



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
U. A. M. © 2014



2014-15

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGIA. PROTISTAS.



Microbiología clínica 2014-2015

AUTORES:

Celia Alda Catalinas

Esmeralda Alonso Barroso

Raquel Barquero Jiménez

Araceli Carrasco Mora

Ricardo Moreno Traspas

ÍNDICE

1. Introducción a la Parasitología	2
2. Quimioterapia y resistencia a drogas en protozoos y parásitos	4
2.1. Aspectos de la resistencia a fármacos	5
2.2. P-glicoproteínas	6
2.3. Resistencia a arsenicales y a antimoniales	8
2.4. Resistencia a antifolatos	10
2.5. Resistencia a inhibidores de ornitina descarboxilasa	11
3. Inhibición de la apoptosis por parásitos protozoos intracelulares	12
3.1. Vías que conducen a la apoptosis	14
3.2. Inhibición de la apoptosis	15
3.3. Parásitos que interfieren con las vías apoptóticas	18
4. La muerte celular programada en organismos parásitos unicelulares	18
5. Referencias	22

1. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA

El término “**parásito**” hace referencia a los organismos eucariotas (unicelulares o pluricelulares) que producen enfermedades, aunque en su sentido literal incluye también bacterias y virus. 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. Hasta ahora han sido descritas unas 66.000 especies de protozoos, de las cuales unas 10.000 son parásitos. Los protozoos son microorganismos eucariotas unicelulares 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” (que significa precursor de los animales en la línea evolutiva) está en cuestión y se recomienda utilizar el término “**protista**”, que sirve para referirse a cualquier microbio eucariota unicelular (el cual no tiene por qué ser parásito). Estos, si dejamos a un lado a las bacterias, suponen la mayor diversidad de organismos actualmente existentes.

En el estudio filogenético que incluimos a continuación (**Fig. 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**.
- *Entamoeba histolytica* está dentro del supergrupo de los **Amebazoa** y en el grupo de los **Arcamoeba**.

Además, en esta figura podemos ver que dichos protistas están alejados evolutivamente unos de otros, es decir, no son un grupo homogéneo ni desde el punto de vista evolutivo ni por sus características.

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

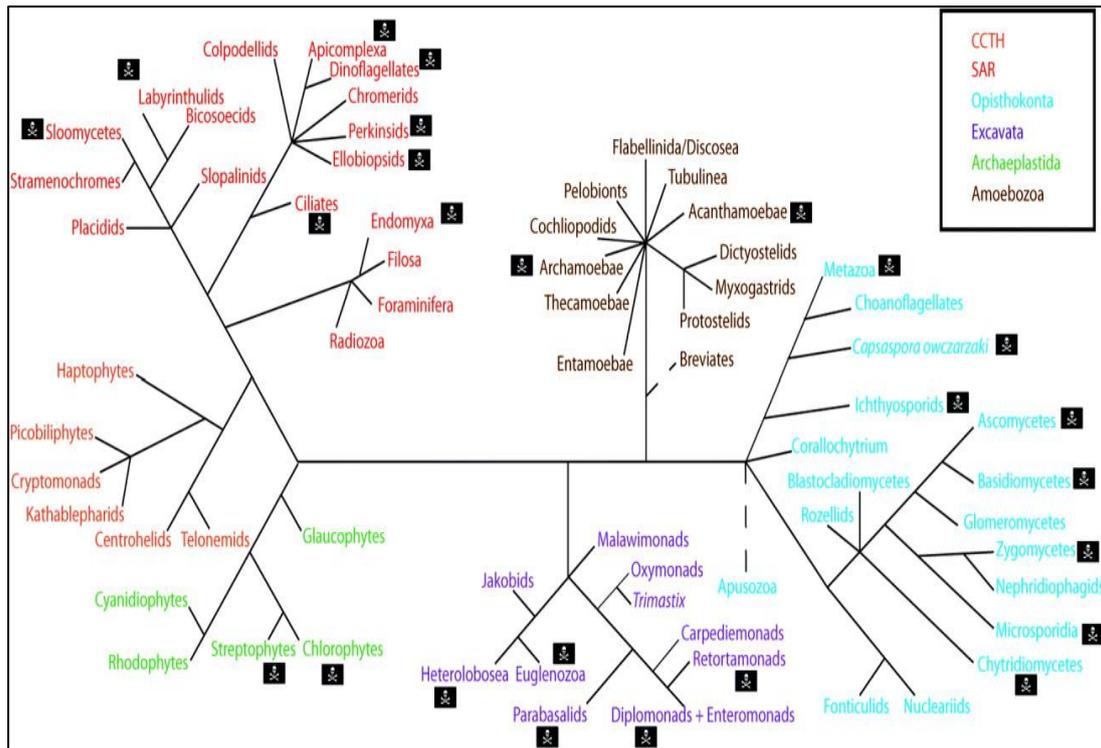


Figura 1: Árbol sin raíz de eucariotas. Este esquema de la diversidad eucariota muestra la clasificación para los 6 supergrupos y sus relaciones. Este árbol está basado en los resultados de numerosos análisis genómicos a gran escala y filogenéticos y en datos estructurales comparativos. Los “flags Jolly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

Los protozoos parásitos son responsables de algunas de las más devastadoras **enfermedades** de humanos y animales domésticos. En la **Tabla 1**, se muestran las enfermedades más serias que afectan a más de un cuarto de la población del mundo:

ENFERMEDAD	PATÓGENO QUE LA CAUSA
Malaria	<i>Plasmodium</i> spp
Varias formas de leishmaniosis cutánea, mucocutánea y visceral	<i>Leishmania</i> spp
Enfermedad africana del sueño	<i>Trypanosoma brucei</i>
Enfermedad de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Disentería amebiana	<i>Entamoeba</i> spp
Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>

Tabla 1: Enfermedades infecciosas causadas por los patógenos a estudiar en el temario

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

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 Y 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 puedan estar disponibles en clínica, pero tales vacunas están siendo lentas en llegar, y como los protozoos ya tienen unos ciclos evolutivos muy establecidos con sus hospedadores, a veces algunos se preguntan si los aficionados a vacunas no están subestimando la habilidad de los estos parásitos para eludir al sistema inmunitario del mamífero. La mayoría de las enfermedades protozoarias son **crónicas** y ocurren en pacientes inmunocompetentes, lo que nos habla de la dificultad de encontrar tales sistemas vacunales.

