



Tema 24. Introducción a la parasitología

**Microbiología clínica 2021-2022.
Grado en Bioquímica. Universidad Autónoma de Madrid**

Ángela López García
Shuling Ferradas Fernández
Jennifer Morata Bianchi
María del Mar García Soto
Carla Maya López

Microbiología clínica



FACULTAD DE
CIENCIAS

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
JMRR-UAM © 2021

UAM

Universidad Autónoma
de Madrid

ÍNDICE

	<i>Nº 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.....	7
2.2 P-glicoproteínas.....	8
2.3. Resistencia a arsenicales y a antimoniales	11
2.4. Resistencia a antifolatos.....	12
2.5. Resistencia a inhibidores de ornitina descarboxilasa	14
3. Formas de persistencia y su importancia en el fallo terapéutico.....	15
4. Inhibición de la apoptosis por parásitos protozoos intracelulares.....	24
4.1. Vías que conducen a la apoptosis.....	26
4.2. Inhibición de la apoptosis.....	28
4.3. Parásitos que interfieren con las vías apoptóticas.....	30
5. La muerte celular programada en organismos parásitos unicelulares.....	31
6. Los exosomas: vehículos de comunicación entre parásito y hospedador.....	33
7. Referencias.....	39

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. Los protozoos forman parte del reino Protista, donde se encuadran todos los organismos unicelulares eucarióticos. Los protozoos corresponden a aquellos protistas que son heterótrofos y que no son hongos. Los protistas, 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.

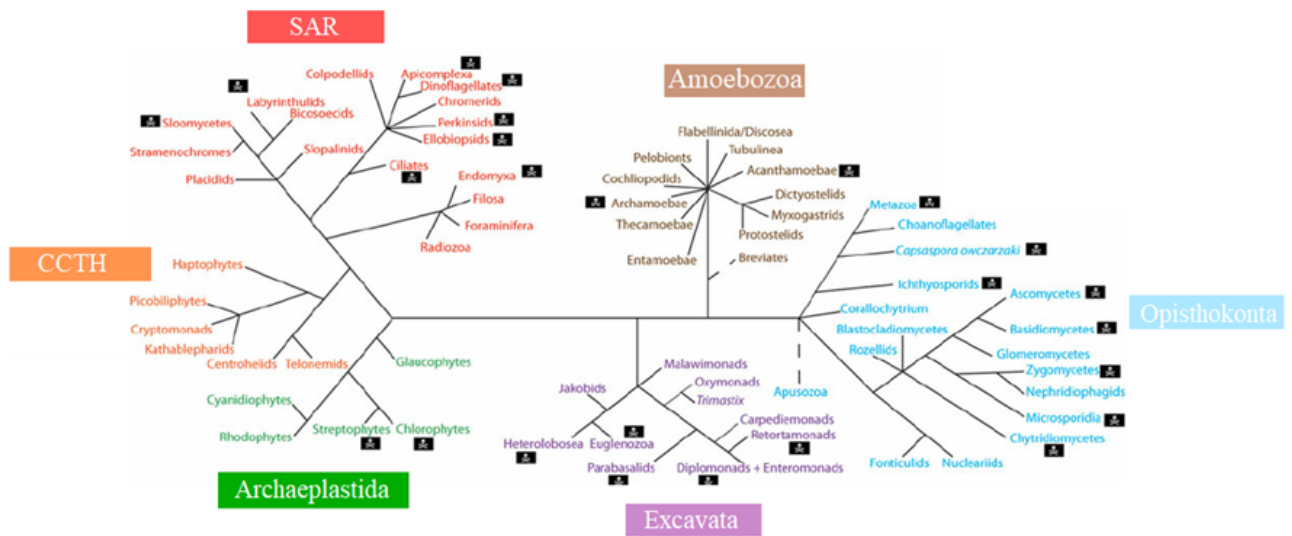


Figura 1. Árbol filogenético sin raíz de eucariotas. Este esquema de la diversidad eucariótica muestra la clasificación de los 6 supergrupos y los grupos que los componen. El árbol está basado en los resultados de numerosos análisis genómicos a gran escala y filogenéticos, así como de datos comparativos estructurales. Los “falgs Jolly Roger” al lado de los grupos taxonómicos denotan la presencia de parásitos de importancia para la agricultura o el hombre. *Modificado de Walker et al. (2011).*

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

- Malaria, causada por *Plasmodium* spp.
- Varias formas de leishmaniosis cutánea, mucocutánea y visceral, causadas por *Leishmania* spp.
- La enfermedad africana del sueño, causada por *Trypanosoma brucei*.
- La enfermedad de Chagas en Sudamérica, causada por *Trypanosoma cruzi*.
- La disentería amebiana, causada por *Entamoeba* spp.
- Toxoplasmosis, causada por *Toxoplasma gondii*.

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.

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 en Sudamérica
<i>Entamoeba</i> spp	Disentería amebiana
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis

Tabla 1. Principales enfermedades causadas por parásitos.

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 pueden estar disponibles, pero tales vacunas están siendo lentas en llegar, y a veces algunos se preguntan si los aficionados a vacunas no están subestimando la habilidad de los protozoos 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 similares a los 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** frente al 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 se esquematiza en la **Figura 2**.

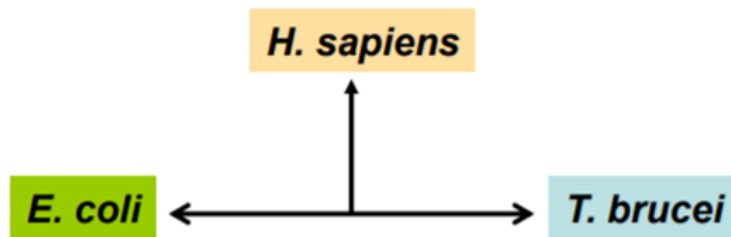


Figura 2. Esquema ilustrativo de la distancia evolutiva existente entre *Trypanosoma brucei*, *Homo sapiens* y *Escherichia coli*. Esto explica la especificidad de las drogas contra los parásitos, con pocos o ningún efecto secundario en humanos.

Por ello, no resulta sorprendente que existan fármacos bastante efectivos para el tratamiento de muchas de estas enfermedades protozoarias, ya que la gran distancia evolutiva entre *Homo sapiens* y los protozoos permite que se desarrollen drogas específicas contra los parásitos. Sin embargo, el panorama se está enturbiando debido al desarrollo de la **resistencia a fármacos**.

Aunque los **estudios de los mecanismos de resistencia a fármacos** 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 fármacos y combinaciones de fármacos para minimizar el desarrollo de resistencia.
- 3) Encontrar blancos de fármacos para el **desarrollo de nuevos compuestos que no sean afectados** por los mecanismos de defensa o resistencia más comunes.

2.1. ASPECTOS DE LA RESISTENCIA A FÁRMACOS.

Para interferir con la multiplicación del parásito, el fármaco debe **encontrar al parásito** (a menudo dentro de una célula hospedadora) y **alcanzar su diana** dentro del parásito. Normalmente el fármaco debe **atravesar la membrana** del parásito, y a menudo debe ser activado en el interior. Después de que el fármaco 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 del fármaco, lo que resulta en la aparición de resistencia frente al mismo.

Los principales mecanismos bioquímicos responsables de la resistencia a drogas son (**Figura 3**):

- A) **Localización en santuarios:** Los parásitos pueden evadir la acción de los fármacos escondiéndose en santuarios (lugares de nuestro organismo de difícil acceso para los fármacos) tales como el cerebro (es decir, muchos fármacos no atraviesan la barrera hematoencefálica).
- B) **Pérdida de sistemas de entrada:** La entrada del fármaco puede ser frustrada por pérdida de los sistemas de entrada (sistemas de transporte) o alteración de la composición de la membrana (lo cual cambia la permeabilidad de la membrana, con lo que se evita la difusión pasiva del fármaco).
- C) **Inactivación o secreción del fármaco:** Una vez dentro del parásito, los fármacos pueden ser inactivados, excretados, modificados y excretados, etc.
- D) **Supresión de mecanismos de activación:** Muchos de los fármacos necesitan una activación posterior a la entrada en el parásito para poder actuar contra el blanco. Los mecanismos de activación de los fármacos pueden ser suprimidos o perdidos, de manera que el parásito adquirirá resistencia.
- E) **Alteración de la interacción fármaco-diana:** La interacción del fármaco con el blanco puede hacerse menos efectiva al aumentar el nivel de substratos competidores o al alterar la diana haciéndola menos sensible al fármaco.
- F) **Rodeo del bloqueo:** El parásito puede aprender a vivir con un blanco bloqueado rodeando el bloqueo, es decir, a través de una vía alternativa que resulte en el mismo producto.
- G) **Activación de sistemas de reparación de daño celular:** El parásito se puede hacer más eficiente en sistemas de reparación de los daños producidos por los fármacos.

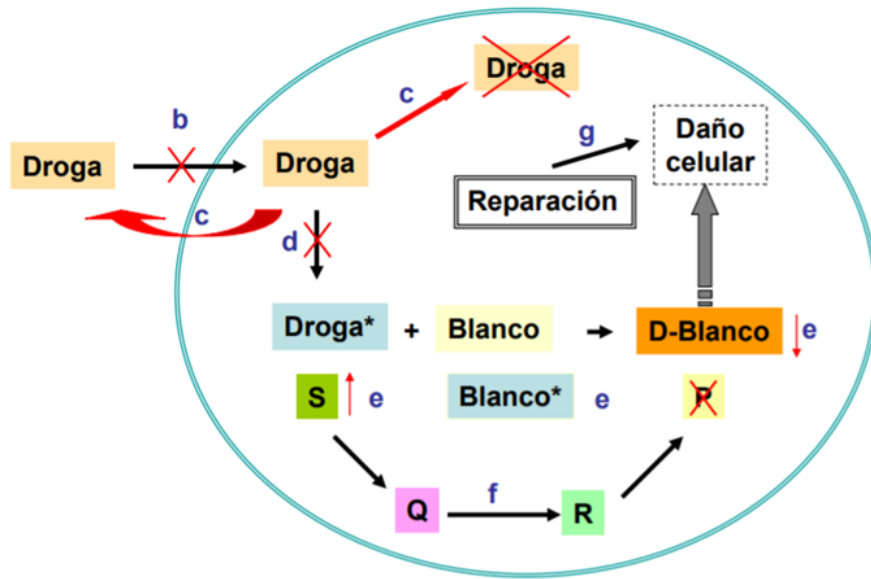


Figura 3. Esquema ilustrativo de los principales mecanismos bioquímicos de resistencia a fármacos en protistas (exceptuando el de localización del parásito en lugares de difícil acceso en el organismo). Las letras se corresponden a cada uno de los mecanismos explicados en el texto: **B)** pérdida de sistemas de entrada; **C)** inactivación o secreción del fármaco; **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 daño celular.

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** 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, también conocidas como proteínas MDR (*multidrug resistance*), 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. Los transportadores ABC están presentes en todos los reinos de organismos y presentan una estructura general muy conservada (**Figura 4**). Por lo general contienen dos dominios transmembrana (TMDs, *transmembrane domains*) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs, *nucleotide binding domains*). Dentro de los dominios NBD, existen tres motivos de secuencia muy conservados, denominados Walker A, Walker B y motivo C.

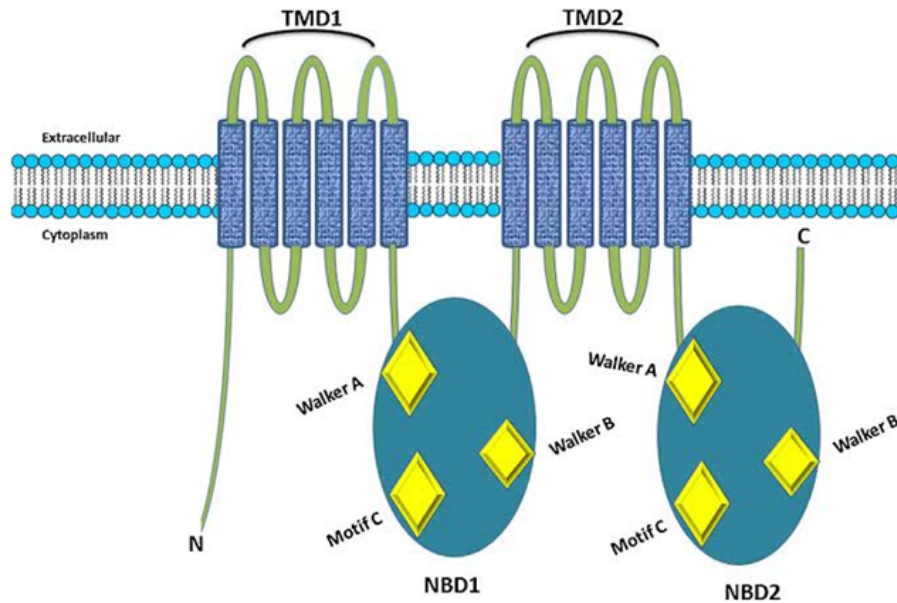


Figura 4. Estructura típica de un transportador ABC (Adenine nucleotide Binding Cassette). Representación esquemática del transportador completo ABC (TMD-NBD-TMD-NBD) organizado como dos dominios transmembrana (TMDs) que contienen seis segmentos transmembrana y dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs) que constan de los motivos Walker A, Walker B y motivo C. *Figura obtenida de Pramanik et al. (2019)*

La resistencia a drogas es causada por la 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. Estos transportadores llevan a cabo un transporte activo dependiente de la hidrólisis de ATP, para translocar el fármaco desde el citoplasma de la célula parasitaria al exterior de la misma. De esta manera se establece la resistencia al fármaco, ya que este no puede alcanzar una concentración intracelular suficiente como para llegar a ser tóxico (**Figura 5**).

