por interacción ligando-receptor en la superficie celular (3). **Modificada de Raposo y Stoorvogel (2013).**

Pero también se ha encontrado que muchos parásitos, entre ellos los protistas, liberan exosomas. Así, por ejemplo, se ha visto que el parásito *Leishmania* libera exosomas que, al fusionarse con las células del hospedador y liberar sus contenidos, van a inducir la secreción de IL-8 y otras citoquinas en macrófagos (Figura 19). Esta citoquina actúa reclutando a los neutrófilos que, al fagocitar al parásito, servirían para que el parásito accediera a los macrófagos que fagocitarían a los neutrófilos infectados. Por otro lado, se ha encontrado que la inoculación en ratones con exosomas obtenidos en cultivos de *Leishmania* van a promover que una infección subsiguiente con el parásito resulte más patogénica, al aumentar la producción de IL-10 y dirigir la respuesta hacia el tipo Th2.

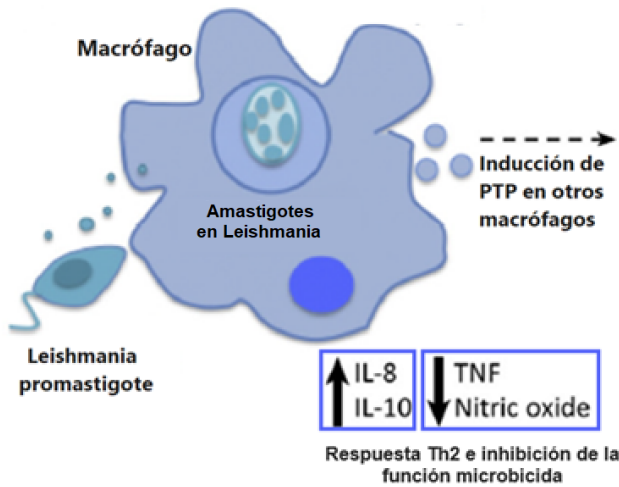


Figura 19. *Leishmania* libera exosomas que modulan la respuesta inmunitaria de los monocitos. Como consecuencia de la liberación de exosomas, se produce un aumento de la producción de IL-8 y IL-10. Estas citoquinas actúan reclutando macrófagos y dirigiendo la respuesta hacia Th2, respectivamente. Además, también se produce una disminución de los niveles de TNF y óxido nítrico, lo que impide la función microbicida. Los monocitos infectados también liberan exosomas que tienen propiedades inmunomoduladoras en las células receptoras (indicado por la línea discontinua), como la inducción de fosfatasa de tirosinas (PTP) y cambios en la expresión génica en macrófagos.

Modificada de Coakley et al. (2015).

En *Trypanosoma cruzi* también se ha descrito la liberación de VEs y exosomas, que contienen moléculas asociadas con virulencia e inmunomodulación. Así, por ejemplo, se ha visto que la inoculación con estas microvesículas, y tras la subsiguiente infección con el parásito, los ratones presentan infecciones mayores del tejido cardíaco y una polarización de la respuesta inmunitaria hacia el tipo Th2, con la presencia de altos niveles de IL-4 e IL-10 y una disminución en los niveles de iNOS (“inducible Nitric Oxide Synthase”) (figura 20). Estos datos sugieren un papel de estas microvesículas en facilitar la multiplicación y diseminación del parásito.

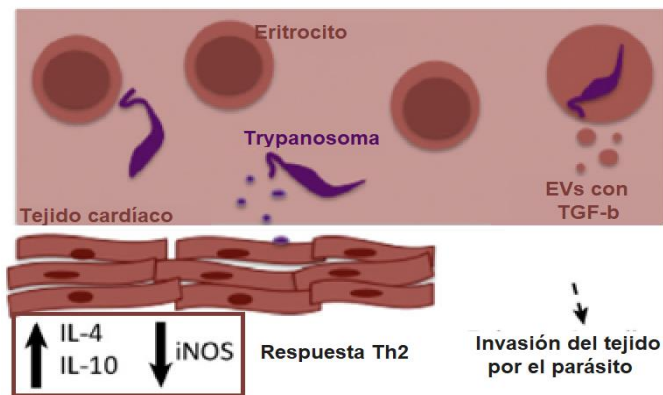


Figura 20. *Trypanosoma cruzi* libera microvesículas y exosomas que producen un aumento en la producción de IL-4 e IL-10 y una disminución de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Esto dirige la respuesta inmunitaria hacia el tipo Th2, lo que favorece la invasión del tejido cardíaco por el parásito. Los eritrocitos y linfocitos infectados liberan microvesículas que contienen TGF- β superficial.