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 que no causen daños colaterales al organismo hospedador en el que se encuentra.

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. Por ello, no resulta sorprendente que existan **drogas bastante efectivas** para el tratamiento de muchas de estas enfermedades protozoarias. Sin embargo, este panorama se está enturbiando debido al desarrollo de la **resistencia a drogas**.

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

- 1) El desarrollo de herramientas 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 resistencia.
- 3) Encontrar blancos de drogas para el desarrollo de nuevas drogas que no sean afectadas por los mecanismos de defensa o resistencia más comunes.

2.1. Aspectos de la resistencia a fármacos.

Para interferir con la multiplicación del parásito, una droga debe **encontrar al parásito** (a menudo localizado dentro de una célula hospedadora) y **alcanzar su diana** dentro del parásito. Normalmente la droga, una vez dentro de la célula infectada, debe **atravesar la membrana** del parásito, alcanzar una **concentración importante** y a menudo debe **ser activada** en el interior por el propio agente infeccioso. 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 **Fig. 2**. Los posibles mecanismos son:

- A) **Localización en “santuarios”:** Los parásitos pueden evadir la acción de drogas desarrollando la capacidad de irse a sitios del organismo donde el acceso de los fármacos es complicado, es decir, escondiéndose en santuarios tales como el cerebro (ya que muchas drogas no traspasan la barrera hematoencefálica).
- B) **Pérdida de sistemas de entrada:** La entrada de la droga puede ser frustrada por pérdida de los sistemas de entrada (si la droga entra por transportadores) o alteración de la composición de membrana (en el caso de que el fármaco entrara por difusión pasiva).
- C) **Inactivación, secreción, modificación, excreción de la droga:** Una vez dentro, los drogas pueden ser inactivadas, secretadas, modificadas y excretadas, etc.
- D) **Supresión de mecanismos de activación:** Los mecanismos de activación de drogas pueden ser suprimidos o perdidos.
- E) **Alteración de la unión del fármaco a su diana:** La interacción de la droga con el blanco puede hacerse menos efectiva de dos formas: al aumentar el nivel de sustratos competidores (ya que muchos fármacos son competidores del sustrato natural del blanco) o al alterar la diana haciéndola menos sensible a la droga.
- F) **Rodeo del bloqueo:** El parásito puede aprender a vivir con un blanco bloqueado rodeando el bloqueo, es decir, si por ejemplo el fármaco inactiva una vía, el parásito puede aprender a activar otra que genere el mismo producto.
- G) **Activación de sistemas de reparación de daños:** El parásito se puede hacer más eficiente en sistemas de reparación de los daños producidos por las drogas.

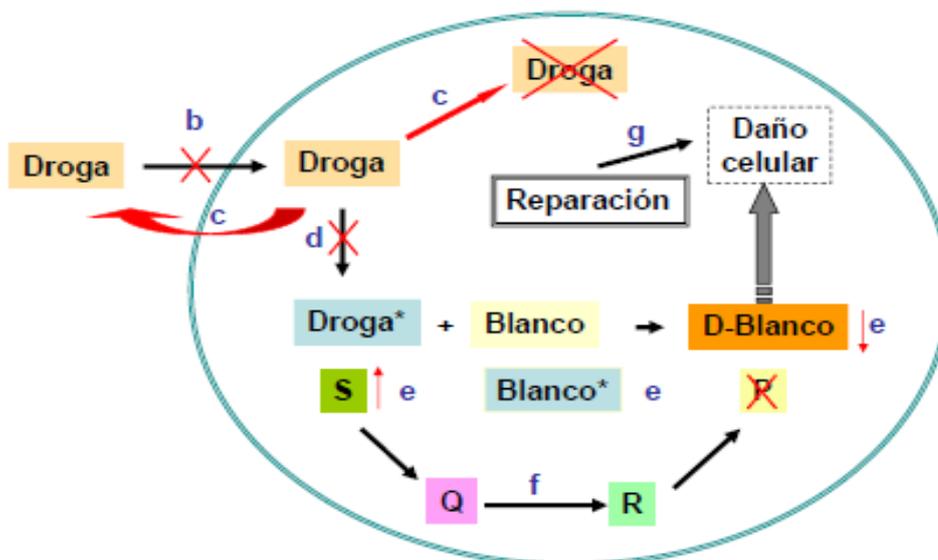


Figura 2: Esquema simplificado que ilustra los principales mecanismos bioquímicos de resistencia a fármacos. Se ejemplifican todos los posibles mecanismos descritos anteriormente, excepto el mecanismo A) consistente en la localización del parásito en santuarios. B) hace referencia a que el parásito puede hacerse resistente a la droga perdiendo los sistemas de entrada por los que ésta normalmente entraría; C) ilustra varios mecanismos: por un lado la droga puede ser inactivada o modificada por rutas bioquímicas del parásito, pero además, una vez dentro, el parásito puede adquirir la capacidad de excretarla; D): algunas drogas necesitan ser activadas en el interior del parásito, de manera que si éste suprime estas vías de activación adquiere resistencia al fármaco; E): el parásito puede alterar la unión del fármaco a su diana alterando dicho blanco (Blanco*) al hacerlo menos sensible a la droga, de manera que disminuye la concentración del complejo D-Blanco (droga-blanco), o aumentando la concentración del sustrato natural de dicha diana (S), lo cual también hace que disminuya la [D-Blanco]; F): el parásito puede sobrevivir al bloqueo producido por la droga mediante la activación de otra vía que genere el mismo producto ($Q \rightarrow R$), rodeando así el bloqueo; por último, en G) se ilustra un mecanismo de activación de sistemas de reparación de daños por el que el parásito se hace resistente reparando los daños celulares producidos por la droga. Adaptada de Borst y Oullete, 1995.