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

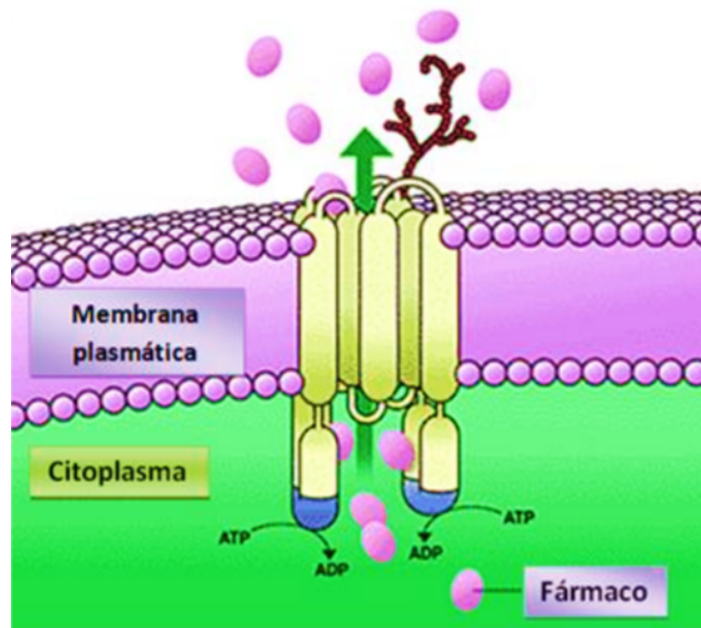


Figura 5. Mecanismo de acción de una P-glicoproteína en la secreción de fármacos.

Figura obtenida de Cuenca, Palacios y Tomero (2017). *Microbiología clínica*

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 se puso de manifiesto que este mecanismo estaba asociado a una expresión aumentada de ciertas P-glicoproteínas. Por una parte, se observó que el flujo hacia el exterior de cloroquina aumenta en los parásitos resistentes a este fármaco. Por otra parte, otros experimentos demostraron que el verapamil (inhibidor de P-glicoproteínas) y compuestos similares eran capaces de restaurar la sensibilidad a cloroquina en los parásitos resistentes al inhibir el mecanismo con el que el parásito expulsa el fármaco.

De esta manera se demostró que las especies de *Plasmodium* resistentes a la cloroquina sobreexpresaban una P-glicoproteína (concretamente, la Pgh1, debido a la amplificación del gen *pfmdr1*), de manera que, al ser excretada, esta no afectaba al parásito.

Recientemente se ha publicado un estudio en el que se demuestra cómo ciertos polimorfismos y cambios epigenéticos en ABCB1, un gen que codifica para otra P-glicoproteína, influyen en la susceptibilidad a la malaria causada por *P. 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** 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 6**) 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.

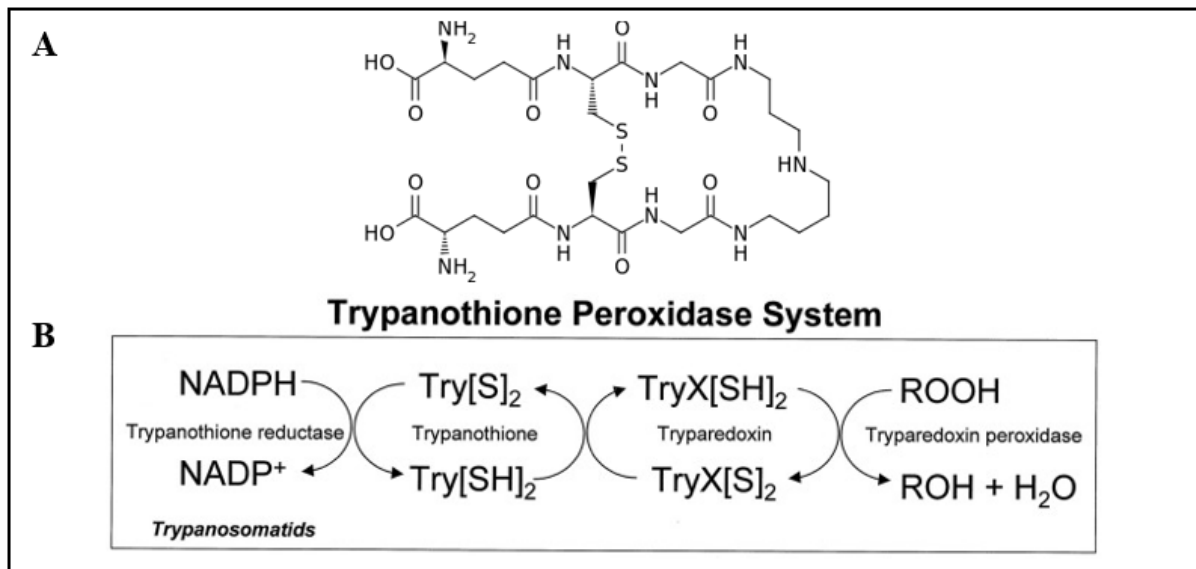


Figura 6. A) Estructura molecular del tripanotion. Los grupos tiólicos son esenciales para mantener el estado reductor intracelular. Imagen extraída de Wikipedia

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 cual es posteriormente oxidada por la triparredoxina peroxidasa para dar lugar a una molécula reducida y agua. *Figura obtenida de Alphey et al. (1999).*

Esta enzima (tripanotion-reductasa) no existe en mamíferos, de manera los fármacos que actúan sobre esta enzima lo hacen de manera específica, sin provocar efectos secundarios en humanos.

Sin embargo, en *T. brucei*, se desarrolla resistencia a estas drogas, y parece estar asociada a la pérdida de un sistema de transporte de adenosina (TbAT1). Esto sugiere que este es el transportador que permite la entrada del fármaco, y, al perder este sistema de transporte, el parásito adquiere resistencia.

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 presión de la droga mediante la amplificación de partes específicas de su genoma, ya que presenta una gran plasticidad y es capaz de escindir regiones y replicarlas de forma extracromosomal, produciendo amplicones de determinados genes, lo que conduce a su sobreexpresión. 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 la resistencia a drogas no se ha demostrado, parece tratarse de una resistencia 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 y por tanto para la supervivencia. Estas reacciones se ilustran en la **Figura 7**. 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. Es por ello que 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* (uno de los agentes responsables de la **malaria**) y *Toxoplasma gondii* (responsable de la **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 parán la síntesis de DNA.

Las reacciones de estas enzimas y sus inhibidores se ilustran en la **Figura 7**.

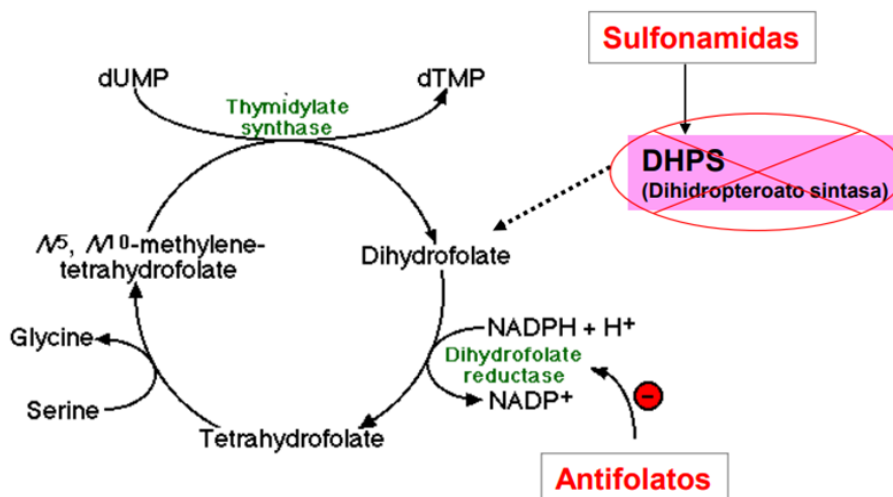


Figura 7. Papel de la dihidrofolato reductasa, de la timidilato sintasa y de la dihidropteroato sintasa en el metabolismo de síntesis de dTMP. Cabe mencionar que las dos actividades enzimáticas de la dihidrofolato reductasa y la timidilato sintasa están contenidas dentro de la misma enzima bifuncional en protistas. De igual forma, se indican los pasos de la vía sobre los que actúan inhibidores antifolatos y sulfonamidas.

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. Además, 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. Se trata de cambios aminoacídicos en la parte de la enzima que interacciona con los antifolatos, lo cual da lugar a una **DHFR alterada** con una afinidad disminuida para estos fármacos, pero con actividad enzimática.

Por otra parte, 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 igual forma, 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 conduce a la resistencia a antifolatos “clásicos”, como el metotrexato. Sin embargo, la pérdida de función de TbFT1-3 aumenta la susceptibilidad del parásito a otros antifolatos denominados “no clásicos”, como la pirimetamina. Esto indica que los folatos y los antifolatos clásicos presentan una

estructura muy similar, por lo que comparten un mecanismo común de transporte a través de los transportadores de folatos, mientras en el caso de los antifolatos no clásicos, al ser lipofílicos, pueden entrar en las células bien mediante difusión pasiva o bien mediante difusión facilitada, por lo que la pérdida de función de un transportador de folatos no impide la entrada de los antifolatos no clásicos al interior de la célula, 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.

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 tripanosomatidos conduce a la formación de **tripanotión** (**Figura 8**).

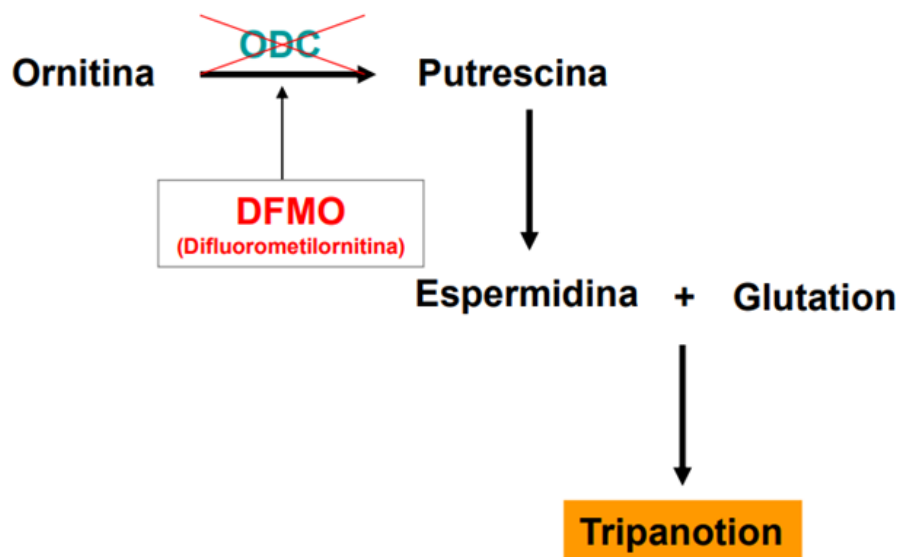


Figura 8. Ruta biosintética del tripanotión en protistas. De igual forma, se ilustra el modo de acción de la DL- α -difluorometilornitina (DFMO), un agente antitripanosomal que inhibe a la ornitina descarboxilasa (ODC) e impide la formación de putrescina a partir de ornitina y, con ello, la producción de tripanotión.

Un inhibidor específico de la ornitina descarboxilasa, el DL- α -difluorometilornitina (DFMO, eflornitina) (**Figura 9**) se desarrolló como un agente antitumoral, pero también se ha encontrado que es altamente efectivo como agente antitripanosomal.

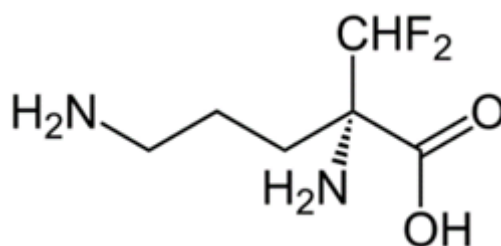


Figura 9. Estructura molecular de la eflornitina (DFMO).

La falta de poliaminas, esenciales para la síntesis de tripanotión, 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 y en tripanosomas, la enzima carece de dicha secuencia, por lo que tiene una vida media más larga. Esto hace que la ODC sea inhibida en las células de los parásitos, pero no en la de mamíferos, donde la enzima se está renovando con mayor frecuencia al tener una vida media más corta.

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.

Los inhibidores de la ODC también se han utilizado de forma experimental frente a leishmaniosis. *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. FORMAS DE PERSISTENCIA DE LOS PARÁSITOS Y SU IMPORTANCIA EN EL FALLO TERAPÉUTICO.

