

03062

1
2
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Colegio de Ciencias y Humanidades

**Un mecanismo adquirido de transferencia de resistencia a la lisis
por complemento en *Entamoeba histolytica*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(BIOQUIMICA)**

PRESENTA

M. C. Laila Gutiérrez Kobeh

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez Montfort en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

Resumen

Summary

Abreviaturas

Capítulo I. Introducción

- I.1 Características generales de *Entamoeba histolytica*
- I.2 Patogenicidad y virulencia
- I.3 El sistema del complemento
 - I.3.1 La vía clásica
 - I.3.2 La vía alterna
 - I.3.3 Complejo de ataque a membranas
 - I.3.4 Anafilatoxinas
 - I.3.5 Proteínas reguladoras
 - I.3.5.1 Proteínas unidas por GPI
 - I.3.5.2 Inhibidores de la actividad de las convertasas
 - I.3.5.2.1 Factor acelerador del decaimiento
 - I.3.5.2.2 Proteína cofactor de membrana
 - I.3.5.2.3 Receptor del complemento tipo I
 - I.3.5.3 Inhibidores del MAC
 - I.3.5.3.1 Factor de restricción homóloga
 - I.3.5.3.2 CD59
 - I.3.6 Receptores del complemento
 - I.3.7 Biosíntesis de los componentes del complemento
 - I.3.8 Relaciones estructurales entre las proteínas del complemento
 - I.3.9 Participación en la modulación del sistema inmune
 - I.3.10 Complemento y enfermedad
 - I.3.11 Estrategias de evasión por parásitos
 - I.3.11.1 Estrategias pasivas
 - I.3.11.1.1 Protección por una membrana o pared
 - I.3.11.1.2 Falta de activación
 - I.3.11.1.3 Parásito como "propio" por imitación de epítopes del hospedero
 - I.3.11.2 Estrategias activas
 - I.3.11.2.1 Liberación de componentes unidos
 - I.3.11.2.2 Consumo de componentes
 - I.3.11.2.3 "Down regulation"

I.4 *Entamoeba histolytica* y el complemento

Objetivos

Capítulo II. Materiales y métodos

II.1 Metodología adicional

Capítulo III. Resultados

III.1 Resumen del artículo

III.2 Resultados adicionales

Capítulo IV. Discusión y conclusiones

Capítulo V. Bibliografía

Resumen

Algunas cepas de *E. histolytica* resisten la lisis mediada por complemento. Las diferencias en la resistencia al complemento en *E. histolytica* no radican en la activación del sistema, sino en el manejo del complejo de ataque a membranas (MAC). El objetivo de este trabajo fue investigar los posibles mecanismos de resistencia de *E. histolytica* al complemento. Preparamos la cepa resistente a suero humano (R) cultivando la cepa HM1: IMSS susceptible (S) en medio adicionado con suero. La diferencia en la lisis entre ambas poblaciones fue del 50%. La posibilidad de que la resistencia se debiera a la capacidad de las amibas R de ingerir los complejos de ataque a membranas fue probada por fraccionamiento subcelular de amibas de ambas cepas incubadas con suero adicionado con el último componente del complemento (C9) marcado con ^{125}I . En ambos casos la marca se encontró asociada principalmente a la membrana plasmática y las amibas S fijaron 2.5 veces más cpm que las R. La posibilidad de que esto se debiera a que las amibas R estaban eliminando el MAC por exocitosis fue explorada por exclusión molecular en Sepharosa CL 2B y se encontró que no existen diferencias en el material liberado al medio por ambas cepas incubadas en presencia de suero humano normal (SHN), suero humano deficiente en C9 (SHD9) o SHN adicionado con ^{125}I C9. El C9 radiomarcado eluyó junto con el pico principal de proteínas y esto indicó que no está asociado a vesículas.

Los trofozoítos susceptibles adquirieron resistencia por co-incubación con lisados de trofozoítos resistentes, lisados de eritrocitos humanos o eritrocitos

humanos en teros. Las amibas que adquirieron resistencia por alguno de estos métodos mostraron porcentos de lisis entre 20 y 40 a diferencia de 70 a 90 que presentaron las células susceptibles. Estas células resistentes mostraron un marcado fluorescente intenso con un anticuerpo anti-antígenos de membrana de eritrocitos humanos en relación a las amibas susceptibles. El logaritmo de la intensidad media de fluorescencia en las amibas R fue tres veces mayor que en las S. Al incubar amibas S por 48 h con eritrocitos radiomarcados se observó la incorporación de algunas proteínas de los eritrocitos a la superficie de la amiba, principalmente proteínas con pesos moleculares de 97, 78, 43 y 25 kDa. Estos resultados plantean un mecanismo novedoso de resistencia al complemento en *E. histolytica* donde la adquisición de moléculas reguladoras del huésped le permite resistir la lisis mediada por complemento.

Summary

Some *Entamoeba histolytica* strains resist complement mediated lysis. These differences in resistance to complement lysis do not reside in the activation, but in how the MAC is handled. The objective of this work was to investigate the possible mechanisms of resistance of *E. histolytica* to complement. We prepared resistant amebas to lysis by human serum culturing the susceptible strain HM1:IMSS with increasing concentrations of normal human serum. Resistant amebas showed 50% less lysis than susceptible ones. The possibility that resistant cells ingest MAC's was explored by subcellular fractionation of susceptible and resistant trophozoites incubated with serum and the last component of complement (C9) labeled with ^{125}I . In both cases the label was predominantly associated with fractions containing plasma membrane and susceptible amebas bound 2.5 times more cpm than resistant trophozoites. Thus, the possibility that the MAC's were released to the medium was explored by gel exclusion in Sepharose CL 2B and there were no differences in the material excluded by the two strains incubated with normal human serum (NHS), NHS deficient in C9 or NHS spiked with ^{125}I C9. Labeled C9 eluted, together with the main bulk of proteins from the medium, which indicated that it is not in vesicles.

Coincubation of susceptible trophozoites with lysates of resistant amebas, lysates of human erythrocytes or whole human erythrocytes made susceptible cells acquire resistance. Resistant amebas showed 20 to 40 percent lysis while susceptible amebas showed 70 to 90 percent. Also, these resistant trophozoites

Tabla I

Características de Entamoeba histolytica ¹

Morfología

Ausencia de mitocondrias y peroxisomas
Aparato de Golgi subdesarrollado

Compartimentalización funcional

Falta de diferenciación entre vacuolas digestivas y vesículas secretoras constitutivas
Comunicación estocástica e irrestricta entre membrana plasmática y vacuolas digestivas
Enzimas digestivas unidas a la membrana
Bomba de protones funcional de tipo vacuolar en la membrana plasmática

Metabolismo y proteínas

Ausencia de proteínas hémicas, ciclo de los ácidos tricarbóxicos y vía de las pentosas
Piruvato citoplásmico: ferredoxina oxidoreductas/ferredoxina
Cinasas dependientes de pirofosfato
Falta de regulación alostérica en glucólisis
Ausencia de la vía biosintética del glutatión
Actina altamente divergente
Ubiquitina altamente divergente
Sistema de ubiquitina subdesarrollado

Organización de DNA y RNA

Estructuración inusual de la cromatina y ausencia de histonas convencionales
rDNA en plásmidos extracromosomales circulares
Ausencia de intrones
Extremos 5' no traducidos en los mRNA extremadamente cortos

Cavalier-Smith en 1983 propuso un nuevo (sub)reino, Archezoa, para acomodar todos los organismos cuyos ancestros se ramificaron de la línea principal eucarionte antes de la incorporación de protomitocondrias. Aquí se incluyen *Entamoeba*, *Giardia* y *Varimorpha*.