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

2.2. P-glicoproteínas.

La importancia de las **P-glicoproteínas (Pgps)** y transportadores transmembrana relacionados para la resistencia a drogas en distintos organismos 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 (ABC, "Adenine nucleotide Binding Cassette"), también conocidas como **ATPasas de tráfico**. Se encargan del transporte de sustancias **en contra de gradiente** de concentración mediante el consumo de ATP (**Fig. 3**)

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

La resistencia a drogas es causada por esta habilidad de las Pgps por excluir drogas en contra de gradiente de concentración, lo que resulta en una **disminución de la concentración intracelular** de droga en contacto con la molécula diana.

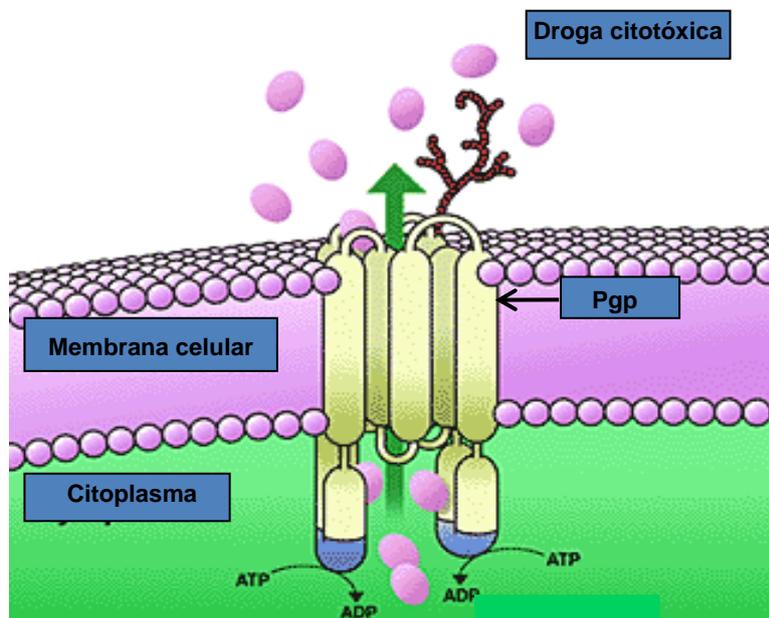


Figura 3: Esquema del funcionamiento de una P-glicoproteína. La droga entra dentro del parásito por un determinado transportador o por difusión pasiva. Sin embargo, los parásitos pueden adquirir resistencia a dicho fármaco usando estas Pgs o transportadores de membrana para expulsar el fármaco en contra de gradiente de concentración (el fármaco está más concentrado en el exterior del parásito), consumiendo energía en forma de ATP. Adaptada de Hyde et al. 1990.

Hasta ahora se han descrito distintos tipos de P-glicoproteínas en *Entamoeba*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Trichomonas* y *Trypanosoma*, que hacen a estos parásitos resistentes a diversos fármacos.

Así, por ejemplo, está el caso de la **resistencia a cloroquina**. La cloroquina (**Fig. 4**) es la droga de elección para el **tratamiento de la malaria**. Sin embargo, la emergencia de resistencia a esta droga en *Plasmodium falciparum* (principal causante de la malaria) ha impedido un avance en el control de la malaria. La resistencia a cloroquina está ampliamente extendida en todos los lugares geográficos donde *Plasmodium falciparum* es endémico. 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**: se vio que el flujo hacia el exterior de cloroquina aumentaba en los parásitos resistentes y por otro lado, experimentos demostraron que el verapamil (un agente inhibidor de Pgs 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. Por tanto, parece que *P.falciparum* se hace resistente a la cloroquina mediante la **sobreexpresión de ciertas Pgs** (como la Pgh1, debido a la amplificación de su gen codificante *pfmdr1*), de forma que el parásito expulsa el fármaco a una velocidad mayor de lo que entra por difusión normal.

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

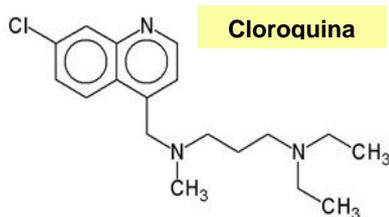


Figura 4. Fórmula química de la Cloroquina (-Wikipedia)

Otro miembro de la familia de las ATPasas de tráfico implicado en la resistencia a fármacos y muy relacionado con las Pgps son las **proteínas MRP**. Aunque existen diferencias fundamentales entre las proteínas MRP y las Pgps, ambas confieren resistencia a un espectro similar de fármacos. Las MRP están indirectamente relacionadas con el transporte de conjugados de **glutación** (GSH) hacia fuera de las células, lo que confiere **resistencia al arsenito**. Esto es debido a que el arsenito (**Fig. 5**) es un fármaco que forma complejos con el glutación, $\text{As}(\text{SG})_3$, de manera que, estas MRP pueden expulsar indirectamente estos complejos, provocando la salida del arsenito fuera del parásito.