Las células **persistentes** (denominadas *Persisters* en inglés) son una subpoblación de células capaces de parar el crecimiento o hacerlo de una forma muy lenta. En este estado de quiescencia, las células persistentes **no son afectadas** por los agentes citotóxicos que van a destruir al resto de células de la población. Sin embargo, no existen cambios genéticos que permitan diferenciar ambas subpoblaciones, persistentes o susceptibles; y, de hecho, cuando las células persistentes reactivan su

metabolismo, recuperan la susceptibilidad a los agentes citotóxicos. Las células persistentes pueden aparecer de una forma estocástica o en respuesta a cambios ambientales como es la falta de nutrientes.

El término de células persistentes fue acuñado en 1944 por el médico irlandés Joseph Bigger, al observar que una pequeña proporción en cultivo de *Staphylococcus aureus* no resultaba afectada por la penicilina, a estas células las denominó persistentes.

Las células persistentes son **más resistentes** a estreses ambientales, entre los que se incluyen el ataque del sistema inmunitario y el tratamiento con fármacos. Una vez que el estrés ambiental desaparece, esta población **vuelve a proliferar y colonizar** el entorno medioambiental.

Aunque por un tiempo se pensó que esta característica era propia de las bacterias, ahora se sabe que las células eucarióticas también pueden establecer estados de quiescencia/durmiente, y células persistentes se han descrito en hongos, en células tumorales y en protozoos parásitos. Dentro de estos últimos, posiblemente el ejemplo más conocido es en parásitos del género *Plasmodium*, que son capaces de establecer una fase de su desarrollo en el tejido hepático, denomina **hipnozoito**, que puede permanecer en un estado durmiente durante meses o años, antes de reactivar su proliferación y multiplicación. A continuación se describen con mayor detalle este y otros ejemplos de estados de persistencia en algunos parásitos más conocidos.

En la infección por *Plasmodium*, tras la inoculación de las formas esporozoito por parte del insecto vector, estas llegan al hígado donde invaden hepatocitos y empiezan su multiplicación. Pero en ciertas especies de *Plasmodium*, algunos esporozoitos, de forma aparentemente espontánea, detienen su crecimiento y se establecen como hipnozoitos, un estado en el que el parásito persiste por meses o incluso años antes de reactivar su crecimiento (**Figura 10**). La **reactivación** de los hipnozoitos conduce a episodios de **malaria** en personas que estaban aparentemente curadas. Y, además es un obstáculo en el objetivo de erradicación de la malaria a nivel global. La biología de las formas hipnozoitos está poco estudiada, entre otras razones porque su número es muy pequeño y son difíciles de localizar en el tejido hepático. Se sabe que, en este estado de quiescencia, existe cierta actividad metabólica. Así se observa actividad de proteínas implicadas en la protección frente al **estrés oxidativo**, en la **exportación de proteínas**, en el **mantenimiento de niveles de ATP** y en la **modificación postraducciona**l de proteínas. Por ejemplo, se detecta actividad de metilación y acetilación de histonas, lo que sugiere una regulación epigenética de este estado de persistencia.

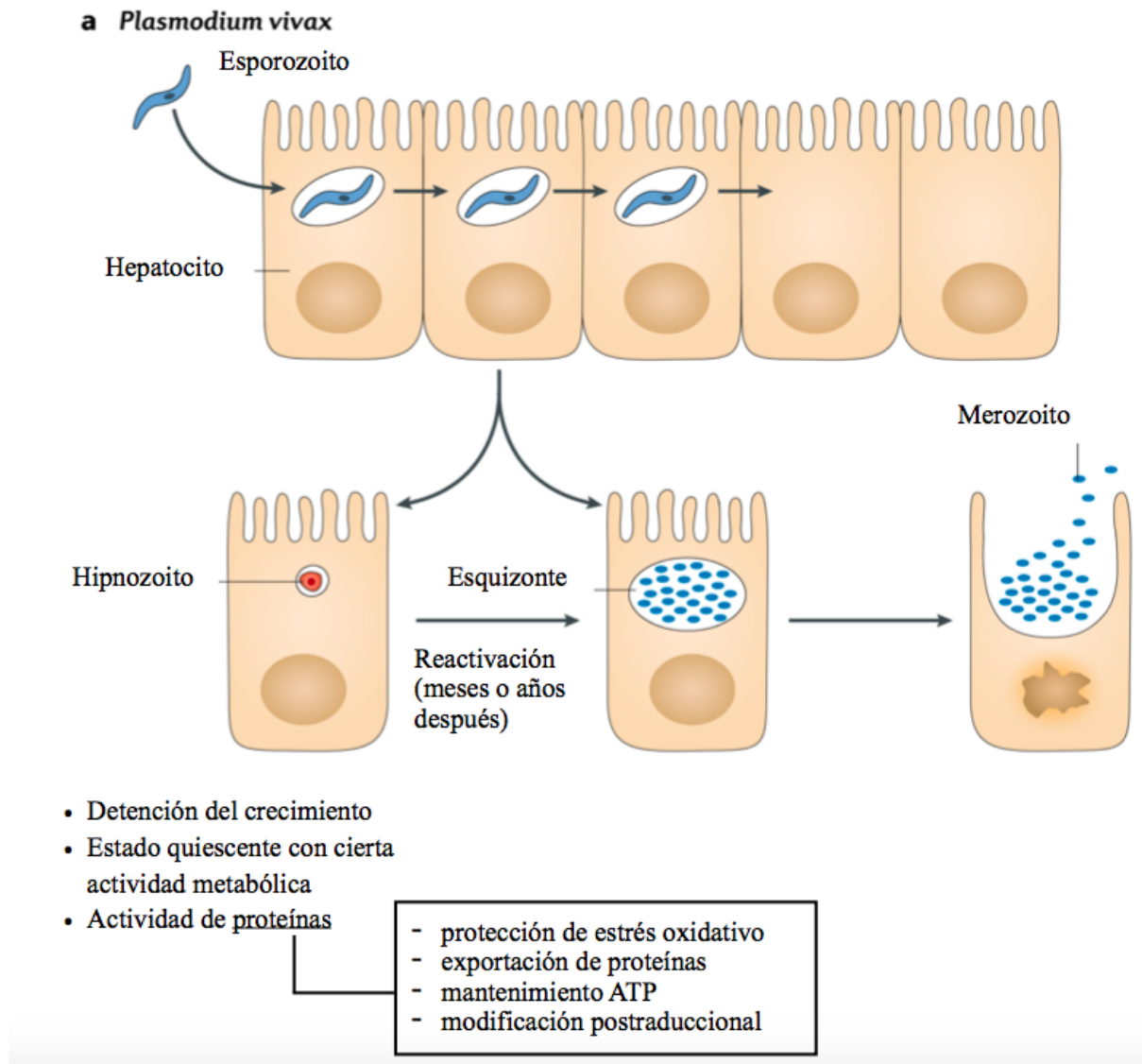


Figura 10. El hipnozoito de *Plasmodium vivax*. Los esporozoitos de *P. vivax*, inyectados en el hospedador por mosquitos infectados, infectan rápidamente a los hepatocitos. En las células del hígado, los parásitos pasan por una etapa proliferativa sin división celular para producir un esquizonte (esquizogonia). El esquizonte se diferencia en las formas merozoitos que salen de los hepatocitos y entran al torrente sanguíneo donde invaden los eritrocitos. Alternativamente, algunos esporozoitos formarán hipnozoitos que pueden persistir en un estado de crecimiento detenido durante semanas o muchos meses antes de entrar en esquizogonia y completar el ciclo de desarrollo en el hígado. *Figura modificada de Barrett et al. (2019).*

Además de este estado de persistencia que *Plasmodium* establece en la fase hipnozoito, y que es conocido desde hace mucho tiempo, se han descrito más recientemente nuevas formas de persistencia asociadas con el tratamiento farmacológico. Tras la infección de los glóbulos rojos por *Plasmodium*, el parásito adopta la **forma 'en anillo'**, denominada así por su apariencia en las imágenes de microscopía óptica, previo al crecimiento y multiplicación. Se ha visto que la exposición de pacientes al fármaco **artemisinina**, ampliamente empleado para el tratamiento de la malaria, produce un bloqueo en el crecimiento de algunos de estos parásitos. Estas formas en anillo no-replicativas persisten en los eritrocitos por días o semanas antes de volver a retomar el crecimiento.

Este estado durmiente, inducido por la artemisinina, se distingue fenotípicamente al microscopio al observarse parásitos pequeños con un núcleo condensado (**Figura 11**). Se desconoce si estas formas también pueden aparecer de forma espontánea.

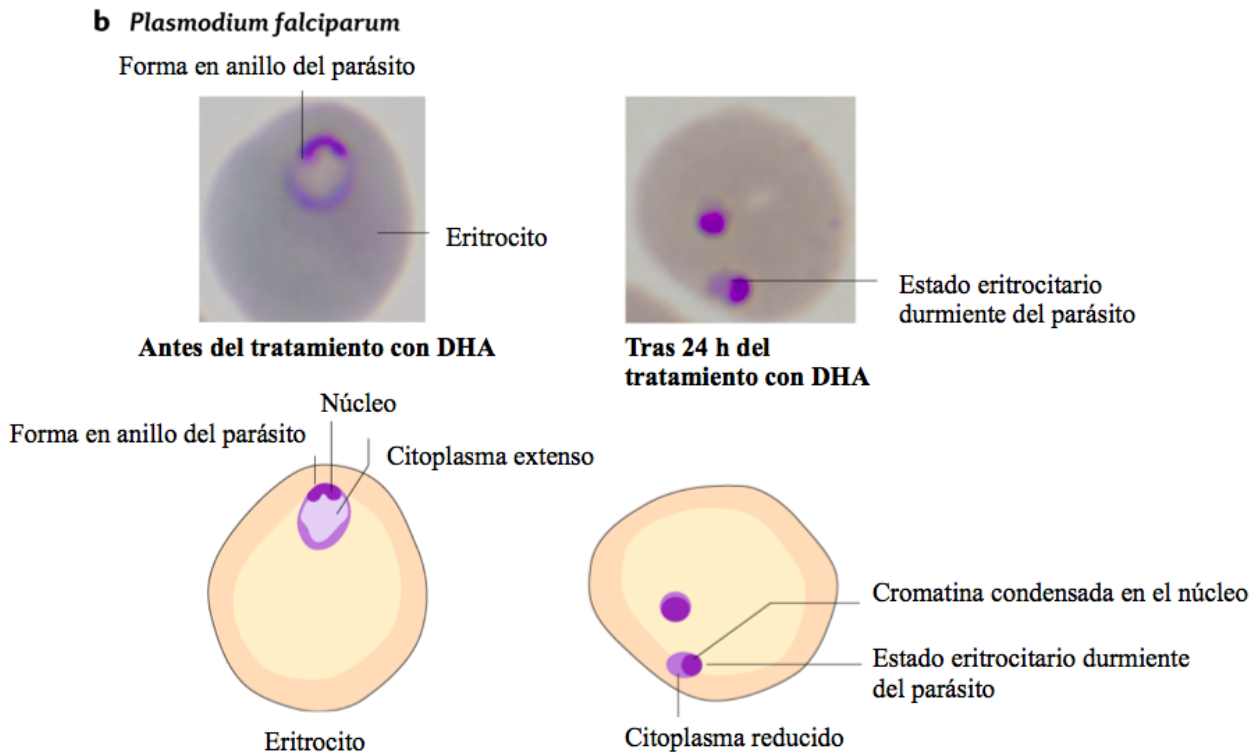


Figura 11. Formas de latencia refractarias a la artemisinina en *P. falciparum*. La exposición de los parásitos *P. falciparum* internos en eritrocitos a la dihidroartemisinina (DHA) induce la detención del ciclo celular. Estas formas “en anillo” latentes se caracterizan morfológicamente por cromatina condensada y citoplasma reducido. Por el contrario, las formas “en anillo” antes del tratamiento con DHA tienen un núcleo relativamente difuso y un área citoplasmática grande. Los parásitos en fase de anillo latente persisten durante varios días antes de reanudar el crecimiento normal. El panel superior muestra parásitos teñidos con Giemsa (violeta) dentro de los eritrocitos. El panel inferior proporciona una representación más gráfica del panel superior. *Figura modificada de Barrett et al. (2019).*

Varios estudios han implicado la fosforilación del factor iniciador de la traducción eIF2 α en promover el estado durmiente en la fase en anillo y también en esporozoitos. Estudios en ratón, al bloquear la fosforilación de eIF2 α , se previene el estado durmiente del parásito y se aumenta la sensibilidad al tratamiento con artemisininas (**Figura 12**).