¹ Tomada de Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993.

Abreviaturas

| | |
|-------------------------|--|
| CCP | secuencias repetitivas en proteínas control del complemento |
| cpm | cuentas por minuto |
| CR1 | receptor del complemento tipo 1 |
| CR2 | receptor del complemento tipo 2 |
| CR3 (Mac 1, CD11b/CD18) | receptor del complemento tipo 3 |
| CoVF | factor del veneno de cobra |
| C4bp | proteína que une C4 |
| DAF | factor acelerador del decaimiento |
| DGVB ⁺⁺ | amortiguador Veronal-salino adicionado con gelatina y dextrosa |
| EAC14b2a | eritrocitos sensibilizados con |
| EBV | virus Epstein-Barr |
| gc-1 y 2 | glicoproteínas de HSV |
| GPI | glicosilfosfatidilinositol |
| gp63 | glicoproteína de 63 kDa de <i>Leishmania</i> |
| HRF | factor de restricción homóloga |
| HSV | virus del herpes simple tipo 1 |
| ICAM-1 | molécula de adhesión |
| kDa | kilodaltones |
| LDL-A y B | lipoproteínas de baja densidad tipos A y B |
| LFA-1 | antígeno 1 con función asociada a linfocitos |
| LOG | promastigotes de <i>L. major</i> en fase logarítmica |

| | |
|----------------------|---|
| LPS | lipopolisacáridos |
| MP | promastigotes de <i>L. major</i> en fase estacionaria |
| MAC | complejo de ataque a membranas |
| MCP | proteína cofactor de membrana |
| GALNac | N-acetil-galactosamina |
| p150,95 (CD11c/CD18) | receptor a iC3b |
| PAGE-SDS | electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS |
| PIPLC | fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol |
| PNH | hemoglobinuria paroxística nocturna |
| R | <i>Entamoeba histolytica</i> resistente a suero humano |
| RCA | reguladores de la activación del complemento |
| S | <i>Entamoeba histolytica</i> susceptible a suero humano |
| SCR | secuencias repetitivas de consenso |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SHN | suero humano normal |
| SHD9 | suero humano deficiente en C9 |
| TRAP | proteína anónima relacionada a la trombospondina |
| VCP | proteína secretora de 42 kDa del virus vaccinia |

La reacción enzimática central de este sistema es el rompimiento del componente C3 en sus dos componentes primarios C3a y C3b. Esta ruptura provoca la exposición de un enlace tioéster que puede reaccionar con grupos amino o hidroxilo. La regulación del destino del C3b unido a las superficies celulares es uno de los pasos críticos en la distinción por parte del complemento entre lo propio y lo extraño. En una superficie activadora se da el fenómeno de amplificación donde el C3b actúa como el sitio de unión para el factor B, se forma la convertasa y permite el depósito de más C3b. Por el contrario, en una superficie no activadora se produce una inhibición por el rompimiento de C3b llevado a cabo por el factor I que rompe al C3b en los fragmentos C3c y C3dg.

1.3.1 La vía clásica

Esta vía se inicia por la activación del primer componente que es el complejo C1 formado por los subcomponentes C1q, C1r y C1s. El C1q es una de las proteínas del complemento más grandes con un peso molecular de 460 kDa y una forma inusual. Está formada por dieciocho cadenas polipeptídicas que consisten de un dominio corto amino terminal, una región con secuencia similar a la colágena y un dominio globular carboxilo terminal. Estas cadenas se asocian en grupos de tres para formar una subunidad que contiene una triple hélice tipo colágena y una cabeza globular hecha de tres módulos. C1q se une a una gran variedad de sustancias que actúan como activadores de la vía

Cuadro I

Características de *Entamoeba histolytica*¹

Morfología

Ausencia de mitocondrias y peroxisomas
Aparato de Golgi subdesarrollado

Compartimentalización funcional

Falta de diferenciación entre vacuolas digestivas y vesículas secretoras constitutivas
Comunicación estocástica e irrestricta entre membrana plasmática y vacuolas digestivas
Enzimas digestivas unidas a la membrana
Bomba de protones funcional de tipo vacuolar en la membrana plasmática

Metabolismo y proteínas

Ausencia de proteínas hémicas, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y vía de las pentosas
Piruvato citoplásmico: ferredoxina oxidoreductas/ferredoxina
Cinasas dependientes de pirofosfato
Falta de regulación alostérica en glucólisis
Ausencia de la vía biosintética del glutatión
Actina altamente divergente
Ubiquitina altamente divergente
Sistema de ubiquitina subdesarrollado

Organización de DNA y RNA

Estructuración inusual de la cromatina y ausencia de histonas convencionales
rDNA en plásmidos extracromosomales circulares
Ausencia de intrones
Extremos 5' no traducidos en los mRNA extremadamente cortos

Cavalier-Smith en 1983 propuso un nuevo (sub)reino, Archezoa, para acomodar todos los organismos cuyos ancestros se ramificaron de la línea principal eucarionte antes de la incorporación de protomitocondrias. Aquí se incluyen *Entamoeba*, *Giardia* y *Varimorpha* (Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993).

¹ Tomada de Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993.

I.2 Patogenicidad y virulencia

Se considera que *Entamoeba histolytica* es un patógeno de virulencia variable, en donde el grado de enfermedad que provoca varía considerablemente.² La pregunta del por qué sólo el 10% de los individuos infectados desarrolla la enfermedad ha llevado al cuestionamiento sobre si las amibas comensales y las invasivas son dos poblaciones diferentes o si el paso de un estado a otro es provocado por condiciones en el hospedero. Diferentes autores han mostrado que los trofozoitos comensales difieren en los patrones de movilidad electroforética de sus isoenzimas (zimodemos) de aquellos aislados de casos sintomáticos de amibiasis (Reeves y Bischoff, 1968; Sargeant y Williams, 1978, 1982; Sargeant et al., 1980, 1982). Estas dos poblaciones se llamaron inicialmente invasivas y no invasivas y posteriormente patógenas y no patógenas. Las amibas no patógenas nunca están asociadas con amibiasis invasiva, pero existen amibas patógenas en infecciones asintomáticas. En los últimos años se han descrito una serie de marcadores bioquímicos, inmunológicos y genéticos que diferencian a las dos poblaciones y no se modifican por el grado de virulencia. Ambas presentan una elevada divergencia en las secuencias de DNA, comparable a la observada entre genes humanos y murinos (Clark y Diamond, 1994). Estas diferencias entre las dos poblaciones han llevado a la reubicación de las dos cepas de amibas como especies

² Está basado en las definiciones de Gladstone donde describe la patogenicidad como la habilidad de producir enfermedad sin especificar las condiciones, mientras que la virulencia es la capacidad de producir enfermedad bajo condiciones específicas (Clark y Diamond, 1994).

diferentes. La especie *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 agrupa a las amibas patógenas y las no patógenas se nombran como *E. dispar* Brumpt, 1925 (Clark y Diamond, 1994).

I.3 El sistema del complemento

El sistema del complemento es un mecanismo de defensa temprana contra infecciones. Está formado por un conjunto de reacciones altamente integradas y controladas que combinan mecanismos primitivos de reconocimiento y funciones efectoras. Desempeña varias funciones en los organismos tales como: un incremento en la permeabilidad vascular, contracción de músculo liso, liberación de mediadores de células cebadas, localización de complejos inmunes en centros germinales, opsonización y fagocitosis, activación y quimiotaxis de neutrófilos y lisis de células, entre otras.