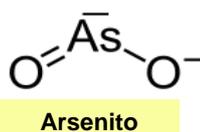


Figura 5. Fórmula química del arsenito (-Wikipedia)

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 aun drogas de primera línea en el tratamiento de **tripanosomiasis** (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** 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 glutación en otras células eucarióticas (**Fig. 6**). Sin embargo, se ha aislado la tripanotion-reductasa de tripanosomas resistentes y sensibles a arsenicales y se ha visto que sus propiedades son idénticas; así, éste, junto con otros experimentos, indican que probablemente esta enzima no sea la implicada en la resistencia a arsenicales en el tripanosoma, sino que cabe la posibilidad de que los arsenicales tengan como blanco otras moléculas que contienen grupos tiólicos y sean éstas las responsables de la resistencia.

Debido a que la tripanotion-reductasa no existe en mamíferos, estas drogas **no provocan efectos secundarios**. Actualmente, hay estudios que indican que la inhibición de la tripanotion-reductasa con pequeñas moléculas que se unen al sitio activo podría anticipar un posible tratamiento de la tripanosomiasis, ya que la tripanotion-reductasa es una enzima fundamental para la supervivencia del parásito.

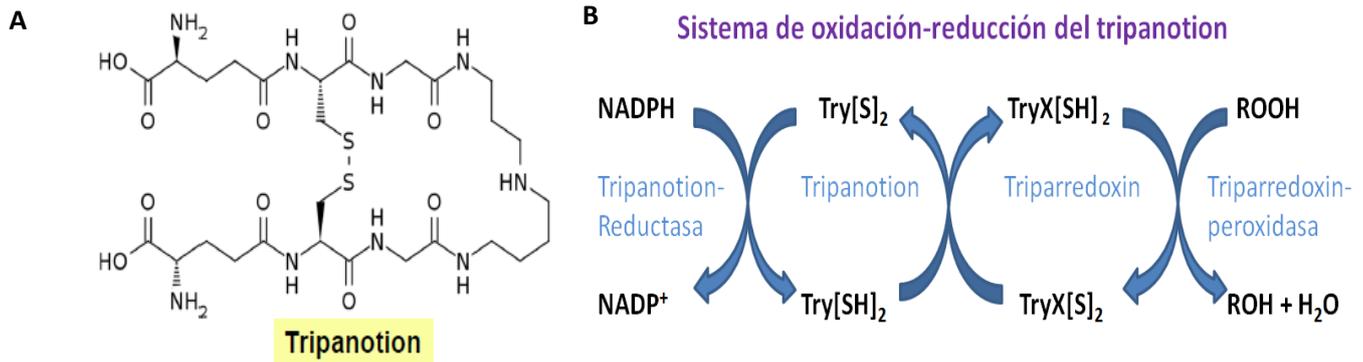


Figura 6. A) Fórmula química del tripanotion. B) Sistema de oxidación-reducción del tripanotion en el tripanosoma para mantener un ambiente reductor intracelular: la tripanotion-reductasa utiliza el NADPH como cofactor para reducir el tripanotion; el tripanotion, al oxidarse, genera una forma intermedia reducida llamada triparredoxina; esta forma intermedia reducida es oxidada por la triparredoxin-peroxidasa para generar una molécula reducida y agua. Adaptada de Wikipedia.

En *T. brucei* (causante de la enfermedad del sueño), la resistencia a estas drogas parece estar asociada a la pérdida de un sistema de **transporte de adenosina**, lo que significa que estos fármacos entran al interior de la célula usando dicho transportador y el parásito se defiende inactivándolo.

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. es un organismo con un genoma muy flexible, capaz de escindir partes del mismo y replicarlo de forma extracromosomal. A menudo responden a la presión de droga mediante la amplificación de partes específicas de su genoma, y de hecho, varios **amplificones** han sido identificados por su asociación con la resistencia a oxianiones. El primer locus de amplificación caracterizado codifica para una **P-glicoproteína llamada PgpA**. De manera que, en este caso, el parásito sobreexpresaría esta P-glicoproteína para expulsar el fármaco (**Fig. 7**). 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.

Mecanismo de resistencia a antimoniales en *Leishmania spp.*



Figura 7. Posible mecanismo de resistencia a antimoniales en *Leishmania spp.*

2.4. Resistencia a antifolatos.

La **dihidrofolato reductasa (DHFR)** y la **timidilato sintasa (TS)** catalizan reacciones consecutivas en la síntesis *de novo* de **dTMP** (**Fig. 8**). 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.

La enzima DHFR que cataliza la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato es una importante diana de la quimioterapia. Las drogas anti-DHFR son llamadas **antifolatos** y son muy empleadas en el tratamiento de **infecciones parasitarias** causadas por *P. falciparum* (malaria) y *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmosis) en humanos.

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 para la síntesis 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**.
- La producción de una **DHFR alterada** con afinidad disminuida para los antifolatos, pero que siguen siendo activas en la reacción que producen.

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.

Algunos de estos mecanismos pueden coexistir en la misma célula.

Un mecanismo común por el que *L. major* responde al antifolato metotrexato es mediante amplificación del gen *dhfr-ts*. Esta sobreproducción, a veces también, va acompañada por mutaciones puntuales en la proteína que se han asociado con la resistencia a la droga metotrexato. De esta manera aunque una proporción importante quede inactivada, el parásito puede seguir produciendo dTMP, lo que lo hace resistente. Sin embargo no se ha observado la amplificación del gen en otros *Leishmania* spp.