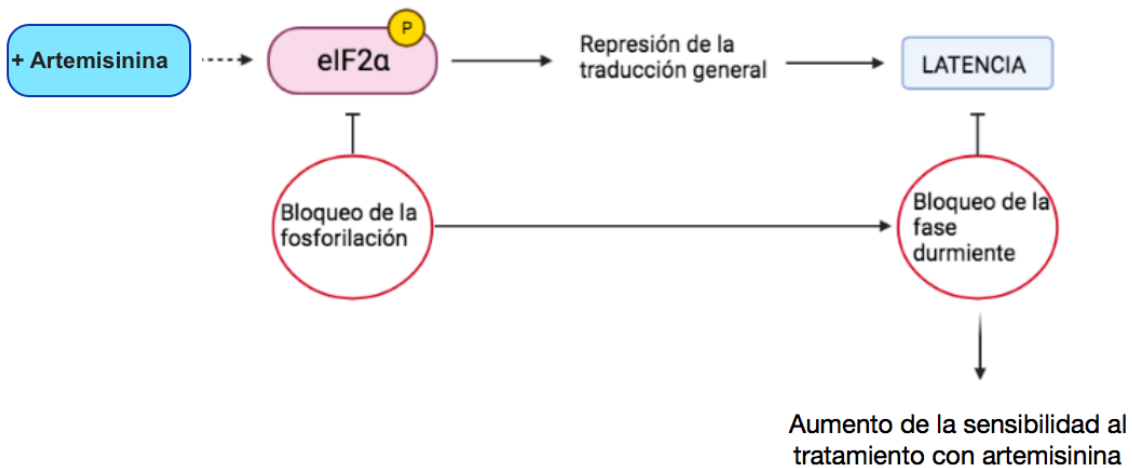


Figura 12. La fosforilación de eIF2 α permite inducir la latencia. Estudios recientes demuestran el papel potencial de la fosforilación de eIF2 α como un mecanismo que promueve la latencia en la fase de anillo en Plasmodium. Se sugiere que la fosforilación del factor permite reprimir de forma general la traducción proteica lo que daría lugar a latencia en el parásito. Por tanto, la inhibición de la fosforilación de eIF2 α podría evitar que los parásitos entren en estado durmiente y, por lo tanto, retengan la sensibilidad a artemisinina. *Imagen elaborada con BioRender.*

Otro ejemplo de formas durmientes o semi-durmientes bien conocido es lo que ocurre durante la infección por *Toxoplasma gondii*. La infección se adquiere al consumir alimentos contaminados con quistes, donde se encuentran esporozoitos, si proceden de las heces de gato, o bradizoitos, si proceden de carnes de animales infectados con el parásito. En ambos casos, el parásito se diferencia a una forma de alta capacidad de multiplicación, denominada **taquizoito**. Cuando el parásito siente el **estrés** o **presión generado por el sistema inmunitario**, se diferencia a la forma denominada **bradizoito**, que va a formar quistes, donde el parásito establece un estado de persistencia (**Figura 13**). En los individuos inmunocompetentes, la presencia de las formas bradizoito es totalmente asintomática, pero el parásito se reactivará y causará patología en caso de que las personas desarrollen inmunosupresión. Hay estudios que implican la **falta de nutrientes**, el **alto pH** y la **exposición a óxido nítrico** como factores desencadenantes de la diferenciación a la forma bradizoito.

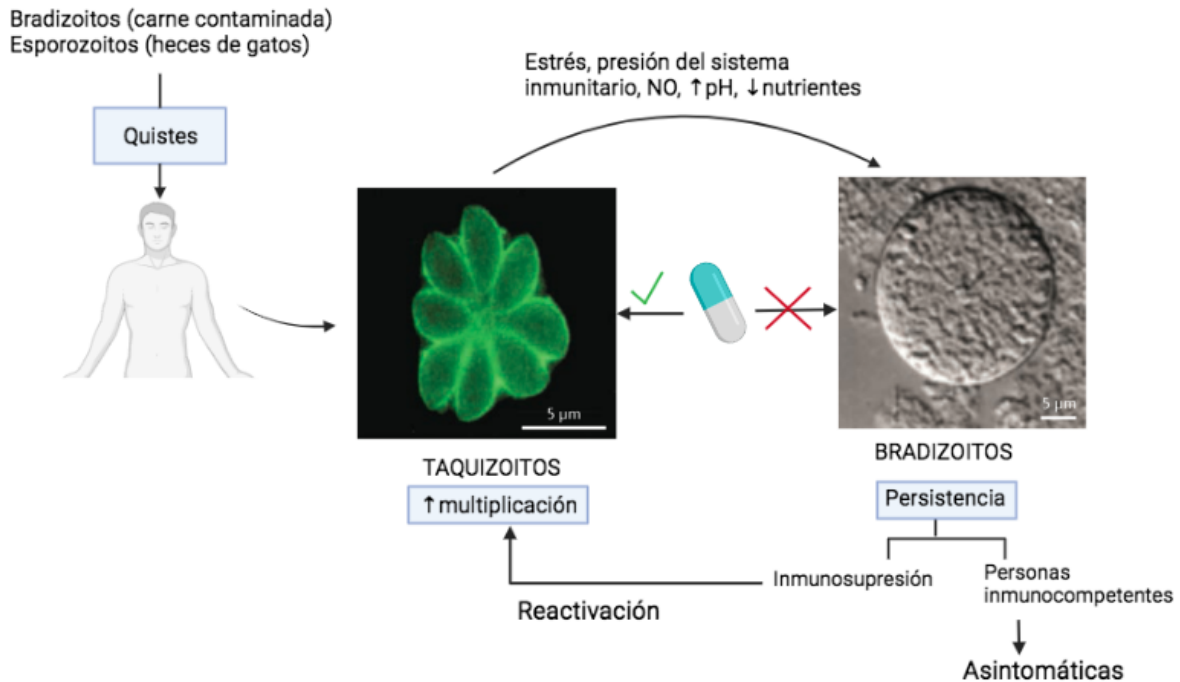


Figura 13. Estado de persistencia en *Toxoplasma gondii*, agente causante de la toxoplasmosis. La infección inicial puede producirse a través de la ingestión de carne de animales contaminados (quistes de bradizoitos) o por heces de gatos que contienen ooquistes (esporozoitos). Una vez en el interior del hospedador intermediario, los parásitos adoptan la forma de taquizoito (con alta replicación) que se disemina por todo el hospedador y causan una enfermedad aguda. La presión del sistema inmunitario, el estrés ambiental, la escasez de nutrientes, el alto pH y la presencia de óxido nítrico son factores que favorecen la diferenciación del taquizoito a bradizoito. Los bradizoitos forman quistes tisulares dentro de las células del huésped y dan lugar a una infección persistente (etapa crónica). Estos bradizoitos se reactivarán en personas inmunodeprimidas mientras que permanecerán persistentes en personas inmunocompetentes. Se muestran imágenes de microscopía del taquizoito (izquierda, visualizado usando anticuerpo policlonal de conejo anti-antígeno de superficie 1 con Alexa Fluor 488) y un quiste tisular que contiene bradizoitos (derecha, imagen de campo claro). Las terapias farmacológicas actuales solo tienen éxito contra taquizoitos, pero no eliminan quistes tisulares. *Figura modificada de Barrett et al. (2019).*

Esta característica de *Toxoplasma* impide que los tratamientos farmacológicos sean efectivos para eliminar las infecciones crónicas. Pues mientras que los taquizoitos son sensibles, los bradizoitos, por su baja o nula actividad metabólica, no son afectados por los fármacos (**Figura 13**).

Otro parásito donde los estados de persistencia son bien conocidos es *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas. El parásito tras una infección aguda, muchas veces asintomática, establece una infección crónica, donde resulta extremadamente difícil detectarlo. El parásito dentro de células musculares del corazón y otros tejidos musculares establece un estado de persistencia que puede durar toda la vida de la persona infectada, sin mostrar síntomas. Sin embargo, en un 15-30% de las personas infectadas de forma crónica, muchos años después de la infección primaria, se desarrollan **procesos autoinmunes** que pueden ser causa de fallos cardíacos o alteraciones graves de la musculatura del tubo digestivo (**Figura 14**).

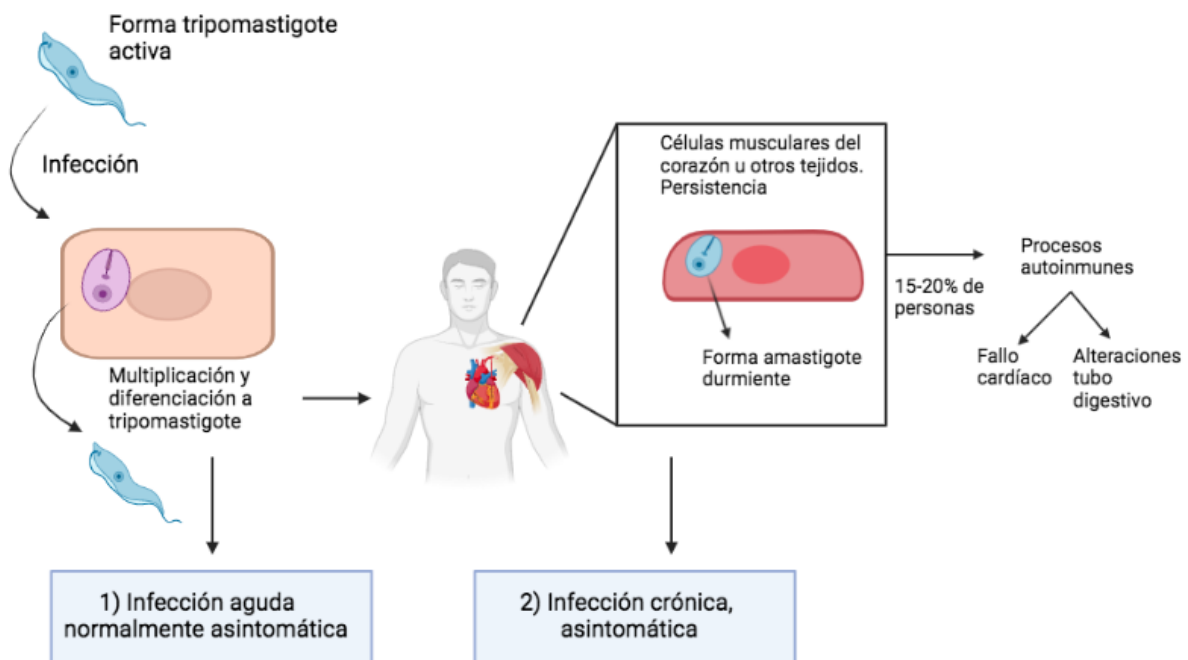


Figura 14. Estados de persistencia de *Trypanosoma cruzi*. El parásito puede infectar a una persona en su forma activa denominada tripomastigote que entra en la célula del hospedador y se diferencia a amastigote. Esta forma amastigote, durante la infección aguda, se multiplica activamente y genera muchos parásitos que dan lugar a tripomastigotes que inician de nuevo el ciclo infectando nuevas células. Sin embargo, en la fase crónica, el parásito puede adoptar una forma de “amastigote durmiente” normalmente en células musculares del corazón y otros tejidos musculares donde persiste mucho tiempo generando una infección asintomática. Un 15-20% de las personas con infección crónica desarrollarán daños orgánicos, dando lugar a las formas cardíacas, digestivas o nerviosas de la enfermedad de Chagas crónica (procesos autoinmunes). *Imagen elaborada con BioRender.*

Finalmente, un cuarto parásito donde la persistencia también es una característica en su ciclo de vida es *Leishmania*. Este parásito es causante de una grave enfermedad denominada leishmaniasis, que afecta cada año a un millón de personas, pero se estima que al menos son 10 veces más el número de personas que tienen infecciones subclínicas. Por otro lado, algunas personas tras una aparente cura experimentan nuevas reactivaciones de la infección. Ambos hechos sugieren que *Leishmania* es capaz de establecer estados de persistencia, en los que el parásito no resulta afectado por los fármacos administrados al paciente (**Figura 15**).