El sistema del complemento puede activarse por dos vías, la clásica o la alterna. En la vía clásica participan las proteínas C1, C2, C3 y C4 y en la vía alterna los factores B, D, H, I y C3. Ambas culminan en la vía membranolítica constituida por las proteínas C5, C6, C7, C8, y C9. Las características generales de la activación del complemento incluyen tres procesos que son activación por proteólisis limitada, transferencia de componentes de la fase fluida a la superficie de partículas biológicas y autoensamblaje de componentes que genera enzimas altamente específicas y complejos de ataque a membranas.

La reacción enzimática central de este sistema es el rompimiento del componente C3 en sus dos componentes primarios C3a y C3b. Esta ruptura provoca la exposición de un enlace triéster que puede reaccionar con grupos amino o hidroxilo. La regulación del destino del C3b unido a las superficies celulares es uno de los pasos críticos en la distinción por parte del complemento entre lo propio y lo extraño. En una superficie activadora se da el fenómeno de amplificación donde el C3b actúa como el sitio de unión para el factor B, se forma la convertasa y permite el depósito de más C3b. Por el contrario, en una superficie no activadora se produce una inhibición por el rompimiento de C3b llevado a cabo por el factor I que rompe al C3b en los fragmentos C3c y C3dg.

1.3.1 La vía clásica

Esta vía se inicia por la activación del primer componente que es el complejo C1 formado por los subcomponentes C1q, C1r y C1s. El C1q puede unirse a una gran variedad de sustancias que actúan como activadores de la vía clásica. Entre los mejor caracterizados se encuentran las inmunoglobulinas G y M en complejos inmunes, lipopolisacáridos (LPS) y porinas de bacterias Gram negativas y la proteína C reactiva unida a un ligando. La interacción del complejo C1 con complejos antígeno anticuerpo permite la activación de las proenzimas C1r y C1s. El C1s activado rompe al C4 en un solo sitio y se forman los fragmentos C4a y C4b (Arlaud et al., 1987; Schumaker et al., 1987). C4b

interacciona con C2, lo que provoca su ruptura y formación de la convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2a) que rompe al C3 en C3a y C3b.

1.3.2 La vía alterna

La vía alterna de activación del complemento representa un mecanismo de defensa natural contra agentes infecciosos. Entre los activadores de esta vía se encuentran bacterias, hongos, virus, células infectadas por virus, parásitos, algunas células tumorales, factores como el del veneno de cobra (CoVF), enzimas como la tripsina y complejos inmunes.

La iniciación de esta vía se da cuando el C3, modificado en el tioéster por agua, sufre un cambio y expresa una conformación y función del tipo C3b llamado C3i (Lachmann y Hughes-Jones, 1984; Pangburn y Müller-Eberhard, 1984). C3i se une al factor B en presencia de magnesio; el rompimiento subsecuente de B por el factor D forma una convertasa de C3 de la vía alterna que directamente puede romper al C3 en C3a y C3b. El depósito de C3b en las partículas activadoras permite la unión de éste al factor B para ser activado por el factor D y formar C3bBb que es también una convertasa de C3.

1.3.3 Complejo de ataque a membranas (MAC)

Las dos vías de activación del complemento confluyen en la formación del complejo de ataque a membranas que se inicia con el rompimiento del

estructurales entre ellas y con otras proteínas que interactúan con C3b o C4b, tales como el receptor 2 del complemento (CR2) y el factor H y C4bp. Presentan entre dos y treinta unidades con una estructura similar de aproximadamente 60 residuos llamadas secuencias repetitivas de consenso (SCR) o repeticiones de proteínas control del complemento (CCP). El SCR es una estructura fuertemente empaçada y mantenida por dos puentes disulfuro internos formados por cuatro residuos de cisteína invariables (Janatova et al., 1989). Las unidades SCR consecutivas están arregladas como un "rosario de cuentas", que proporciona una forma alargada y varios sitios funcionales importantes para las moléculas. El número de SCR difiere entre las moléculas; CR1 tiene 30 y DAF y MCP tienen 4. Están codificadas por tres genes localizados en posiciones cercanas en el brazo corto del cromosoma 1 (1q32), en donde junto a los genes para CR2, C4bp y factor H, forman la región RCA "reguladores de la activación del complemento" (Campbell et al., 1988; Hourcade et al., 1989). Todas estas moléculas menos CR2 presentan actividad inhibidora del complemento. Sus similitudes estructurales, así como sus posiciones cercanas en el genoma indican que esta familia de proteínas que unen C3/C4 surgieron por reduplicación génica a partir de un ancestro común (Morgan y Meri, 1994).

La inhibición de las convertasas por estos reguladores puede darse por dos mecanismos: aceleración del decaimiento de los complejos enzimáticos bimoleculares o promoción del rompimiento de la subunidad no catalítica (C3b o C4b) por el factor I. DAF y CR1 presentan actividad aceleradora del

decaimiento, disocian las subunidades C2a o Bb de las convertasas formadas y también pueden prevenir la asociación subsecuente de sus precursores procatalíticos C2 y B con C4b o C3b unidos a la membrana. Previenen la amplificación del C3 activado en la superficie celular. MCP y CR1 poseen actividad de cofactor para el rompimiento proteolítico de C3b o C4b. La enzima responsable es el factor I (inactivador de (C3b/C4b) que es una esterasa de serina que requiere ya sea al factor soluble H o a un cofactor unido a membrana (MCP o CR1). Una vez que C3b o C4b son rotos por el factor I ya no pueden formar convertasas de C3/C5 activas.

1.3.5.2 Factor acelerador del decaimiento (DAF; CD55³)

La primera descripción de una molécula inhibidora del sistema del complemento presente en estroma de eritrocitos fue hecha por Hoffmann en 1969 (Hoffmann, 1969). Posteriormente se aisló de eritrocitos de cobayo y humanos y por su habilidad de acelerar el decaimiento de EAC14b2a recibió el nombre de factor acelerador del decaimiento (DAF) (Nicholson-Weller et al., 1981; 1982). Es una glicoproteína con un peso molecular aparente de 70 kDa en SDS-PAGE (Nicholson-Weller et al., 1982). En leucocitos su peso es de 80 kDa, probablemente debido a una mayor glicosilación. Medof y cols. demostraron que DAF purificado puede incorporarse a eritrocitos heterólogos y conservarse activo (Medof et al., 1984). Está unida a la membrana por un ancla de

³ La segunda denominación de cada una de las proteínas reguladoras del complemento y receptores se refiere a la asignación de un número de diferenciación de leucocitos.

glicosilfosfatidilinositol (GPI) y también se encuentra en forma soluble en muchos fluidos corporales y no tiene la capacidad de incorporarse a membranas. El DAF unido a la membrana puede liberarse de ésta por tratamiento con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PIPLC). El DAF de eritrocitos presenta un enlace éster adicional por lo que no es sensible a PIPLC (Walter et al., 1990; 1992). El DAF liberado por PIPLC es hidrofílico y se parece al soluble. No se puede reinsertar en membranas, aunque es capaz de interaccionar con las convertasas de C3 de la fase fluida (Davitz et al., 1986; Medof et al., 1986). DAF está presente en la superficie de todas las células circulantes, células endoteliales y algunas epiteliales (Asch et al., 1986; Kinoshita et al., 1985). Hay evidencias que sugieren la presencia de pozas intracelulares (Shibata et al., 1991) y en eritrocitos la cantidad de DAF disminuye con la edad (Lutz et al., 1992).