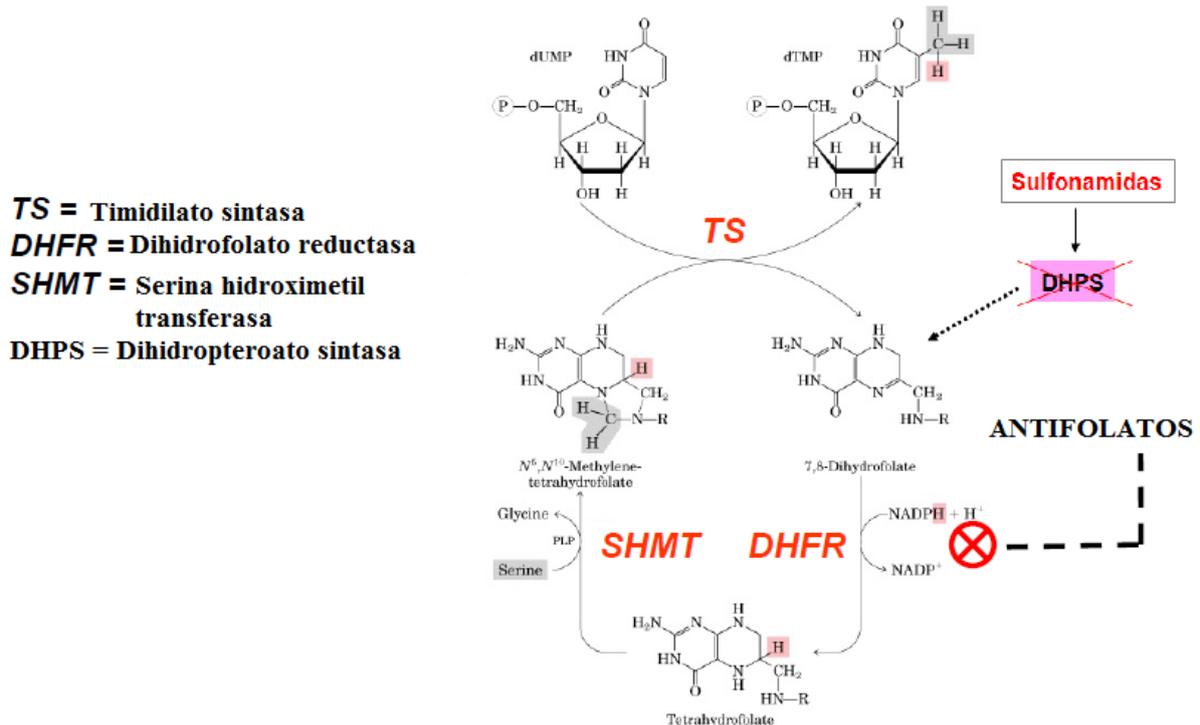


Figura 8: Conversión de dUMP en dTMP por la timidilato sintasa (TS) y la dihidrofolato reductasa (DHFR); la TS y DHFR son inhibidas por los antifolatos. Estas dos enzimas forman una sola en el caso de los protozoos. Las sulfonamidas actúan de manera combinada con los antifolatos para reducir la síntesis de dTMP. La enzima serina hidroximetil transferasa (SHMT) también está implicada en la conversión del dUMP en dTMP pero no se ve afectada por el uso de los antifolato. Adaptada de Nelson & Cox. 2009.

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** (Fig 9). La conversión siguiente de putrescina en espermidina requiere S-adenosilmetionina. La conjugación de espermidina y glutation en tripanosomatidos conduce a la formación de **tripanotion**.

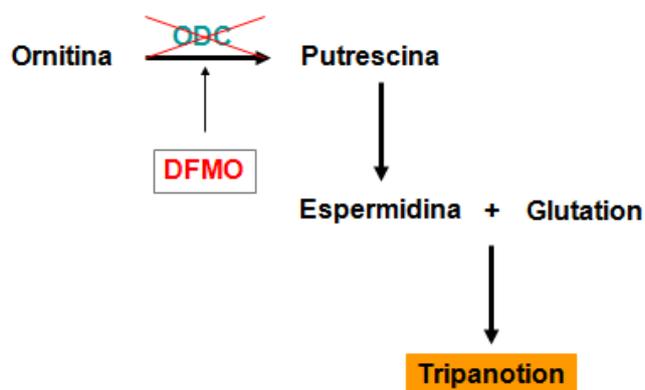


Figura 9: Síntesis del tripanotion partiendo de la transformación de ornitina a putrescina llevada a cabo por la ornitina descarboxilasa (ODC). Esta enzima se ve inhibida por el DL- α -difluorometilornitina (DFMO) tratándose de un sustrato suicida para dicha enzima.

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

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

La falta de poliaminas, esenciales para la síntesis de tripanotio, 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: son un motivo proteico que se encuentra en un gran número de proteínas de corta vida media. Estas regiones se caracterizan por ser ricas en residuos de prolina, glutamato/aspartato, serina y treonina, flanqueadas por aminoácidos básicos. Las **secuencias PEST** se encuentran en enzimas claves del control metabólico, en factores de transcripción, en proteínas quinasas, fosfatasa y en ciclinas, que confiere una corta vida media a las enzimas de mamíferos.

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. El transportador implicado no ha sido identificado.

L. 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 (o cualquier otro agente infeccioso que se multiplique de forma intracelular como virus o bacterias) que residen en el interior de células del hospedador evitan la acción directa del sistema inmunitario. 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.

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

La muerte celular apoptótica se debe distinguir de la **muerte celular necrótica**. 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.

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.

Una característica importante de la apoptosis es que la eliminación de la célula moribunda se realiza **sin inducir una respuesta inflamatoria**. La muerte celular necrótica, por el otro lado, 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 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

Principales funciones de la apoptosis:

- 1) La **eliminación** de las células durante el desarrollo de los organismos multicelulares.
- 2) El mantenimiento de **la homeostasis** de las células del sistema inmunitario.
- 3) La **retirada** de células tumorales y células dañadas.
- 4) La **eliminación de neuronas** en exceso, o mal conectadas, durante el desarrollo del sistema nervioso.
- 5) 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 cistein-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 (**Fig. 10**):

A) 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 aspartil serin-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.

B) 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).

C) 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, caspasas 9 y 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.