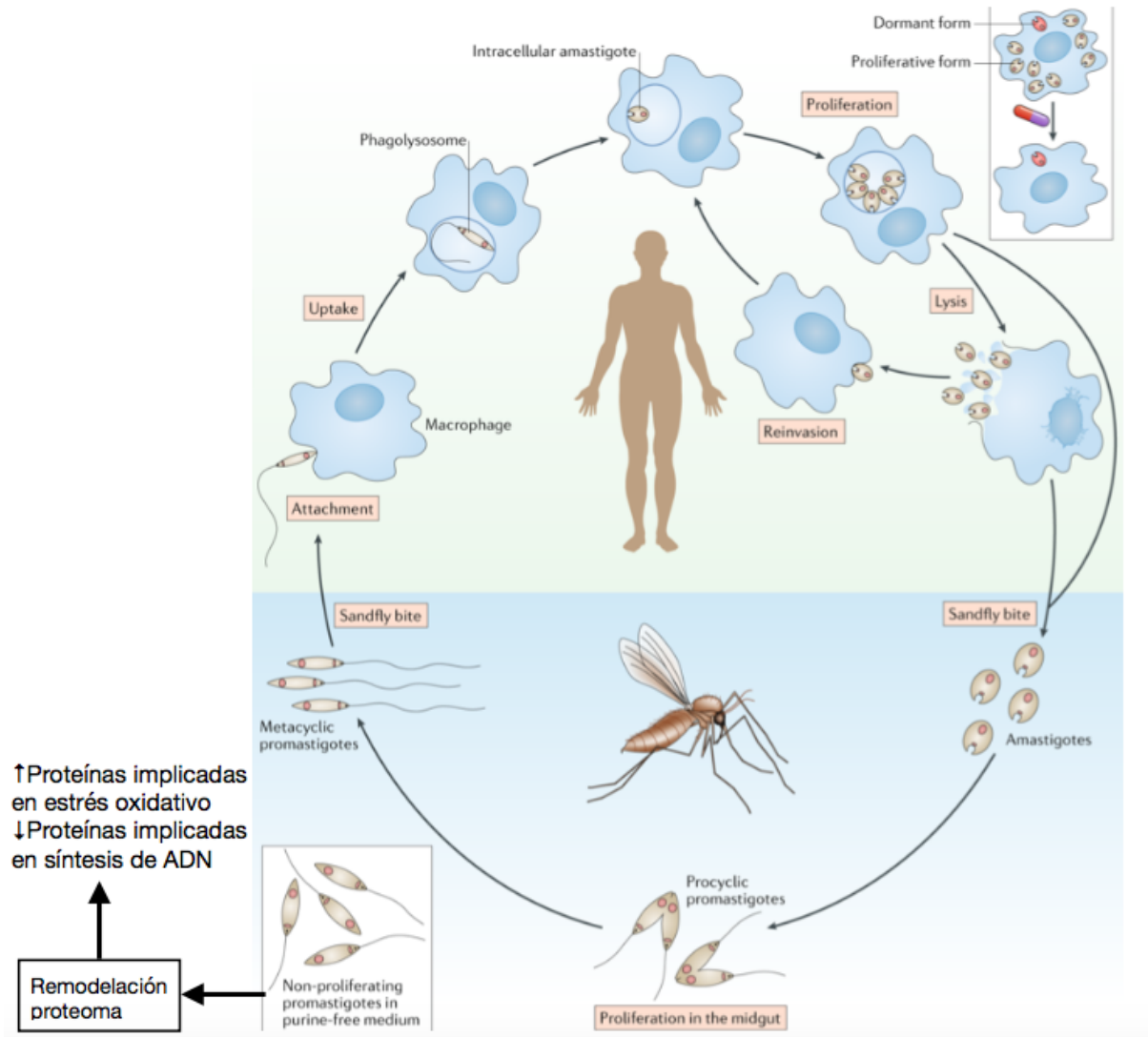


Figura 15 . Ciclo de vida de *Leishmania* que muestra el impacto de la persistencia. *Leishmania* alterna entre la forma promastigote móvil en el insecto (vector) y la forma amastigote intracelular en el mamífero (huésped). Se produce la transmisión del parásito a través de la picadura del insecto, de forma que *Leishmania* entra en el huésped en forma de protomastigote meta-cíclico. Los protomastigotes infectan las células fagocíticas del hospedador y dentro de los fagosomas se diferencian a amastigotes y se replican. Posteriormente, las células hospedadoras sufren lisis y los amastigotes liberados infectan otras células hospedadoras. Alternativamente, es posible que un insecto pique a una persona infectada y absorba su sangre con amastigotes, en este caso se produciría la diferenciación del parásito a promastigotes proliferantes (promastigotes procíclicos) en el intestino medio del insecto. Hay estudios que han identificado poblaciones de amastigotes intracelulares que no se dividen, y es probable que estas formas con detención del crecimiento contribuyan al fracaso del tratamiento farmacológico y a infecciones persistentes (panel superior derecho). Se ha demostrado que los promastigotes entran en un estado no proliferativo pero viable en medio empobrecido en purinas (panel inferior izquierdo). *Figura modificada de Barrett et al. (2019)*

Estudios recientes han documentado que *Leishmania* en condiciones de cultivo en **ausencia de purinas** (bases nitrogenadas que el parásito no puede sintetizar) establece un estado quiescente no-proliferativo. Sin embargo, tras 48 horas en este estadio, se observa una profunda **remodelación**

del proteoma en el que se observa una disminución en proteínas implicadas en la replicación del DNA y en la síntesis de proteínas, al tiempo que se observa un aumento en proteínas implicadas en vías de respuesta al estrés oxidativo.

En conclusión, al igual que ocurre en bacterias y células tumorales, los parásitos han desarrollado **mecanismos para generar estados de persistencia**, como mecanismo de defensa frente a los estreses a los que son sometidos durante su ciclo de vida. Y, en consecuencia, el conocimiento de los mecanismos que conducen a este estado durmiente, que suponen cambios metabólicos reversibles (**Figura 16**), puede ayudar al desarrollo de estrategias de tratamiento que permitan la erradicación completa del parásito en las personas infectadas.

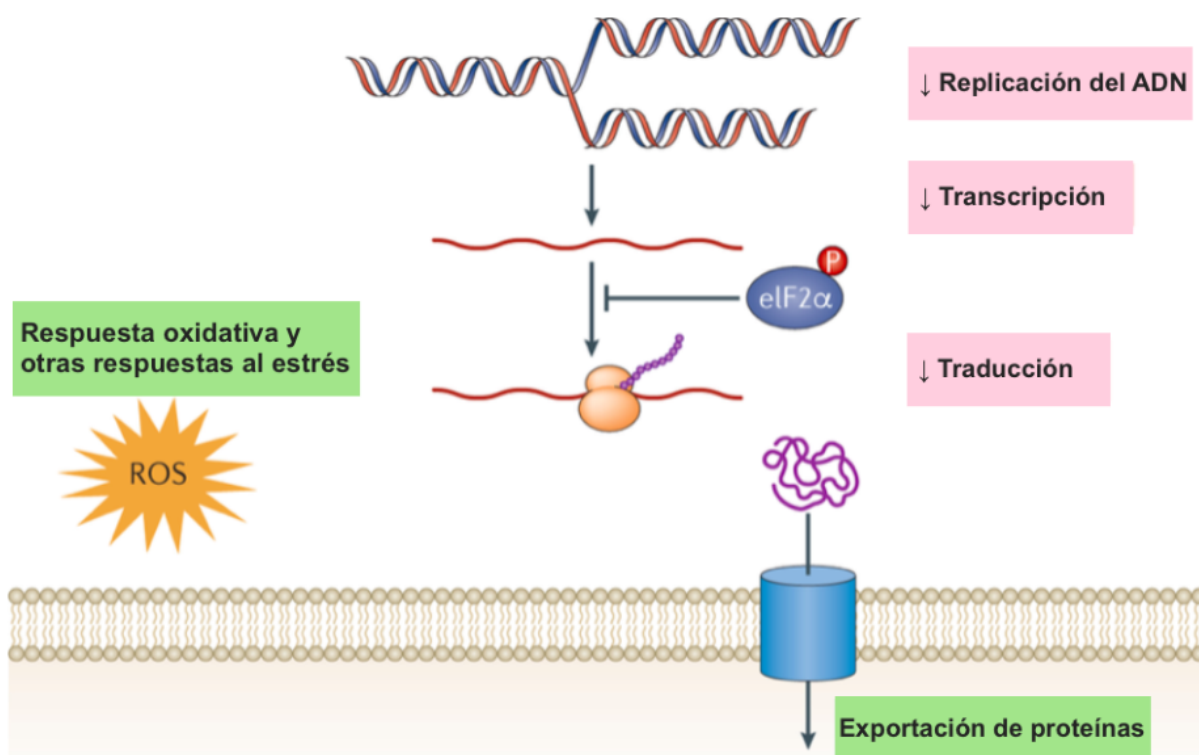


Figura 16. Cambios metabólicos en los protozoos persistentes. Actualmente, nuestro conocimiento es limitado con respecto a los cambios metabólicos en las células protozoarias de tipo persistente. Los estudios han demostrado que en *Plasmodium spp.* y en *Toxoplasma gondii*, la replicación del ADN, la transcripción general y la síntesis de proteínas son procesos disminuidos en las células de tipo persistente. Sin embargo, se mantienen algunas vías bioquímicas, como la exportación de proteínas (se ha visto en hipnozoitos de *Plasmodium cynomolgi*) y las respuestas al estrés oxidativo (visto en bradizoitos de *Plasmodium* y *T. gondii*). Además, en condiciones de cultivo donde escasean las purinas, los promastigotes no proliferativos de *Leishmania donovani* exhiben una menor replicación y reparación del ADN así como síntesis de proteínas, mientras que las vías de respuesta al estrés oxidativo aumentan. Finalmente, en los protozoos apicomplexanos, la fosforilación del factor de iniciación eucariota del parásito-2 α (eIF2 α) se ha implicado en el establecimiento de la latencia (posiblemente mediante la inhibición de la síntesis proteica global). *Figura modificada de Barrett et al. (2019).*

4. 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. 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**. 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.

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 (**Figura 17**) (**Tabla 2**).

Se considera que las principales **funciones de la apoptosis** son:

- (i) la eliminación de las células durante el desarrollo de los organismos multicelulares.
- (ii) el mantenimiento de la homeostasis de las células del sistema inmunitario.
- (iii) la retirada de células tumorales y células dañadas.

(iv) la eliminación de neuronas en exceso, o mal conectadas, durante el desarrollo del sistema nervioso.

(v) últimamente, se está poniendo de manifiesto que la apoptosis actúa como mecanismo de defensa frente a la infección de virus, bacterias y parásitos intracelulares.

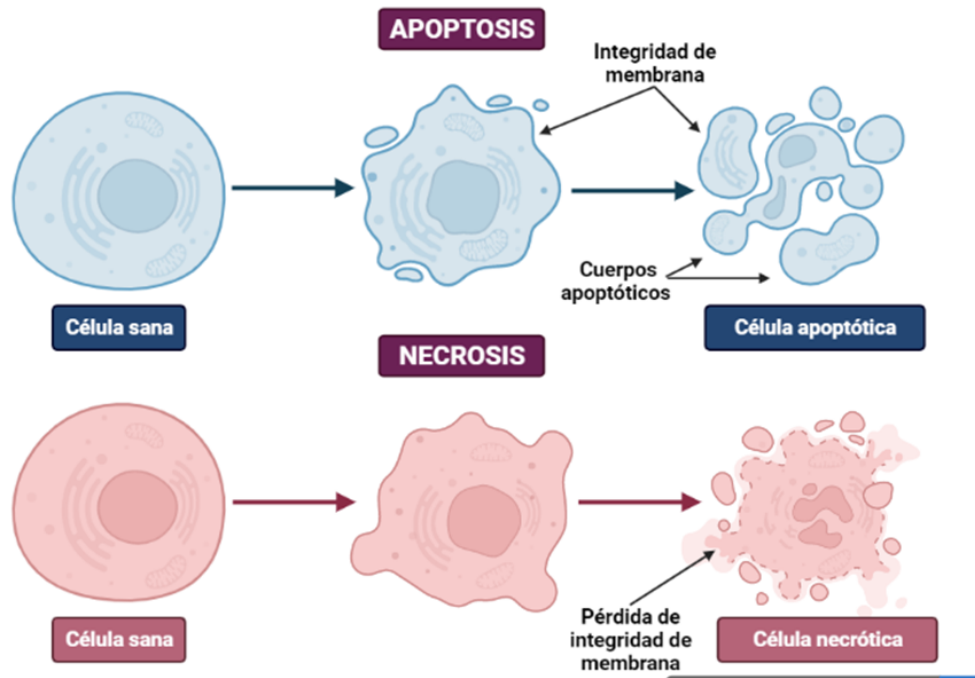


Figura 17. Mecanismo celular diferencial entre la muerte celular por apoptosis y necrosis. **A.** Mecanismo celular de la apoptosis, caracterizado por la aparición de cuerpos apoptóticos y el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. **B.** Mecanismo celular de la necrosis, del cual destaca la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. *Imagen elaborada con BioRender.*

CARACTERÍSTICAS	TIPOS DE MUERTE CELULAR	
	APOPTOSIS	NECROSIS
Finalidad de la muerte celular	Mecanismo de defensa	Muerte patológica tras daño celular grave
Mecanismo de muerte	Autodigestión de componentes celulares por proteasas endógenas	Hinchazón celular que termina lizando la membrana plasmática
Integridad de membrana	Sí	No
Liberación de contenidos intracelulares	No	Sí
Tipo de respuesta inmune	No inflamatoria	Inflamatoria

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

4.1. VÍAS QUE CONDUCEN A LA APOPTOSIS.

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 (**Figura 18**):

- 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**.

B) 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 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”). La formación de DISC resulta en la activación proteolítica del efector **Caspasa 3** y en la muerte celular.

C) 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**.