Modificada de Coakley et al. (2015).

Además de directamente secretar exosomas y microvesículas, algunos parásitos intracelulares también inducen la liberación de exosomas por parte de las células que infectan. Posiblemente el caso más documentado es el que tiene lugar en eritrocitos infectados con el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* (figura 21), que producen microvesículas que una vez fagocitadas por monocitos van a inducir la secreción de citoquinas inflamatorias tales como IL-1b, IL-6 e IL-12. Se postula que estas citoquinas

podrían promover una activación de las células endoteliales y la interacción con los eritrocitos, lo que aumentaría el secuestro de eritrocitos en la microvasculatura.

Además de la manipulación de la respuesta inmunitaria del hospedador, las VEs también parecen servir como mecanismo de comunicación entre parásitos. Por ejemplo, se ha documentado que el tráfico de microvesículas entre eritrocitos infectados por *P. falciparum* va a inducir el paso de diferenciación hacia la formación de los estadios sexuales (gametocitos), fundamentales para la transmisión al insecto vector. Asimismo, otros estudios han documentado que VEs, secretadas por eritrocitos infectados por parásitos transgénicos de *P. falciparum* son capaces de transferir, bajo condiciones de presión de fármacos, DNA codificante para un marcador de resistencia a fármaco a células infectadas por parásitos sensibles a la droga.

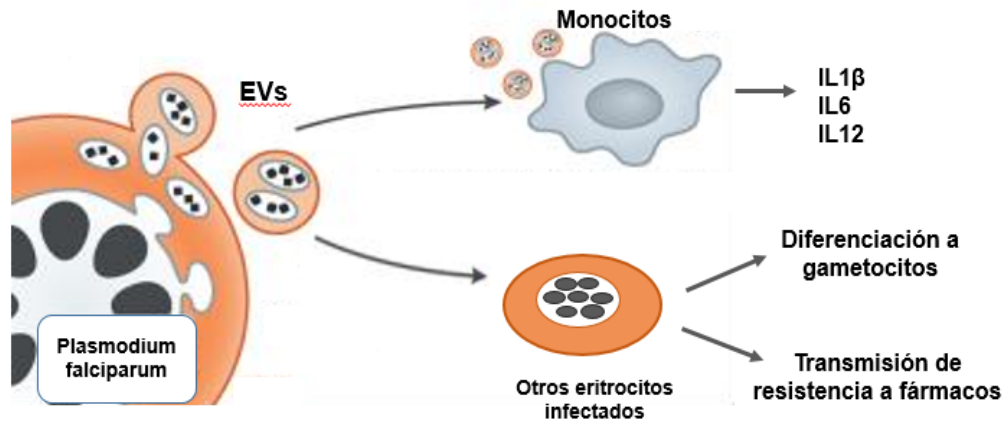


Figura 21. Los eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum* liberan vesículas extracelulares (EVs) que inducen en los monocitos/macrófagos la producción de citoquinas proinflamatorias IL1β, IL6 e IL12. Además, estas EVs tienen una función de comunicación entre parásitos, actúan activando la diferenciación hacia las formas sexuales (gametocitos) y también pueden transmitir moléculas de DNA que codifican moléculas que confieren resistencia frente a fármacos.

Modificada de Mantel & Marti (2014).

Al igual que los parásitos han adquirido la capacidad de secretar exosomas para interferir con el **hospedador**, no es extraño que el hospedador utilice también estas estructuras como un mecanismo de defensa frente a los agentes infecciosos. Así, por ejemplo, se ha visto que exosomas producidos por macrófagos infectados por *Mycobacterium bovis* son capaces de promover la activación de células dendríticas y generar una respuesta de linfocitos T específicos frente a la bacteria. Resultados similares se han encontrado con una vacuna basada en exosomas procedentes de células dendríticas que habían sido incubadas con *L. major*, que genera una inmunidad protectora Th1.