1.3.5.3 Proteína cofactor de membrana (MCP; CD46)

Esta proteína se une a C3b y es cofactor del primer rompimiento mediado por I de C3b, pero no de los rompimientos subsecuentes. No presenta actividad aceleradora del decaimiento (Seya et al., 1986); más bien parece que su unión estabiliza la convertasa de C3 de la vía alterna (Seya et al., 1989). Está ampliamente distribuido en todas las células circulantes, con la excepción de eritrocitos. Migra en SDS-PAGE como dos bandas anchas con peso molecular aparente de 58-68 y 48-56 kDa, que difieren en el grado de glicosilación. No se

puede insertar espontáneamente en membranas biológicas, pero su actividad de cofactor está expresada también en la fase fluida. De hecho, el MCP de fase fluida es 50 veces más activo que el factor H. Sin embargo, su función principal parece ser la de un cofactor intrínseco, inactivando las convertasas de C3/C5 unidas a la membrana de la misma célula (Liszewski et al., 1991; Oglesby et al., 1992).

I.3.5.4 Receptor del complemento tipo 1 (CR1; receptor de C3b/C4b; CD35)

Es una glicoproteína polimórfica de membrana que une C3b y C4b. Actúa como cofactor del primer rompimiento mediado por I de C3b/C4b y también de los rompimientos subsecuentes de iC3b a C3c y C3d,g; también posee actividad aceleradora del decaimiento. Tiene mayor afinidad por C3b que por C4b lo que hace que inhiba la convertasa de la vía alterna más eficientemente que la de la vía clásica. Se distingue de MCP y DAF en que actúa sobre convertasas extrínsecas. CR1 *in vivo* participa en la unión a células fagocíticas de partículas opsonizadas con C3b y en el transporte de complejos inmunes en eritrocitos (Schifferli et al., 1986; 1989).

I.3.5.5 Inhibidores del complejo de ataque a membranas

Las células nucleadas poseen mecanismos de resistencia que rápidamente eliminan al MAC de sus membranas, lo que les permite sobrevivir al ataque. Cantidades sublétricas de MAC pueden activar células nucleadas

(Morgan, 1989;1992) y las puede hacer menos susceptibles al ataque del complemento (Reiter et al., 1992). También poseen proteínas reguladoras que interfieren con el ensamblaje del MAC, de las cuales se han descrito dos que son HRF y CD59.

I.3.5.5.1 Factor de restricción homólogo (HRF)

En la búsqueda de las moléculas responsables de la restricción homóloga descrita hace más de 80 años, tres laboratorios aislaron una proteína de aproximadamente 65 kDa de membranas de eritrocitos que inhibe la función de MAC (Zalman et al., 1986; Schönermark et al., 1986; Watts et al., 1987). En eritrocitos su peso molecular es de 65 kDa y entre 50 y 65 kDa en células nucleadas. Puede desprenderse mediante tratamiento con PIPLC de las membranas de linfocitos y monocitos, lo que indica que en estos tipos celulares está unida por GPI, y una vez purificado puede insertarse en membranas haciéndolas menos susceptibles a la lisis (Schönermark et al., 1986; Zalman et al., 1986). Existe HRF de fase fluida y se ha sugerido que puede tener la función de incorporarse en MACs formados en células heterólogas e inhibir la lisis (Watts et al., 1990). Se sabe que se une fuertemente al MAC en formación e inhibe la polimerización de C9 (Schönermark et al., 1986; 1988), aunque los detalles precisos de su acción inhibitoria no se conocen. Se ha reportado que HRF inhibe la lisis de células blanco por linfocitos citotóxicos (Zalman et al., 1987); además, se ha descrito una forma soluble de HRF en gránulos de

linfocitos citotóxicos lo que sugiere un papel de esta molécula en la regulación de la citotoxicidad (Zalman et al., 1988).

I.3.5.5.2 CD59

Esta proteína fue purificada por primera vez por Sugita en 1988 (Sugita et al., 1988) y posteriormente otros laboratorios reportaron el aislamiento de un inhibidor del complemento con un peso entre 18 y 20 kDa (Davies et al., 1989; Holguin et al., 1989; Okada et al., 1989; Whitlow et al., 1990). Es una glicoproteína de una sola cadena con un peso molecular entre 18 y 25 kDa. Es una proteína muy estable, ya que retiene su actividad durante largos periodos de almacenamiento, después de tratarla con tripsina y calentarla a 100 °C (Sugita et al., 1989), pero es muy sensible a agentes reductores. Los carbohidratos unidos al extremo amino terminal forman una estructura biantenaria requerida para la función inhibitoria (Ninomiya et al., 1992). El CD59 aislado de eritrocitos posee un ancla de GPI resistente a PIPLC debido a la acilación del inositol, mientras que el aislado de otras células es sensible.

I.3.6 Receptores del complemento

Muchas de las funciones en las que participa el sistema del complemento están mediadas por los receptores a los componentes del sistema. Estos receptores están expresados en una gran variedad de células y sus funciones

son de reconocimiento de ligandos, transducción de señales e inducción de respuestas celulares como fagocitosis. En la fagocitosis las partículas opsonizadas, es decir, cubiertas con anticuerpos y fragmentos del complemento, pueden unirse a células fagocíticas a través de los receptores CR1 y CR3. Esta unión activa ciertos mecanismos oxidativos, así como a la red de actina lo que permite englobar a las partículas.

CR3 (Mac 1; CD11b/CD18) y p150,95 (CD11c/CD18) son dos receptores del complemento y pertenecen a la familia de las integrinas. Estas proteínas conforman una familia de receptores membranales que coordinan una red de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Springer, 1990; Hemler, 1990). Estas moléculas junto con el antígeno 1 con función asociada a linfocitos, LFA-1; CD11a/CD18 comprenden una subfamilia de integrinas conocidas como las integrinas de leucocitos (Kishimoto et al., 1989) que comparten una subunidad β asociada en forma no covalente con cadenas α únicas. p150,95 está distribuida únicamente en células mieloides y una pequeña población de linfocitos T y B. Su función no está clara, pero estudios previos han sugerido que está involucrada en la unión de partículas opsonizadas con iC3b (Myones et al., 1988), en la adhesión de células al endotelio (Keizer et al., 1987 *a,b*; te Velde et al., 1987) y en adhesión de sustratos cubiertos con proteínas séricas (Anderson et al., 1986; Loike et al., 1991). Mac-1 está expresada principalmente en células mieloides y NK (natural killers) y es responsable de la adhesión de células mieloides a células endoteliales, neutrófilos, agregación homotípica y

fagocitosis por macrófagos de partículas extrañas que son opsonizadas por el complemento (Kishimoto et al., 1989). Mac-1 logra estas funciones mediante la unión a una gran cantidad de ligandos celulares y solubles tales como ICAM-1 (Smith et al., 1989; Diamond et al., 1990), iC3b (Beller et al., 1982; Wright et al., 1983), fibrinógeno (Altieri et al., 1988, Wright et al., 1988) y el factor X (Altieri y Edgington, 1988).

I.3.7 Biosíntesis de las proteínas del complemento

La mayor parte de las proteínas plasmáticas del complemento son sintetizadas en el hígado. Otras son producidas y secretadas localmente por células como los macrófagos en el sitio de la lesión.