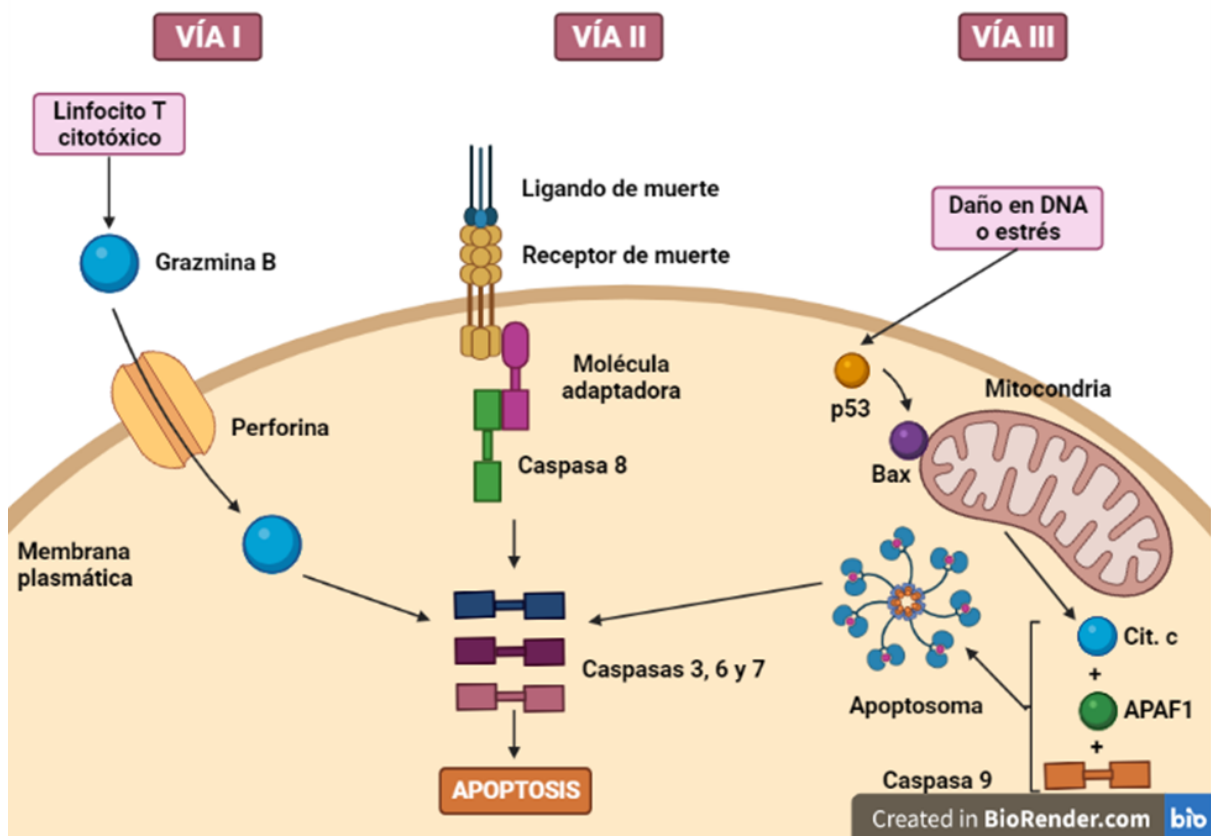


Figura 18. Principales vías que conducen a la apoptosis. Vía I: granzima B es secretada por células T citotóxicas, de manera que entra a las células diana con la ayuda de perforina y activa directamente a las caspasas efectoras, las cuales son responsables de la muerte celular por apoptosis. Vía II: la unión de un ligando de muerte (TNF/FasL) a su correspondiente receptor (TNF-R1/Fas) induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras (FADD, TRADD) lo que a su vez provoca la unión de la caspasa 8. El complejo completo es denominado DISC (*death-inducing signalling complex*). La caspasa 8 activa induce la rotura y activación de las caspasas efectoras, las cuales conducen a la apoptosis. Vía III: la vía mitocondrial es inducida por señales internas. El daño al DNA o el estrés conducen a la activación del gen supresor de tumores, p53. p53 recluta a un miembro pro-apoptóticos (Bax, Bad, Bid) de la familia Bcl de proteínas mitocondriales de membrana, seguido de una liberación del citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma, donde se une a APAF-1 y a Caspasa 9 para formar el apoptosoma. La activación del apoptosoma induce la activación de las caspasas efectoras, que llevan a cabo la muerte celular por apoptosis. *Imagen elaborada con BioRender y basada en Heussler et al. (2001).*

4.2. INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS.

Para prevenir la activación inapropiada de la apoptosis, las vías apoptóticas están reguladas por múltiples **mecanismos inhibidores o pro-supervivencia**. Muchos genes que codifican para proteínas inhibidoras de la apoptosis son regulados transcripcionalmente por el **factor de transcripción kappa B (NF-kB)**, “nuclear factor kappa B). Se ha visto que muchos patógenos intracelulares como los virus, bacterias y parásitos emplean la vía de activación NF-kB para prolongar la vida de sus células hospedadoras.

NF-kB es inducido por una gran variedad de estímulos extracelulares (proteínas inflamatorias) e intracelulares (patógenos). En las células no estimuladas, NF-kB es secuestrado en el citoplasma por la unión a su inhibidor **IkB**, quien enmascara la señal de localización nuclear de NF-kB. 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 IkB, también conocido como señalosoma **IKK**, es activado. Subsiguientemente, IkB es rápidamente fosforilado, ubiquitinado y degradado proteolíticamente, lo que permite que el NF-kB liberado se transloque al núcleo para regular la transcripción. NF-kB induce la expresión de genes cuyos productos (**Bcl-2**, **x-IAP**, **c-IAP**, **c-FLIP**) interfieren con las vías apoptóticas.

No relacionado con la inhibición mediada por NF-kB 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**.

La activación de la **PI3K** (*Phosphoinositide 3'-kinase*) también promueve la inhibición de la apoptosis. La PI3K activa fosforila al fosfatidil-inositol bifosfato (**PIP₂**) para forma **PIP₃**, que actúa

reclutando a la proteína quinasa B (PKB, también conocida como Akt) y a la quinasa 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 activan factores transcripcionales de la familia forkhead, que reprimen la transcripción de genes codificantes para proteína pro-apoptóticas como son **Bim** y **FasL** (**Figura 19**).

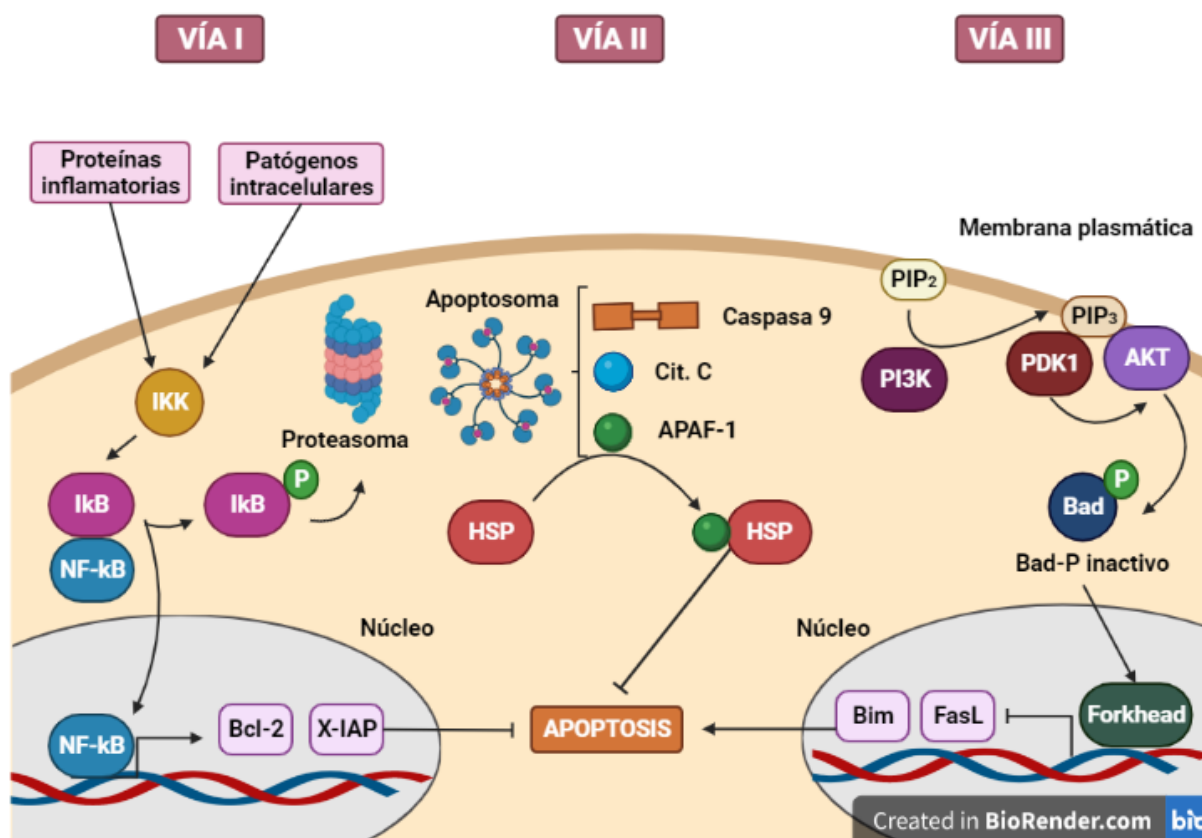


Figura 19. Mecanismos celulares implicados en la inhibición de la apoptosis. **Vía I:** de manera fisiológica, el factor de transcripción NF-κB se encuentra secuestrado en el citoplasma a través de la unión a su inhibidor, IκB. En respuesta a determinadas señales extracelulares (proteínas inflamatorias) o intracelulares (infección por patógenos), se produce la activación de la quinasa IKK, la cual fosforila a IκB, favoreciendo su degradación en el proteasoma. NF-κB queda libre, de manera que se transloca al núcleo e induce la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, x-IAP, c-IAP, c-FLIP). **Vía II:** el apoptosoma es un complejo molecular formado por citocromo C, APAF-1 y caspasa 9 que provoca la muerte celular apoptótica impulsada por la vía intrínseca. El secuestro de APAF-1 por proteínas de choque térmico (HSP) supone otro mecanismo de inhibición de la apoptosis. **Vía III:** la activación de la proteína PI3K provoca la fosforilación del PIP₂ de la membrana plasmática, obteniéndose PIP₃. PIP₃ es capaz de reclutar hacia la membrana a las proteínas PDK1 y AKT. PDK1 fosforila y activa a AKT, de manera que AKT a su vez es capaz de fosforilar e inhibir a Bad, una molécula pro-apoptótica. La inhibición de Bad permite la acción de los factores transcripcionales de la familia Forkhead, los cuales inhiben la expresión de Bim y FasL, inductores de muerte celular. Por tanto, se frena el mecanismo apoptótico. *Imagen elaborada con BioRender.*

4.3. PARÁSITOS QUE INTERFIEREN CON LAS VÍAS APOPTÓTICAS.

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.

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*.

En infecciones con *Trypanosoma cruzi* y *L. major*, se inhibe la apoptosis a través de inducir la expresión de HSP65 de la célula hospedadora.

La cruzipaina, un factor soluble producido por *T. cruzi* induce un aumento de Bcl-2, una proteína antiapoptótica (**Figura 20**).

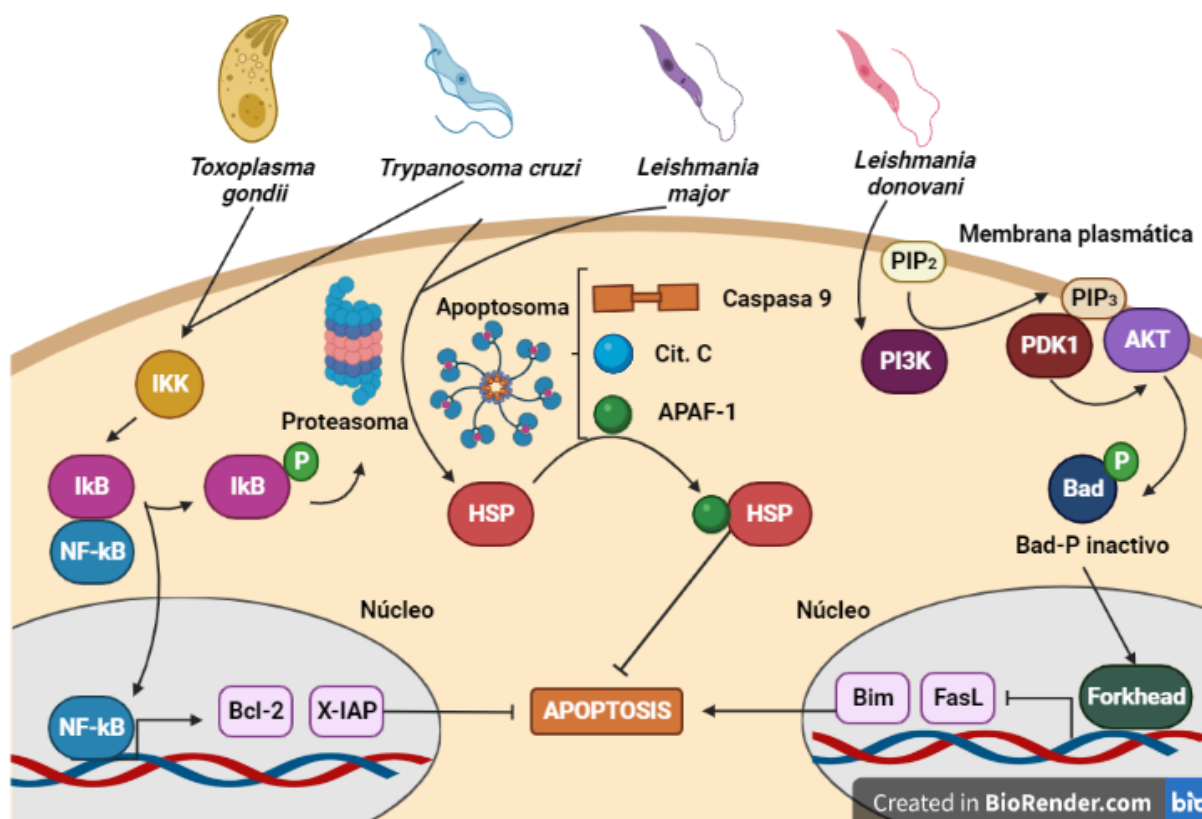


Figura 20. Mecanismos celulares inducidos por patógenos para inhibir la apoptosis de la célula hospedadora. Vía NF- κ B: inducida por los patógenos *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi*. Vía HSP: activada por los patógenos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*. Vía PI3K: impulsada por *Leishmania donovani*. Imagen elaborada con BioRender.