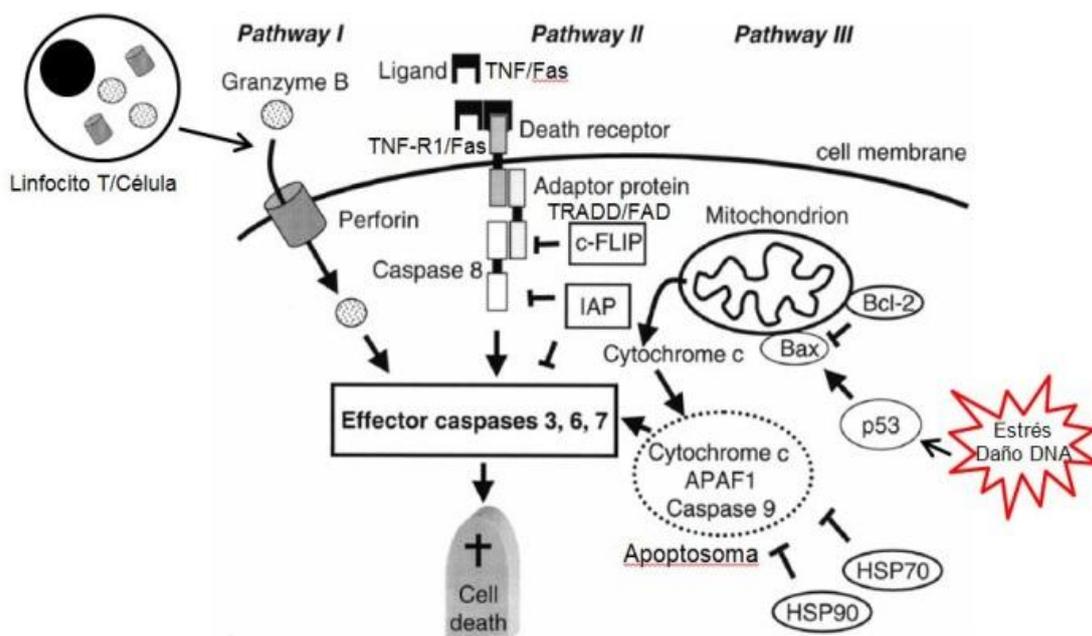


Figura 10. Esquema que ilustra las 3 vías que conducen a la apoptosis. **Pathway I:** vía mediada por granzima B/perforina. **Pathway II:** vía extrínseca mediada por los receptores de muerte (TNF-R1 y Fas). **Pathway III:** vía intrínseca mediada por la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma. Adaptada 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 (Fig.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”), característico de una vía propiamente inflamatoria (Fig. 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.

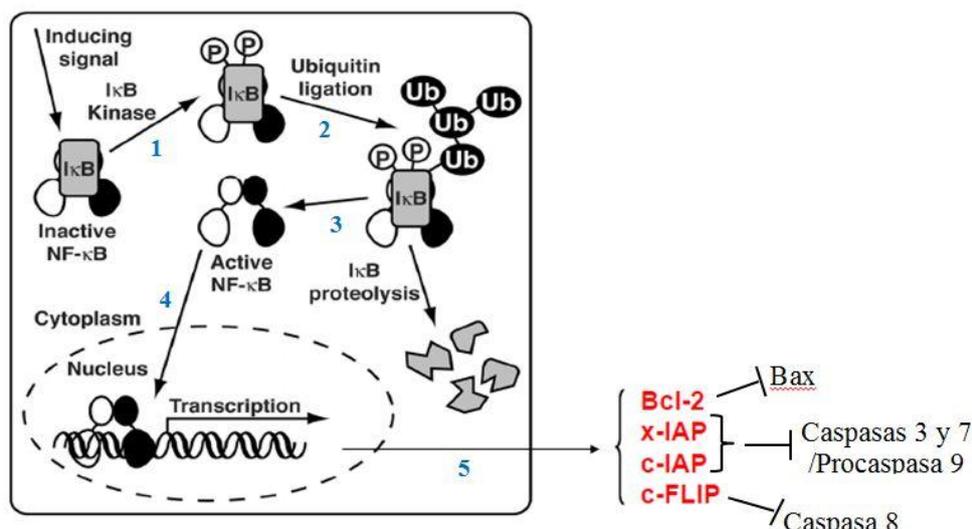


Figura 11. Esquema que detalla el mecanismo pro-supervivencia mediado por el factor de transcripción NF- κ B. 1) La recepción de un estímulo extra o intracelular activa al complejo cinasa I κ B, que fosforila a I κ B unido a NF- κ B. 2) La fosforilación de I κ B lleva a su ubiquitinación. 3) I κ B se degrada por proteólisis y NF- κ B queda libre en el citoplasma en su conformación activa. 4) NF- κ B activo se trasloca al núcleo. 5) Una vez en el núcleo, NF- κ B activa la transcripción de los genes pro-supervivencia Bcl-2, x-IAP, c-IAP y c-FLIP, que actúan a distintos niveles de las vías extrínseca e intrínseca inhibiendo distintos componentes.

NF- κ B es inducido por una gran variedad de estímulos extracelulares (proteínas inflamatorias) e intracelulares (patógenos). En las células no estimuladas, NF- κ B es secuestrado en el citoplasma por la unión a su **inhibidor I κ B**, quien enmascara la señal de localización nuclear de NF- κ B. 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 cinasa multisubunidad I κ B, también conocido como **señaloma IKK**, es activado. Subsiguientemente, I κ B 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 (vía intrínseca) 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. Como resultado de la activación de esta vía se inhibe el miembro pro-apoptótico (Bad) de la familia Bcl-2 y se inhiben factores transcripcionales de la familia forkhead, activadores de la transcripción de genes codificantes para proteína pro-apoptóticas como son Bim y FasL.