Según aumentemos nuestro conocimiento sobre las propiedades bioquímicas de los exosomas y sobre cómo sus cargas operan, seguramente se puedan emplear para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

6. Apéndice

Patógeno	Enfermedad a combatir	Tipo de vacuna	Contenido de la vacuna	Producción de la vacuna	Productores
<i>Toxoplasma gondii</i>	Abortos por toxoplasmosis en ovejas	Viva atenuada	Taquizoitos de la cepa S48	Cultivo <i>in vitro</i> en células de mamífero	MSD Animal Health, Toxovax
<i>Tritrichomonas foetus</i>	Trichomoniasis bovina	Muerta o inactivada	Trofozoitos muertos	Cultivo axénico* en caldo	Boehringer, Trichguard, Ingelheim
<i>Leishmaniainfantum</i>	Leishmaniasis visceral canina (en Europa)	Elaborada a base de extractos de antígenos	Proteínas excretadas o secretadas	Antígeno extraído <i>in vivo</i> de cultivos axénicos* de <i>L. infantum</i>	Virbac, CaniLeish

*Un cultivo axénico consiste en una sola especie microbiana, proveniente de una sola célula.

Apéndice 1. Tabla que incluye ejemplos de vacunas que se emplean en la actualidad contra protozoos animales. Modificada de Mcallister (2014).

7. Referencias

- Amaravadi, R.K. and Thompson, C.B.** (2007). The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research* 13 (24): 7271-7279.
- Benz, E.J., Jr., Nathan, D.G., Amaravadi, R.K. and Danial, N.N.** (2007) Targeting the Cell Death-Survival Equation. *Clinical Cancer Research* 13 (24): 7250-7253.
- Besteiro, B.** (2017) Autophagy in apicomplexan parasites. *Current Opinion in Microbiology* 40:14–20
- Borst, P. and Ouellette, M.** (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 427-460.
- Bruchhaus, I., Roeder, T., Rennenberg, A. and Heussler, V.T.** (2007) Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol.* 23:376-383.
- Carmen, J.C. and Sinai, A.P.** (2007) Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol. Microbiol.* 64: 904-916.
- Coakley, G., Maizels, R.M. and Buck, A.H.** (2015). Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends Parasitol.* 31: 477-489.
- Derant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., Nakhasi, H.L.** (2003) Programmed Cell Death in Trypanosomatids and Other Unicellular Organisms. *Int. J. Parasitol.* 33:257-267.
- Dewar, S., Sienkiewicz, N., Ong, H.B., Wall, R.J., Horn, D. and Fairlamb, A.H.** (2016) The role of folate transport in antifolate drug action in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 291(47): 24768–24778.
- Deveraux, Q.L. and Reed, J.C.** (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13(3):239-252.
- Gupta, H., Chaudhari, S., Rai, A., Bhat, S., Sahu, P.K., Hande, M.H., D'Souza, S.C., Shashikiran, U. and Satyamoorthy, K.** (2017) Genetic and epigenetic changes in host ABCB1 influences malaria susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *PLoS One.* 12(4): e0175702.
- Heussler, V.T., Küenzi, P. and Rottenberg, S.** (2001) Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.* 31: 1166-1176.
- Kepp, O., Tesniere, A., Schlemmer, F., Michaud, M., Senovilla, L., Zitvogel, L. and Kroemer, G.** (2009) Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Cell death and disease* 14:364-375.
- Lüder, C.G., Gross, U. and Lopes, M.F.** (2001) Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol.* 17(10):480-486.
- Mantel PY. and Marti M.** (2014) The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. *Cellular microbiology* 16: 344–354.
- Mcallister, M.M.** (2014) Successful vaccines for naturally occurring protozoal diseases of animals should guide human vaccine research. A review of protozoal vaccines and their designs. *Parasitology.* 141(5): 624–640.
- O'Brien, F.E., Clarke, G., Fitzgerald, P., Dinan, T.G., Griffin, B.T. and Cryan, J.F.** (2012) Inhibition of P-glycoprotein enhances transport of imipramine across the blood-brain barrier: microdialysis studies in conscious freely moving rats. *Br. J. Pharmacol.* 166(4):1333-1343.

TEMA 24: Introducción a la parasitología. Protistas

- Patterson, S., Alpey, M.S., Jones, D.C., Shanks, E.J., Street, I.P., Frearson, J.A., Wyatt, P.G., Gilbert, I.H. and Fairlamb, A.H.** (2011) Dihydroquinazolines as a novel class of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase inhibitors: discovery, synthesis, and characterization of their binding mode by protein crystallography. *J. Med. Chem.* 54(19):6514-6530.
- Raposo G. and Stoorvogel W.** (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200: 373–383.
- Schmidt, G.D. and Roberts, L.S.** (1989) *Foundations of Parasitology*. Times Mirror/Mosby College Publishing, St. Louis, Missouri.
- Trapani, J.A. and Smyth, M.J.** (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2(10):735-747
- Walker, G., Dorrell, R.G., Schlacht, A. and Dacks, J.B.** (2011) Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists. *Parasitology* 138: 1638-1663.