Muchos componentes del complemento se sintetizan como una sola cadena polipeptídica y posteriormente son procesados a moléculas formadas por varias subunidades como es el caso del C3, C4, C5 y el factor I. Por ejemplo, el C4 se forma a partir del pro C4 y los pasos involucrados en este procesamiento incluyen formación del tioéster interno, formación de puentes disulfuro, cortes y remoción de fragmentos.

I.3.8 Relaciones estructurales entre las proteínas del complemento

Dentro del sistema del complemento, muchas de las proteínas se encuentran relacionadas estructuralmente entre ellas y con otras proteínas. Todas las enzimas que participan en la activación de las vías del complemento

pertenecen a la familia de las proteasas de serina de mamíferos; comparten un dominio de aproximadamente 23 kDa de peso molecular con una triada característica en el sitio activo formada por los residuos de His, Asp y Ser en las posiciones 57, 102 y 195 respectivamente. Los componentes del complemento C2, C4 y el factor B se encuentran codificados dentro del complejo mayor de histocompatibilidad en la región definida como clase III entre las proteínas de clase I y las de clase II. El componente C4 presenta dos isotipos, el C4A y C4B. Estos están codificados por dos genes diferentes y existen diversos alotipos.

Los componentes del complemento C1r, C1s, C7, C8 y C9 presentan unidades estructurales homólogas ricas en cisteínas que se denominan LDL-A y LDL-B porque fueron descubiertas en receptores a lipoproteínas de baja densidad.

Las homologías entre los diferentes componentes del complemento y su relación con otras proteínas han revelado información muy valiosa sobre el origen y evolución de este sistema. La forma ancestral de la vía alterna del complemento se originó probablemente como un sistema inmune primitivo e independiente. La evolución subsecuente de una respuesta inmune adaptativa llevó a la especialización de la vía clásica para conectar el reconocimiento mediado por anticuerpos con los mecanismos efectores dependientes del complemento.

Existe evidencia circunstancial que señala la presencia de una vía alterna primitiva en algunos invertebrados celomados, en ciclostomos se han

encontrado componentes equivalentes al C3. La vía clásica y componentes terminales se piensa que se originaron en peces cartilaginosos. En la evolución del sistema del complemento han participado mecanismos genéticos como duplicación génica, duplicación intragénica y cortes y fusión de exones. La duplicación génica es particularmente evidente en la evolución de las moléculas clase III del complejo mayor de histocompatibilidad. La duplicación intragénica ha sido un mecanismo importante en la evolución de las proteínas RCA (Farries y Atkinson, 1991).

1.3.9 Participación en la modulación del sistema inmune

El sistema del complemento, particularmente el C3, juega un papel modulador muy importante en la respuesta inmune. Los productos del rompimiento del C3 facilitan la cooperación entre células inmunocompetentes y son moléculas coestimuladoras en la activación de los linfocitos T y B. Las moléculas de C3b pueden promover la interacción entre una célula presentadora de antígeno y un linfocito T ayudador mediante la formación de un puente no antígeno específico. El efecto citolítico de células K y NK se ve significativamente aumentado por fragmentos de C3 y receptores. El C3 también participa en el desarrollo de linfocitos B de memoria y formación de células plasmáticas (Erdei et al., 1991).

1.3.10 Complemento y enfermedad

El estudio de las deficiencias de algunas proteínas del complemento ha proporcionado acercamientos importantes sobre el papel fisiológico del sistema del complemento *in vivo*. Las deficiencias en las distintas proteínas que participan en el complemento están asociadas a patologías como infecciones piogénicas, enfermedades por complejos inmunes, angioedema y hemoglobinuria paroxística nocturna. En general, las deficiencias en proteínas de una misma vía causan problemas crónicos similares.

En la actualidad, la imagen del sistema del complemento es mucho más compleja y elegante de lo que se pensaba anteriormente, ya que además de ser un mecanismo de defensa juega un papel central en la regulación del sistema inmune.

1.3.11 Estrategias de evasión de microorganismos al complemento

El establecimiento de un patógeno intracelular obligado en un huésped susceptible requiere de la evasión de los diferentes mecanismos de defensa antes, durante y después de la entrada a las células del hospedero. Los determinantes de virulencia que permiten la evasión de tales defensas están generalmente regulados en los microorganismos a lo largo de su desarrollo, lo que representa una forma de adaptación en el ambiente inmunológicamente hostil del huésped (Hall y Joiner, 1991).

En general los mecanismos de evasión del complemento se basan en impedir la activación, opsonización o lisis del patógeno. Los microorganismos

carecen de proteínas reguladoras del complemento por lo que no pueden restringir su depósito y amplificación en sus superficies. Algunos agentes infecciosos poseen moléculas o estructuras que impiden el acceso de las proteínas reguladoras del plasma. La mayoría de las bacterias, virus, hongos y parásitos activan al complemento por la vía alterna debido a la ausencia de moléculas reguladoras del complemento, ocasionalmente acoplada con la presencia de C3b en una superficie "protegida" inaccesible a los factores H e I. Además, algunas bacterias y virus pueden activar la vía clásica en ausencia de anticuerpos evadiendo la regulación llevada a cabo por el inhibidor de C1. Esta activación y amplificación descontroladas, que llevan a la acumulación de grandes números de moléculas de C3b y convertidas de C3 y C5 son incompatibles con la sobrevivencia del parásito. Sin embargo, los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias para evadir la destrucción mediada por complemento.

I.2.11.1 Interferencia con la activación

Muchas bacterias presentan cápsulas que son antifagocíticas, ya que físicamente previenen el acceso de los fagocitos al C3b depositado en la pared celular de las bacterias Gram positivas y negativas (Joiner, 1988). Además, son malos activadores del complemento debido a la presencia de ácido siálico (Joiner, 1988).

Diversos patógenos han desarrollado moléculas con propiedades funcionales idénticas a las usadas por células normales de mamíferos para prevenir la destrucción mediada por complemento como la capacidad de desensamblar las convertasas de C3 o de actuar como cofactores del rompimiento del C3b unido por el factor I. Se han identificado una serie de moléculas, algunas con similitud estructural y genética con proteínas de mamíferos y otras no.

a) Molécula parecida a CR1 con función de unión a C3b en el virus del herpes simple tipos I y III, esta acción es llevada a cabo por las glicoproteínas gc-1 y gc-2, y esta unión a gc-1 es bloqueada por un anticuerpo monoclonal anti CR1. Gc-1 acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía alterna, existe cierta similitud estructural entre gc-1, gc-2 y CR1, aunque no tiene regiones SCR presentes en CR1, CR2, DAF y MCP. Hay también diferencias en actividad entre CR1 y gc-1, ya que este último no acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía clásica ni posee actividad de cofactor hacia el factor I. La presencia de gc-1 protege contra la neutralización mediada por complemento de HSV-1 *in vitro*.

El virus Epstein-Barr (EBV) también posee actividad reguladora del complemento. El virus purificado acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía alterna y puede funcionar como cofactor del rompimiento mediado por I de C3b, iC3b y C4. Las actividades del virus son similares a CR1, pero

difieren en que EBV no une C3b y no acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía clásica. Las moléculas de EBV involucradas en la regulación del complemento no han sido identificadas.

La principal proteína secretora del "vaccinia virus" posee actividad reguladora del complemento. Esta proteína está compuesta de cuatro secuencias cortas repetitivas de consenso arregladas en "tandem" con cierta similitud a las SCR presentes en C4bp. Esta proteína une C4b con lo que previene la formación y acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía clásica.