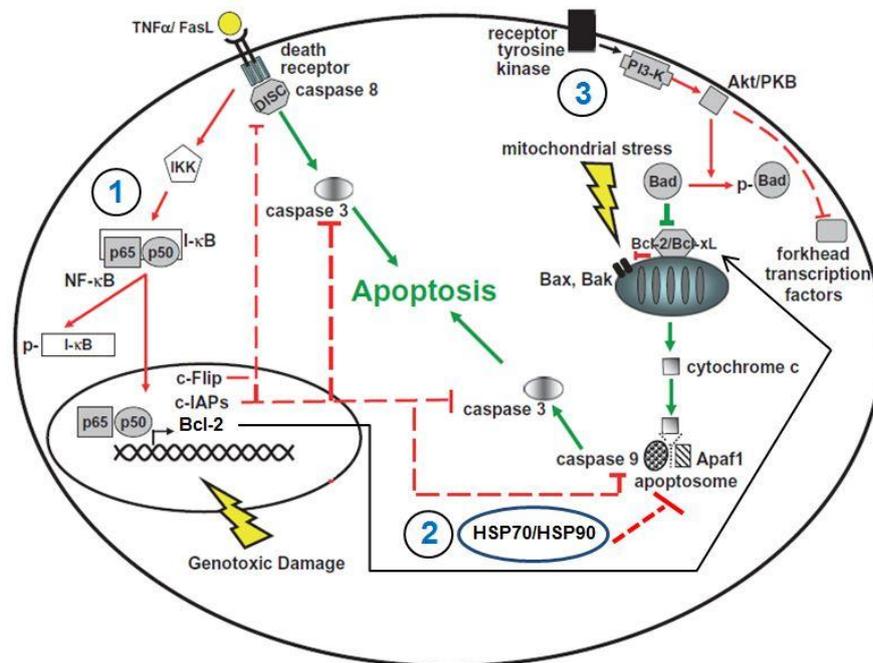


Figura 12. Esquema general que resume los tres mecanismos inhibidores de las vías apoptóticas. **1)** Activación del factor de transcripción NF- κ B y efecto de los productos génicos cuya expresión upregula (c-FLIP, c-IAPs y Bcl-2). **2)** Bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis a nivel de APAF-1 por efecto de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90. **3)** Inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis por activación de la vía de PI3K. Adaptada 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- κ B 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- κ B:** 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- κ B, 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 cruzipaina, 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

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

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.

La PCD puede estar inducida por diferentes estímulos pero su **resultado** es independiente del estímulo que la produzca y lo que se observa es: cambio en la **permeabilidad** de la membrana plasmática, **condensación** del núcleo, **fragmentación** del DNA y ruptura de la célula en **cuerpos apoptóticos** que son fagocitados por células de alrededor. Además de estos cambios morfológicos pueden observarse otros cambios, como es el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la activación de **proteasas** y **nucleasas**.

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. (Fig. 13)

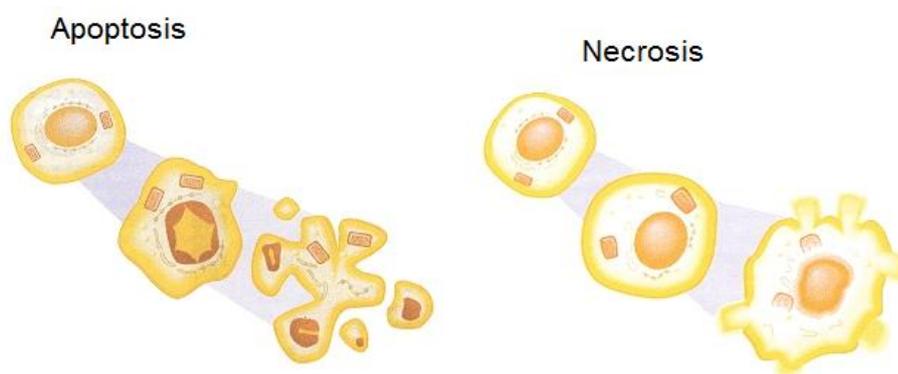


Figura 13. En esta imagen se muestran las diferencias entre una célula apoptótica y una necrótica. En la **apoptosis** la célula se encoge, empiezan a aparecer burbujas y la cromatina se compacta. En la **necrosis** la célula y los orgánulos se hinchan, mientras que el núcleo se mantiene prácticamente intacto, después, la célula se expande y revienta. Adaptada de <http://www.oocities.org/hmontoliu/introduccion/introduccion-2.html>.

La razón a este hecho 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. (Fig.14)

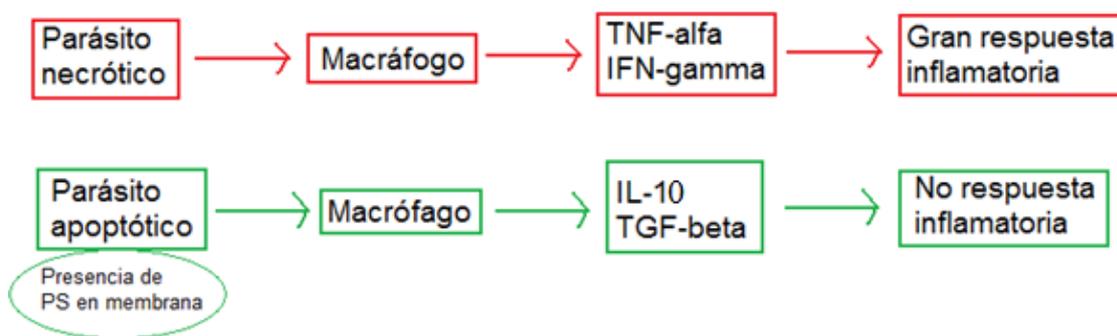


Figura 14. Esquema que permite visualizar el diferente efecto que tiene sobre el sistema inmunitario la fagocitosis de un parásito necrótico o apoptótico.