5. 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.

Sin embargo, existen muchas evidencias sobre la existencia de PCD en organismos unicelulares. 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.

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.

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 (**fagocitosis de parásitos apoptóticos**) secretan **citoquinas anti-inflamatorias**, tales como la IL-10 y TGF- β , que van a atenuar las respuestas inmunitarias frente al parásito.

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, sería con otro fosfolípido de *Leishmania*.

Una cuestión que queda por resolver es si la muerte de los parásitos es por un **proceso de apoptosis o de autofagia**. 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 21**).

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.

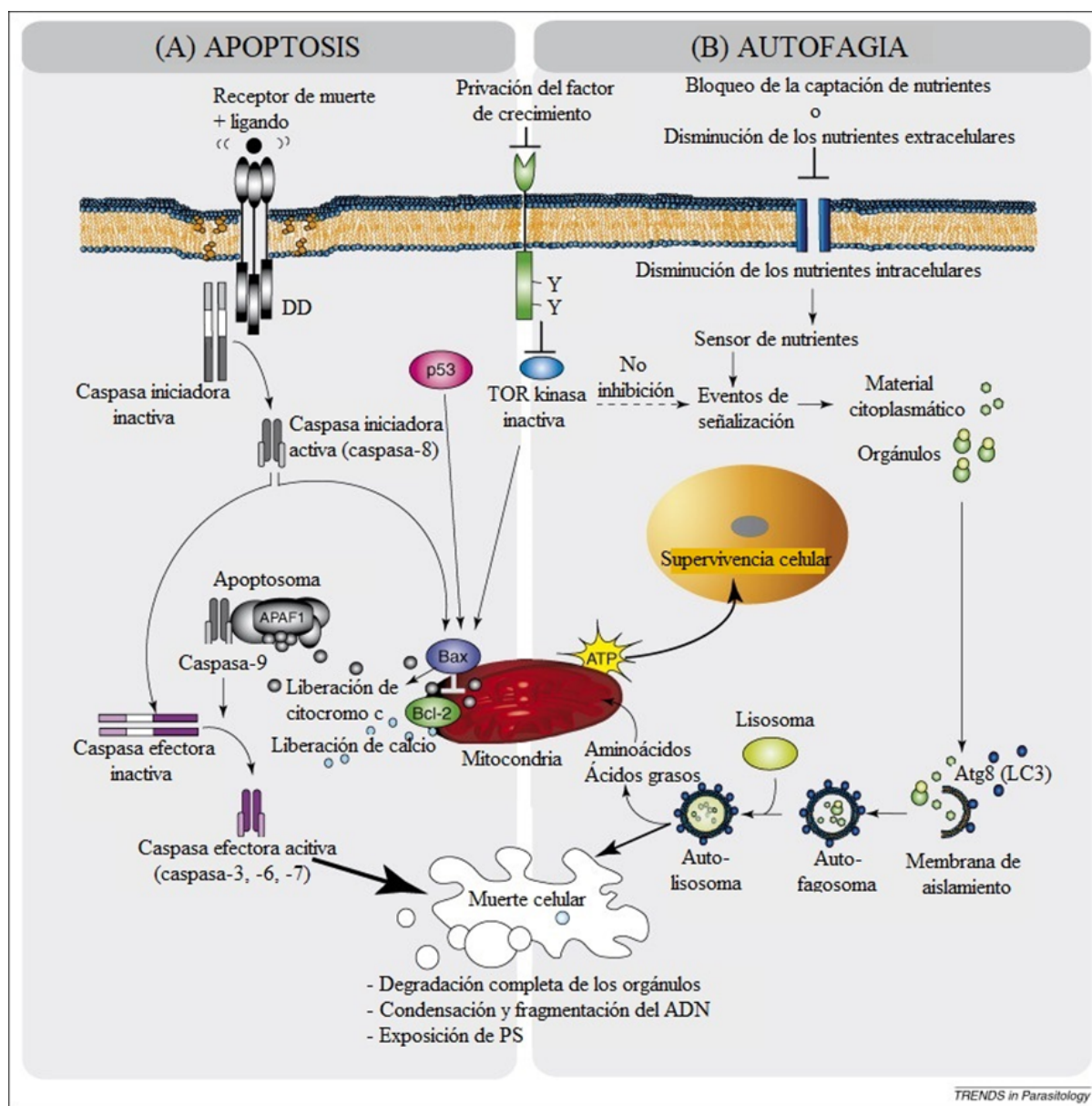


Figura 21. Comparación entre apoptosis y autofagia. (A) La **apoptosis** (PCD de tipo I) es un mecanismo irreversible y rápido (varias horas). Es un proceso eficaz para eliminar las células no deseadas a la vez que evita el inicio de la vía inflamatoria. Puede ser iniciada por estímulos extrínsecos que activan el receptor de muerte de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), como el TNF-R1, el TNF-R2 y el receptor Fas, o por la vía mitocondrial inducida por estrés intrínseco, es decir, por la acción de la proteína p53. La ausencia de señales de supervivencia, como los factores de crecimiento, también conduce a la apoptosis. La activación de la vía apoptótica en las células de mamíferos está controlada por un equilibrio entre los factores proapoptóticos (Bax) y antiapoptóticos (Bcl-2) de la familia Bcl-2. La activación de la cascada proteolítica mediada por caspasas es el punto de no retorno de la apoptosis. Tanto la vía extrínseca como la intrínseca conducen al procesamiento y a la activación de las caspasas iniciadoras (caspasa-8 y -9). Las caspasas iniciadoras activan las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7), que producen la escisión de sustratos ejecutando así la apoptosis. La apoptosis induce la liberación de citocromo c de las mitocondrias debido al aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. El citocromo c liberado, junto con Apaf-1 y la caspasa-9 forman un complejo proteico denominado apoptosoma, que conduce a la activación de la caspasa-9 y, posteriormente, a la activación de las caspasas efectoras. **(B)** La **autofagia** (PCD de tipo II) es un proceso lento y largo (varios días). La disminución de los nutrientes intracelulares o la ausencia del factor de crecimiento provocan la activación de los sensores de nutrientes y la inactivación de la TOR-kinasa. Esto induce cascadas de señalización que dan lugar a procesos autofágicos caracterizados por la formación de autofagosomas (vesículas de doble membrana) positivos para Atg8 (LC3). La autofagia implica el secuestro y la digestión del material citoplasmático y orgánulos celulares. La autodigestión ayuda a las células a sobrevivir proporcionando aminoácidos y ácidos grasos a las mitocondrias para la síntesis de ATP. Sin embargo, la autodigestión continua provoca la muerte celular. El fenotipo final de las células apoptóticas y autofágicas es similar, pero los acontecimientos moleculares durante los procesos son diferentes. *Modificado de Bruchhaus et al. (2007).*

6. 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 VEs 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 se ilustra en la **Figura 22**. 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. 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 22**).

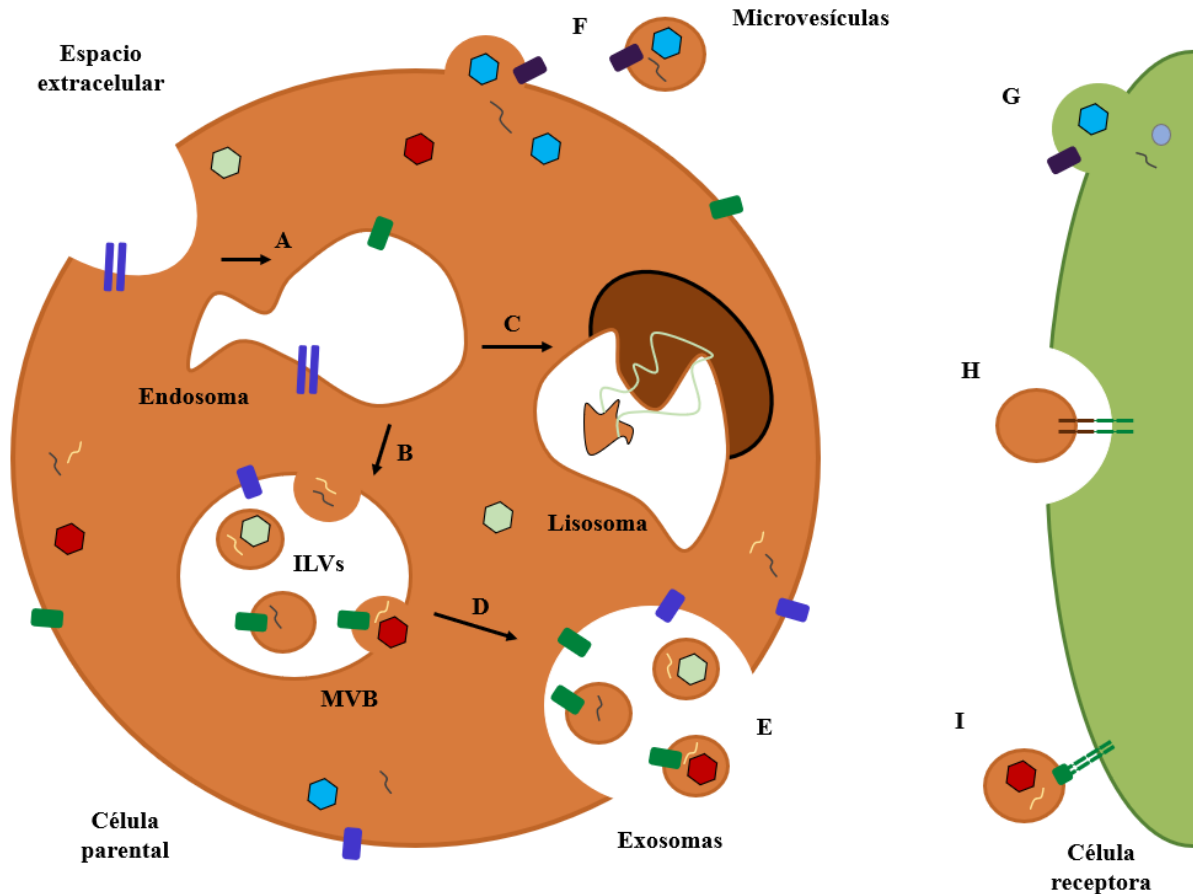


Figura 22. Biogénesis y transferencia de las diferentes vesículas extracelulares (VEs). A) El endosoma temprano se forma dentro de la célula parental, rodeado de varias moléculas bioactivas (ej. ácidos nucleicos, proteínas, lípidos; denotados en diferentes colores y/o formas). B) Durante el desarrollo del endosoma tardío, se producen una o varias gemaciones hacia el interior del endosoma para capturar algunos de los contenidos citosólicos de la célula hospedadora, produciéndose vesículas intraluminales (ILVs). El endosoma tardío también puede ser designado como cuerpo multivesicular (MVB). C) Algunos MVBs maduros se fusionan con el lisosoma, donde el contenido de la vesícula es degradado. D) Los MVBs también pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática, liberando sus ILVs (ahora conocidos como exosomas) en el espacio extracelular. E) Liberación de los exosomas al espacio extracelular. F) Otras microvesículas son liberadas al espacio extracelular a través de un proceso de gemación desde la membrana plasmática de la célula hospedadora. Hay, al menos, 3 mecanismos por el cual las vesículas extracelulares (VEs) interaccionan con las células receptoras: G) Fusión directa de la VE con la membrana plasmática de la célula receptora; H) Endocitosis mediada por receptor promovida por la interacción receptor – ligando entre las VEs y la célula receptora; y I) Activación de una vía de señalización intracelular por la interacción directa entre el ligando de las VEs y un receptor de superficie de la célula receptora. *Modificada a partir de Coakley et al (2015).*

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.

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 23**). 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.