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, posee un ciclo de vida entre un vector invertebrado y un huésped mamífero. El epimastigote es la forma no infectiva y es lisado por complemento (Nogueira et al., 1975). Las formas metacíclicas y tripomastigotes, que son infectivas para el huésped mamífero resisten la lisis por complemento y unen menos C3 al incubarlos en suero no inmune (Kipnis et al., 1981; Joiner et al., 1986; Schenkman et al., 1986; Rimoldi et al., 1988). En suero inmune de animales infectados si se observa lisis (Krettli y Brener, 1982). Aunque se requieren anticuerpos para la lisis mediada por complemento, ésta procede principalmente por la vía alterna y es antígeno específica (Kierszenbaum, 1976; Krettli et al., 1979; Kipnis et al., 1985). Existe unión de C1q, pero no está asociada con una activación convencional de la vía clásica (Rimoldi et al., 1989).

Los mecanismos de resistencia al complemento en los tripomastigotes de *T. cruzi* pueden ser multifactoriales y diferentes laboratorios han descrito moléculas reguladoras del complemento producidas por tripomastigotes que limitan la activación del complemento en una fase temprana (Joiner et al., 1986; Kipnis et al., 1986; Rimoldi et al., 1988; Fischer et al., 1988; Norris et al., 1989; Sher et al.; 1986). Estas moléculas reguladoras son de diferente peso molecular, pero muestran un solapamiento funcional considerable; todas inhiben la formación o aceleran el decaimiento intrínseco de las convertasas de C3, lo que bloquea la activación del complemento en la superficie del parásito. La glicoproteína de 87-93 kDa de los tripomastigotes de las cepas M88 eY exhibe una función análoga al DAF de mamíferos y presenta un 40-50% de similitud con ésta, basado en datos de determinación parcial de la secuencia de aminoácidos (Tambourgi et al., datos no publicados, tomado de Hall y Joiner, 1991). La glicoproteína gp-160, que está regulada durante el desarrollo en el tripomastigote, une C3b y bloquea la formación de la convertasa de C3 de la vía alterna. Esta proteína es funcional y genéticamente similar a DAF y la secuencia parcial de nucleótidos ha revelado dos regiones con similitud a SCR (Norris, 1991). Está unida a la membrana por GPI y el ancla se mantiene después de su purificación. La forma soluble tiene un peso molecular de 160 kDa y la unida a membrana pesa 185 kDa (Norris y Schrimpf, 1994). El epimastigote de *T. cruzi*, que es la fase presente en el vector es susceptible al complemento y no posee gp-160. Los blancos específicos para los anticuerpos anti-*T. cruzi* que apoyan la

lisis mediada por complemento pueden ser las mismas moléculas en la superficie del parásito que interfieren con las convertasas de C3. Los anticuerpos específicos pueden bloquear esa actividad y hacer a los parásitos susceptibles a la lisis por complemento, limitando o previniendo la parasitemia.

En el helminto parásito *Schistosoma mansoni* la activación de la vía alterna del complemento está regulada en una forma especie específica. Los parásitos jóvenes activan al complemento fuertemente, mientras que esquistosomas de mayor edad recobrados de la vasculatura del huésped no activan al complemento homólogo, pero sí ^{al} de suero de organismos distintos al huésped. La membrana del parásito presenta una molécula con actividad de DAF. Esta molécula es derivada del huésped y se piensa que es absorbida e insertada en las membranas del parásito y esto le permite evadir la destrucción mediada por la activación de la vía alterna del complemento. La idea de que el componente similar a DAF en *Schistosoma* es derivado del huésped está apoyada por la observación de que anticuerpos monoclonales (1A10) y policlonales (RaDAF.2) contra DAF humano no se unen o se unen débilmente a parásitos recobrados de ratón. Además, Rasmussen y Kemp (1987) demostraron que aunque no hay depósito de C3 en la superficie de los parásitos recientemente recuperados de ratón, si hay activación de la vía alterna del complemento si se da un tratamiento previo que elimine los componentes del huésped adsorbidos por la superficie del parásito.

1.2.11.2 Mecanismos para resistir el ataque del MAC.

Las bacterias Gram positivas activan al complemento y los complejos C5b-9 se ensamblan en su superficie, pero son resistentes a la lisis porque la gruesa capa de peptidoglicanos restringe el acceso de C5b-9 a la membrana plasmática. Las bacterias Gram negativas que son resistentes al suero son más virulentas que las sensibles. Ambas en presencia de anticuerpos bactericidas activan al complemento eficientemente a través de C9 y por estudios con *Salmonella* y *Escherichia coli* se observó que el C5b-9 no se inserta en los dominios hidrofóbicos de la membrana externa y es liberado. En las cepas resistentes al suero, la activación del complemento ocurre en los lipopolisacáridos (LPS) con largas cadenas O por lo que el C5b-9 se genera a una distancia considerable de la membrana externa, por lo que su inserción es pobre y existe un impedimento estérico para ganar acceso a la membrana. En las cepas sensibles al suero, la unión de C3b y el ensamblaje de C5b-9 ocurre en los LPS con cadenas O cortas. En *Neisseria*, la cepa resistente a suero y la sensible se diferencian en la inserción del C5b-9, algo similar ha sido reportado en amastigotes de *T. cruzi* (Iida et al., 1989).

La resistencia al complemento en *Leishmania* está regulada durante su desarrollo. Los promastigotes de *Leishmania major* crecidos *in vitro* a la fase logarítmica (LOG) son susceptibles al suero y no infectivos, mientras que una subpoblación de promastigotes de cultivos en fase estacionaria (MP) son

resistentes al suero y altamente infectivos. Ambas poblaciones activan al complemento y consumen los componentes terminales eficientemente. Sin embargo, en MP el complejo C5b-9 no se inserta en la membrana del parásito, se desprende y no provoca lisis. Este mecanismo optimiza la entrada de los parásitos a los macrófagos del huésped vía CR1 (Puentes et al, 1990). No obstante estas diferencias en susceptibilidad, todos los estadios de *Leishmania* unen C3, pero la forma y el destino de éste depende de la especie de *Leishmania* involucrada (Puentes et al., 1988; Mosser et al., 1986).

El estadio intracelular replicativo de *T. cruzi*, el amastigote, se encuentra principalmente dentro de las células del huésped, donde se multiplica, pero también pueden entrar a la circulación. Está reportado que puede sobrevivir extracelularmente e iniciar la infección *in vitro* (Ley et al., 1989). En contraste a los tripomastigotes, los amastigotes activan al complemento eficientemente por la vía alterna uniendo grandes cantidades de C3 y C5b-9 estable. Sin embargo, son resistentes a la lisis ya que los complejos terminales no se insertan en la membrana para formar canales funcionales (Iida et al., 1989). Una posible explicación a este fenómeno es la presencia de un inhibidor membranal estadio-específico que regule la formación de los canales. En un intento por buscar la presencia de estos inhibidores en la superficie del parásito, se probaron una serie de anticuerpos monoclonales contra moléculas de superficie de amastigotes. Uno de estos, Mab M4C12, indujo lisis mediada por complemento detectada con un ensayo con ^{86}Rb presenta una proteína que

cruza con un anticuerpo anti C9 y aparentemente posee actividad formadora de poros. Se ha postulado que este homólogo de C9 participa en el paso del parásito de las vacuolas al citosol.