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*. (Fig.15)

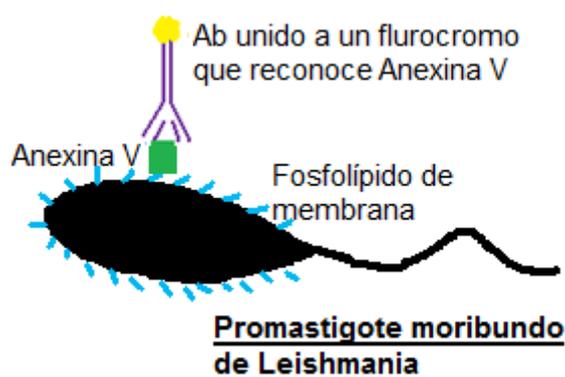


Figura 15. Esta figura representa un promastigote en estado apoptótico por la presencia de un determinado fosfolípido en su membrana. La detección *in vitro* se realiza por la incubación de los parásitos con la Anexina V que se une a un fosfolípido de la membrana y a su vez esta es reconocida por un 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.

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

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. Se cree que esta respuesta está 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** (Fig. 16). 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.

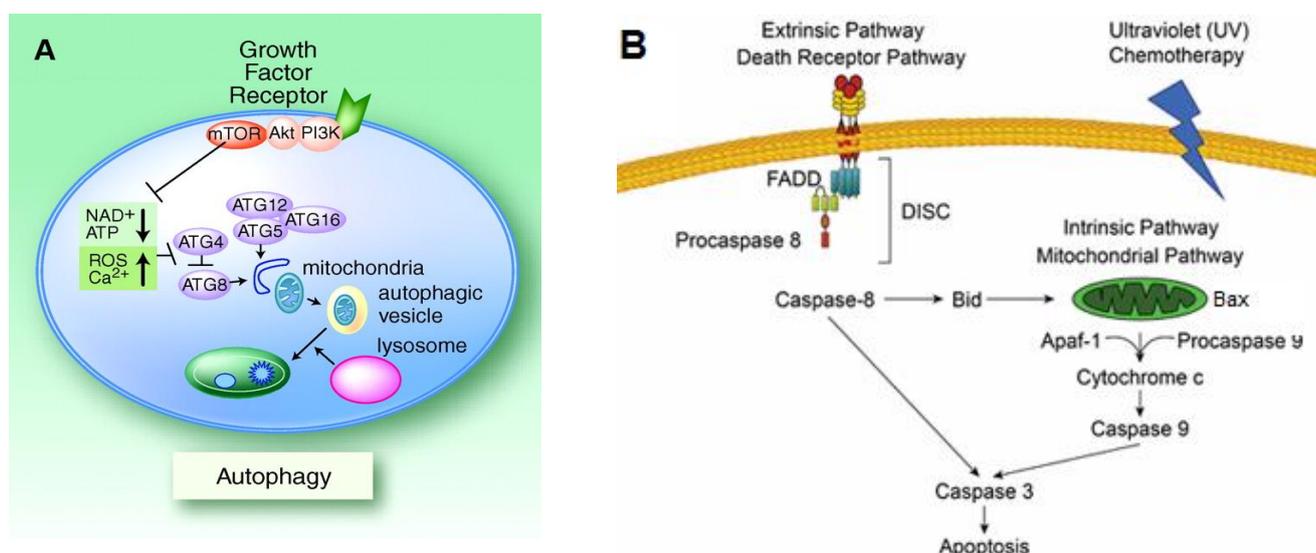


Figura 16. Esta figura muestra los componentes principales de las vías de **autofagia** (A) y de la **apoptosis** (B). Figura A adaptada de Amaravadi et al. 2007 y Figura B adaptada de Alpini et al. 2002.

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. Aunque sí que se han encontrado metalocaspasas en bastantes parásitos (por ejemplo en *T.brucei*). 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.

5. REFERENCIAS

- **Alpini, G., McGill, J.M. and Larusso, N.F.** (2002) The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology* 35(5):1256-1268.
- **Borst, P. y 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.
- **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.
- **Despommier, D.D. y Karapelou, J.W.** (1987) *Parasite Life Cycles.* Springer-Verlag, New York.
- **Deveraux, Q.L. and Reed, J.C.** (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13(3):239-252.
- **Heussler, V.T., Küenzi, P. and Rottenberg, S.** (2001) Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.* 31: 1166-1176.
- **Hyde, S.C., Emsley, P. and Hartshorn, M.J.** (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990; 346:362-5.
- **Kerr, J.F.R., Willie, A.H., Currie, A.R.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972: 26:239-57.
- **Koopman, G., C. Reutelingsperger, G. Kuijten, R. Keehnen, S. Pals, M. Van Oers.** (1994) Annexin V for flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420.
- **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.
- **Nelson, D.L. y Cox, M.M., eds.** (2009). *Lehninger. Principios de Bioquímica, 5ª ed., Ediciones Omega.*

Tema 24. INTRODUCCIÓN A LA PARASITOLOGÍA. PROTISTAS.

- **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.
- **Patterson, S., Alphey, 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.
- **Persch, E., Bryson, S., Todoroff, N.K., Eberle, C., Thelemann, J., Dirdjaja, N., Kaiser, M., Weber, M., Derbani, H., Brun, R., Schneider, G., Pai, E.F., Krauth-Siegel, R.L. and Diederich, F.** (2014) Binding to large enzyme pockets: small-molecule inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem* 9(8):1880-1891.
- **Ravi K. Amaravadi, Craig B. Thompson** (2007) The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 13: 7271-7279.
- **Schmidt, G.D. y 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.

En la red:

- Introducción a la apoptosis. Página web disponible online en el siguiente enlace: <http://www.oocities.org/hmontoliu/introduccion/introduccion-2.html>
- Mecanismos de proteólisis intracelular: la necesidad de destruir. Página web disponible en el siguiente enlace: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros52/proteolisis.html>