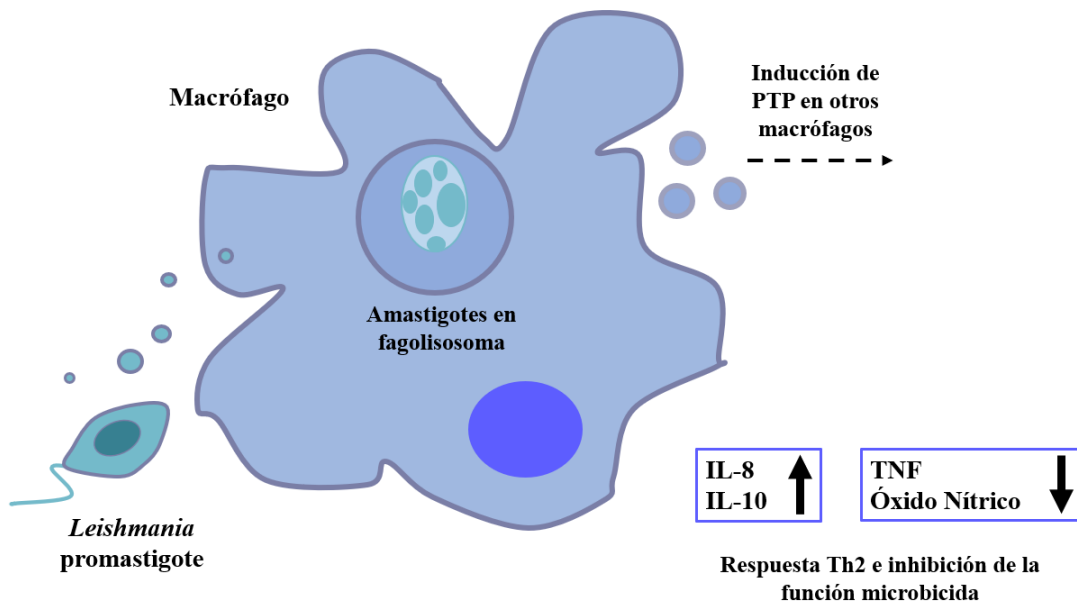


Figura 23. Los exosomas liberados por *Leishmania* modulan las propiedades inmunológicas de los macrófagos. Los promastigotes de *Leishmania* liberan exosomas que modifican las propiedades inmunológicas de los macrófagos con un aumento en la producción y liberación de IL-8 y IL-10, y una disminución de la liberación del factor necrótico tumoral (TNF) y óxido nítrico (NO), generando una respuesta Th2 y por lo tanto, inhibiendo la función microbicida de los macrófagos. Además, los macrófagos infectados por este parásito liberan exosomas con propiedades inmunomoduladoras a otros macrófagos, como la inducción de fosfatasa PTPs y cambios en la expresión génica. *Modificada a partir 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 (**Figura 24**). 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). Estos datos sugieren un papel de estas microvesículas en facilitar la multiplicación y diseminación del parásito.

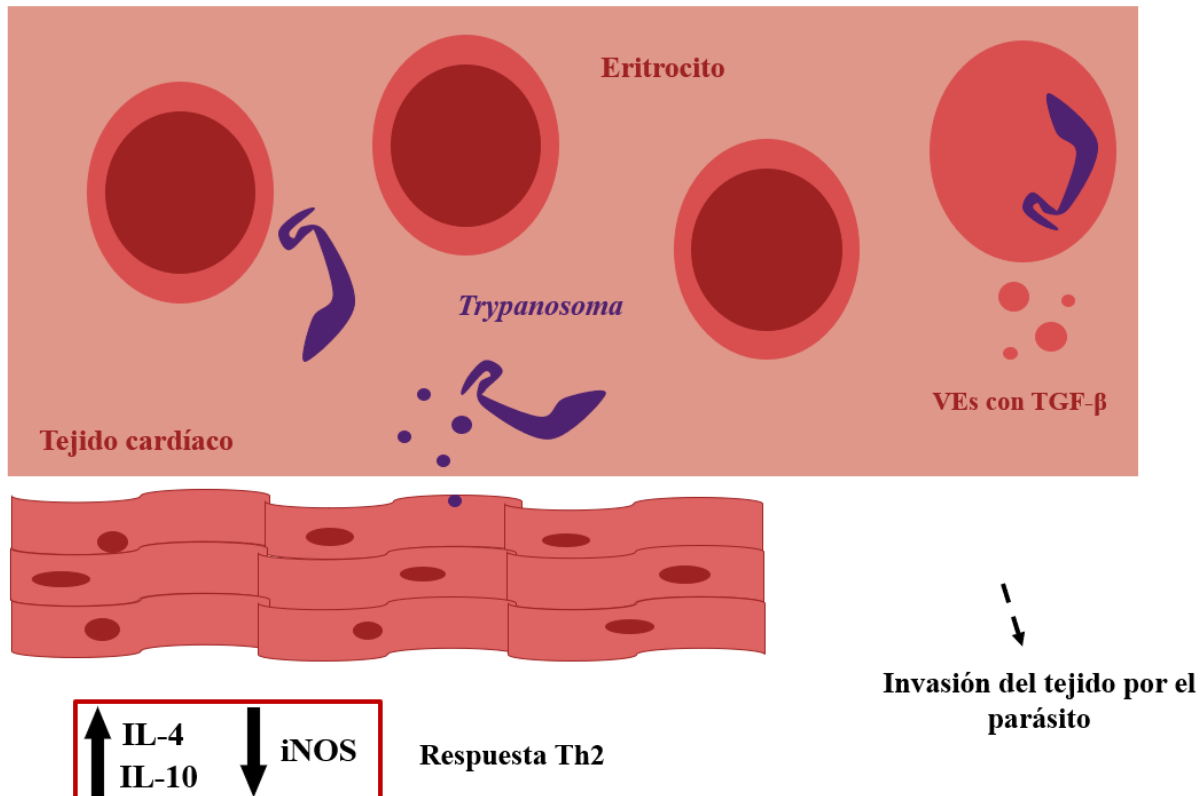


Figura 24. La liberación de exosomas por *Trypanosoma cruzi* facilita la invasión del tejido cardíaco. Este parásito, en su forma tripomastigote, libera microvesículas que promueven un aumento en la producción de IL-4 e IL-10, y una disminución de la actividad de la NO sintasa inducible (iNOS). Este cambio dirige la respuesta inmunitaria hacia el tipo Th2, favoreciendo la invasión del tejido cardíaco por el parásito. Los eritrocitos y linfocitos infectados liberan varias microvesículas que contienen el factor de crecimiento transformante β (TGF β), que facilita la invasión del tejido por el parásito. *Modificada a partir 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*, que producen microvesículas que contienen componentes de las hendiduras de Maurer como PTP2, esencial para la liberación de VEs por la célula hospedadora y su absorción por células receptoras. Una vez que las VEs son fagocitadas por monocitos, éstas van a inducir la

secreción de citoquinas inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6 e IL-12. Se postula que estas citoquinas podrían promover una activación de las células endoteliales para la expresión de moléculas de adhesión en su superficie y favorecer la interacción con los eritrocitos infectados, lo que aumentaría el secuestro de eritrocitos en la microvasculatura (**Figura 25**).

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 25**).

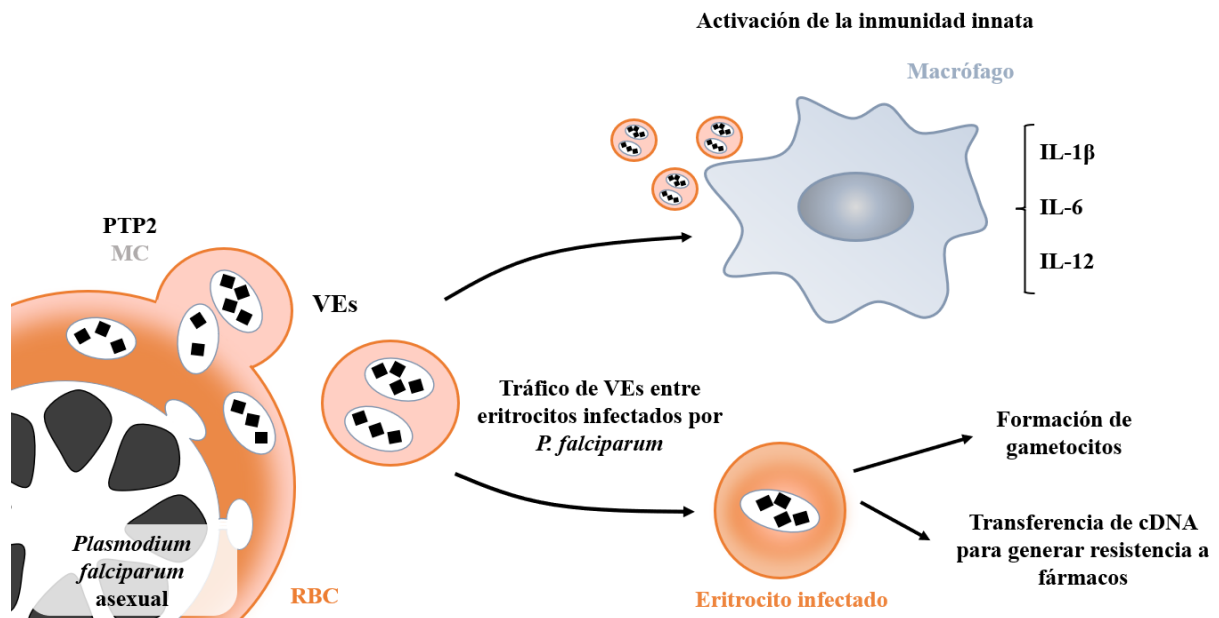


Figura 25. Liberación de VEs por *Plasmodium falciparum*. Las VEs producidas por *P. falciparum* contienen múltiples componentes de las hendiduras de Maurer (MC), de los cuales destaca PTP2 (esencial para la liberación de VEs y su absorción por las células receptoras). Estas VEs pueden ser fagocitadas por los macrófagos e inducir en ellos la secreción de citoquinas como IL-1 β , IL-6 e IL-12. Además, las VEs secretadas al medio extracelular pueden ser internalizadas en eritrocitos (RBC) infectados y promover la diferenciación del parásito recién llegado a la célula receptora en gametocitos; así como transferir DNA codificante para un marcador de resistencia a fármacos. *Modificada de Mantel & Marti (2014)*.

En el caso del parásito extracelular *Trichomonas vaginalis*, el cual provoca la Trichomoniasis, también se ha visto que libera exosomas como mecanismo de comunicación entre parásitos y parásito – hospedador (**Figura 26**). Estudios recientes han demostrado que *T. vaginalis* secreta VEs que

modulan la expresión de las citoquinas IL-6 y IL-8 por las células ectocervicales, limitando potencialmente la migración de neutrófilos y así, prevenir su eliminación.

Además, la preincubación con VEs puede aumentar la citoadherencia de los parásitos a las células epiteliales a través de la activación de un receptor. Se ha visto que las VEs liberadas a partir de cepas del parásito con una citoadherencia fuerte, como B7RC2, pueden interaccionar más fuertemente con las células ectocervicales; mientras que las VEs de cepas con una citoadherencia más débil, como la cepa de laboratorio G3, presentan un menor efecto de unión a dichas células. Los datos sugieren que las VEs contienen factores específicos de la cepa responsables del fenotipo diferencial de citoadherencia: si incubamos previamente las células ectocervicales con exosomas procedentes de la cepa con citoadherencia fuerte, éstos pueden inducir uniones más fuertes de las cepas con una citoadherencia más débil a dichas células. Esto mismo no se ha descrito en el caso inverso.

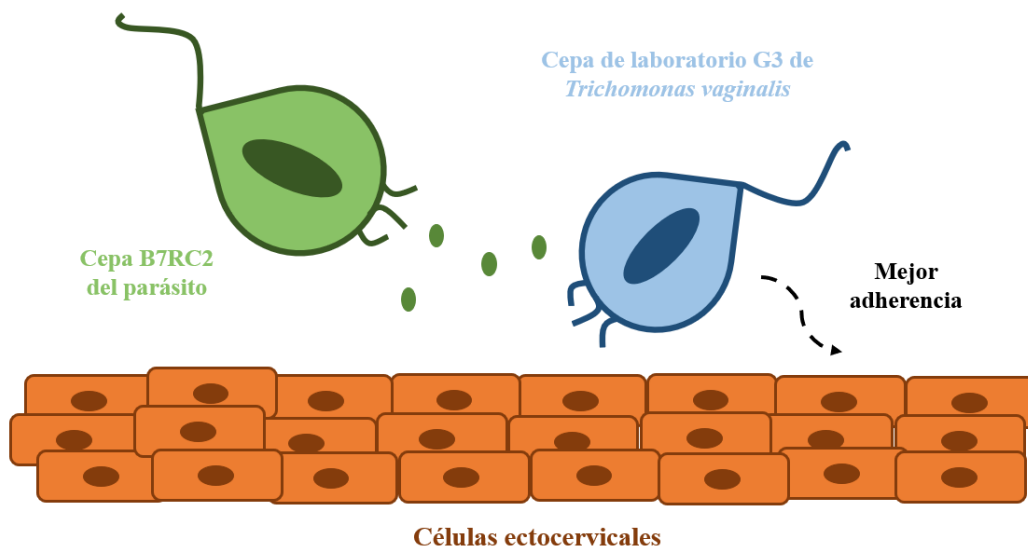


Figura 26. *Trichomonas vaginalis* secreta exosomas que promueven una mejor adherencia de las cepas más débiles a las células ectocervicales. Modificada a partir de Coakley et al (2015).

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.

REFERENCIAS

- Alphey, M. S., Leonard, G. A., Gourley, D. G., Tetaud, E., Fairlamb, A. H., & Hunter, W. N.** (1999). The high resolution crystal structure of recombinant *Crithidia fasciculata* trypanodexin-I. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25613–25622.
- Barrett, M.P., Kyle, D.E., Sibley, L.D., Radke, J.B. and Tarleton, R.L.** (2019). Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. *Nat. Rev. Microbiol.* 17: 607–620.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mantel, P. Y., & Marti, M.** (2014). The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cellular microbiology*, 16(3), 344-354.
- Pramanik, P.K., Alam, M.N., Roy Chowdhury, D., and Chakraborti, T.** (2019). Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival. *J Glob Antimicrob Resist* 18, 1–11.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

- BioRender (<https://biorender.com/>).
- Wikipedia (<https://es.wikipedia.org/>)