Los tripomastigotes infectivos de *T. brucei* activan el complemento en forma más eficiente, con depósito de C3 en la superficie del parásito, pero el C3 unido es roto rápidamente a una forma inactiva lo que impide el ensamblaje adecuado del complejo de ataque a membranas (Devine et al., 1986; Sturtevant et al., 1987).

La superficie del estadio extracelular infectivo de *Toxoplasma gondii*, el taquizoíto, muestra pocas proteínas iodables, está pobremente glicosilada y es muy ineficiente en la activación del complemento en suero no inmune. Sin embargo, los taquizoístos evaden la acción del complemento limitando el depósito de C3 y convirtiendo rápidamente el C3 unido a la forma inactiva C3_{bi}, lo que inhibe la continuación de la cascada del complemento (Fuhrman y Joiner, 1989). Al igual que los tripomastigotes de *T. cruzi*, los taquizoístos de *T. gondii* unen C1q al incubarlos con suero (K. Joiner, datos no publicados, tomado de Hall y Joiner, 1991). Sin embargo, la eficiencia en la activación del complemento en presencia de anticuerpos específicos es mucho mayor. La interacción de los anticuerpos con los receptores de la superficie celular pueden provocar mecanismos microbicidas.

1.2.11.3 Otros mecanismos de inhibición del complemento

Las paramiosinas de una gran cantidad de invertebrados inhiben, in vitro, la vía clásica del complemento a través de la inhibición de C1 a través de la inhibición de la función de C1. Se ha mostrado que la paramiosina de *Taenia solium* se une a C1q, lo que inhibe la función de C1. La inhibición del complemento puede no sólo prevenir el daño del parásito mediado por anticuerpos, sino que puede también disminuir el reclutamiento local de mediadores del complemento y contribuir a una disminución en la respuesta inflamatoria (Laclette et al, 1992).

I.3.11.4 Evasión durante la entrada a la célula

La fagocitosis de microorganismos está frecuentemente asociada con la generación de productos tóxicos del oxígeno. Una estrategia para poder entrar a una célula es utilizar un receptor cuya unión no esté asociada con un estallido respiratorio. Alternativamente, los parásitos intracelulares obligados pueden deshacerse de los metabolitos tóxicos o invadir células incapaces de montar un estallido respiratorio.

I.3.11.4.1 Utilización de receptores del complemento para iniciar la infección

Muchos microorganismos no sólo evitan la inactivación y destrucción por el complemento, sino que también utilizan los receptores del complemento para iniciar la infección. En algunos casos se ha visto que esto se debe a la

presencia de epítopes similares al complemento que permiten la unión al receptor en el organismo. La unión más frecuente a los receptores del complemento es a través de fragmentos de C3 unidos covalentemente a los microorganismos como consecuencia de la activación del complemento. La adaptación exitosa a este proceso requiere de regulación en el procesamiento enzimático de C3 en la superficie del parásito; por ejemplo, un organismo que utiliza CR1 para entrar a una célula debe de alguna forma impedir el rompimiento del C3b depositado a iC3b y C3dg.

El EBV infecta a la célula B a través de CR2. Se piensa que los sitios de unión para el virus y para el ligando natural del complemento que es C3dg son o estructuralmente idénticos o están localizados muy cerca uno del otro, ya que varios anticuerpos monoclonales anti CR2 tienen los mismos efectos sobre el virus que sobre la adhesión de C3dg a las células. Diversos estudios han mostrado que la unión de EBV a CR2 está mediada por un epítope de nueve amino ácidos localizado en el extremo amino terminal de la principal glicoproteína externa del virus.

Histoplasma capsulatum también infecta a los macrófagos a través de CR3 y p150,95 en ausencia de complemento. Los datos indican que estos microorganismos poseen epítopes tipo C3 que participan en la adhesión a CR3.

Babesia rodhoni, que activa al complemento, entra a los eritrocitos a través de CR1; los merozoítos de *Plasmodium* pueden iniciar la infección en forma similar. Bacterias patógenas como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium leprae*, y

Mycobacterium tuberculosis se dividen en los fagocitos mononucleares, activan al complemento e inician la infección de las células a través de CR1 y CR3

Leishmania spp fija complemento directamente de suero no inmune (Mosser y Edelson, 1984b; Puentes et al., 1988) y esto favorece su entrada y sobrevivencia dentro del macrófago (Mosser y Edelson, 1987). Posteriormente a la incubación de los parásitos en suero, los principales receptores que median la captación celular corresponden a aquellos que unen la forma predominante de C3 presente en la superficie del parásito. Este aumento en la captación se ve fuertemente disminuído por anticuerpos monoclonales anti CD11b (Blackwell et al., 1985; Mosser y Edelson, 1985). El CR3 en macrófagos murinos ha sido implicado en la entrada de diferentes especies de *Leishmania* (Blackwell et al., 1985; Mosser y Edelson, 1985; Cooper et al., 1988) y en macrófagos humanos facilita la entrada de promastigotes de *L. donovani* (Wilson y Pearson, 1988), que principalmente llevan C3bi después de la incubación en suero (Puentes et al., 1989). En contraste a la toma de promastigotes no infectivos de *L. major* por macrófagos humanos, que es mediada por CR3 o CR1, la toma de promastigotes metacíclicos infectivos requiere incubación en suero para el depósito de C3b en el parásito y está mediado exclusivamente por CR1 (da Silva et al., 1989).

La unión a receptores del complemento a través de C3 no provoca el estallido respiratorio (Wright y Silverstein, 1983), lo que permite a *Leishmania* sobrepasar este importante mecanismo de defensa del huésped. La presencia

de C3 en la superficie del parásito puede facilitar su sobrevivencia dentro de la célula (Mosser y Edelson, 1987). Tanto los LPG como la gp63 han sido implicados como ligandos del parásito que median directamente la adhesión a macrófagos en ausencia de suero. Se ha sugerido que los LPG se unen a sitios similares a lectinas (Talamas-Rohana et al., 1990), mientras que la gp63 se piensa que se une a sitios de unión de C3bi en CR3 (Russell y Wright, 1988). 1984b; DaSilva et al., 1989; Blackwell et al., 1985; Wilson and Pearson, 1988; Chang, 1983; Talamas-Rohana et al., 1990). *Leishmania* puede fijar complemento directamente de suero no inmune (Mosser y Edelson, 1984b; Puentes et al., 1988) y esto favorece su entrada y sobrevivencia dentro del macrófago (Mosser y Edelson, 1987).

Debido a que los tripomastigotes de *T. cruzi* unen poco C3 y son capaces de infectar células que no poseen receptores para fragmentos de C3, se han implicado otros elementos de la superficie celular del hospedero en el proceso de entrada. Ouaisi y Capron (1989) han sugerido que la fibronectina actúa como un puente molecular que facilita la adhesión del parásito a células blanco. La unión de epimastigotes y su entrada a monocitos y macrófagos se ven aumentadas por una incubación previa en suero; este efecto es mediado en parte por CR3, que es incorporado a la membrana de la vacuola fagocítica en donde el parásito es lisado (Hall y Joiner, datos no publicados, tomado de Hall y Joiner, 1991). Aunque la opsonización por suero aumenta la ingestión de tripomastigotes por macrófagos humanos y de ratón y mejora la sobrevivencia

de éstos, no están involucrados receptores para C3. En cambio, el efecto está mediado en parte por C1q (Rimoldi et al., 1989). CR3 no es incorporado específicamente a la membrana vacuolar del tripomastigote.

Existen diversos ejemplos de la presencia de secuencias relacionadas al complemento en microorganismos que probablemente facilitan la infección por procesos distintos a la regulación del complemento. *Candida albicans* une fragmentos de C3 y también reacciona con un anticuerpo anti la cadena α de CR3 y contiene una proteína con una secuencia nucleotídica homóloga a la región carboxi terminal de CR3 y p150,95). La proteína de *C. albicans* es una integrina β_2 y su función no ha sido claramente determinada. Sin embargo, las cepas patógenas de *Candida* unen iC3b de manera más fuerte que las cepas menos patógenas. Se postula un papel de esta molécula en la adherencia del parásito a las células del huésped, ya que los miembros de la superfamilia de las integrinas intervienen en reacciones de unión y la adherencia celular de *Candida* está correlacionada con la infección.

La TRAP (proteína anónima relacionada a trombospondina) y las proteínas del circumesporozoito de *Plasmodium falciparum* tienen repeticiones del tipo de la trombospondina que son muy similares a las presentes en la properdina, C6, C7, C8 y C9. Se piensa que estas repeticiones intervienen en interacciones proteína-proteína. Se piensa que estas repeticiones en *P. falciparum* pueden unir C3b, como lo hace la properdina, lo que permitiría a los organismos cubiertos de C3b ganar entrada a las células vía CR1.

Babesia rodhuni, que activa al complemento, entra a los eritrocitos a través de CR1; los merozoítos de *Plasmodium* pueden iniciar la infección en forma similar. Bacterias patógenas como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium leprae*, y *Mycobacterium tuberculosis* se dividen en los fagocitos mononucleares, activan al complemento e inician la infección de las células a través de CR1 y CR3.

Se ha observado que algunos virus como los flavivirus y el HIV infectan a los macrófagos y monocitos vía CR3, después de activar al complemento. Hay evidencia que sugiere que el HIV infecta las células B humanas a través de CR2 en conjunción con CD4.

En el suero no inmune del hospedero existen otras opsoninas como por ejemplo la fibronectina. Esta aumenta la internalización de los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en células fagocíticas y no fagocíticas (Ouaissi et al., 1984) y aumenta la adhesión de *Leishmania* spp a los monocitos humanos (Wyller et al., 1985). La unión de la fibronectina a su receptor puede alterar el potencial fagocítico de otros receptores celulares de superficie. Por ejemplo, eritrocitos cubiertos con C3 son ingeridos por macrófagos humanos en presencia de fibronectina y no en ausencia de ésta (Pommier et al., 1983). La unión del parásito a la fibronectina puede incrementar su entrada a través de la interacción con otras proteínas del suero o constituyentes de la matriz extracelular o alterando la función de los receptores de la célula del huésped.

Estas interacciones altamente específicas pueden ser consideradas como procesos de reconocimiento molecular muy especializados. En este contexto, la

presencia de moléculas reguladoras relacionadas antigénica y genéticamente en patógenos y mamíferos puede representar la conservación de motivos de reconocimiento molecular ancestral importantes para el reconocimiento, crecimiento, desarrollo u otros procesos básicos (Cooper, 1991).

I.4 *Entamoeba histolytica* y el complemento

Los principales hallazgos sobre la interacción de las amibas con el sistema del complemento se encuentran resumidos en el siguiente artículo:
Gutiérrez-Kobeh, L. y R. Pérez-Montfort. 1995. Interacciones entre *Entamoeba histolytica* y el complemento. *BEB.* 14 (2): 11-17.

OBJETIVOS

La resistencia de *Entamoeba histolytica* al efecto lítico del complemento es un factor muy importante en la capacidad invasiva del parásito. Este activa al complemento por ambas vías. Diversas cepas de amibas pueden desarrollar resistencia al complemento y se sabe que las diferencias en la sensibilidad a la lisis no radican en la activación del complemento, sino en el manejo del MAC.

El objetivo general de este trabajo fue investigar algunos de los posibles mecanismos involucrados en la resistencia de *E. histolytica* al complemento.

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

- 1) Localizar al MAC, utilizando como marcador $^{125}\text{I-C9}$, en las fracciones subcelulares de trofozoítos resistentes (R) y sensibles (S) a suero humano.
- 2) Investigar si las amibas (R) utilizan como mecanismo de resistencia la exocitosis del MAC en vesículas, mecanismo empleado por neutrófilos (Morgan et al., 1987).
- 3) Conocer si existe transferencia de resistencia de lisados de amibas (R) a amibas (S).
- 4) Estudiar el mecanismo de transferencia y algunas propiedades de las moléculas involucradas.

CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS

La parte correspondiente a materiales y métodos está incluida en el artículo: Gutiérrez-Kobeh, L., N. Cabrera y R. Pérez-Montfort. 1996. A mechanism of acquired resistance to complement mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.*

II.1 Metodología adicional

Después de demostrar que los lisados de amibas (S), al ser incubados por 30 min a 37 °C con amibas (R) adquieren la capacidad de resistir la lisis mediada por complemento, se procedió a caracterizar parcialmente a la molécula (s) responsables de esta transferencia. Además de los tratamientos reportados en el artículo, se probó la funcionalidad de lisado (R) después de tratarlo con tripsina y se pasó por una columna de filtración molecular.

Tratamiento con tripsina

Se preparó un lisado de amibas (R) en la forma ya descrita y se le agregó tripsina (0.13 µg en Tris-HCl 10 mM, pH 7). Se incubaron trofozoítos (S) con el lisado tratado con tripsina y sin tratar y se realizó el ensayo de lisis en la forma ya descrita.

Filtración molecular del lisado (R)

Un lisado de 100×10^6 amibas (R) preparado en la forma ya descrita se pasó por una columna de filtración molecular de Sephacryl S-200. La resina se empacó en una columna de 30×2.5 cm y se equilibró con PBS-A. Se colectaron fracciones de 1 ml y se juntaron las que presentaron mayor concentración de proteína determinada por absorbencia a 280 nm. Estas fracciones fueron utilizadas para incubar amibas (S), después de lo cual se realizaron los ensayos de lisis en la forma ya descrita.

La columna se calibró con ferritina [2 mg/ml], albúmina sérica de bovino [5 mg/ml] y lisozima [5 mg/ml].

CAPÍTULO III. RESULTADOS

La mayoría de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se encuentran publicados en el artículo:

Gutiérrez-Kobeh, L., N. Cabrera y R. Pérez-Montfort. 1996. A mechanism of acquired resistance to complement mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.*

III.1 Resumen del artículo.

En este trabajo se analizó el mecanismo por el cual los trofozoítos de *E. histolytica* evaden la lisis por suero. Lo primero que se hizo fue localizar al MAC, utilizando como marcador $^{125}\text{I-C9}$, en las fracciones subcelulares de trofozoítos (S) y (R) y se observó que el $^{125}\text{I-C9}$ se encuentra en las fracciones que corresponden a membrana plasmática tanto en amibas (S) como (R), pero la cantidad de C9 unido a amibas (S) es mucho mayor a la unida por amibas (R) (Ver figura 2). Se trató de determinar si la menor unión de C9 en amibas (R) se debía a una internalización o liberación del MAC, como ha sido observado en diferentes células eucariontes (Carney et al., 1985; Morgan et al., 1989). Al incubar amibas de ambas cepas con suero humano normal al 10%, suero humano deficiente en C9 o PBS-A se observó que este mecanismo de resistencia al MAC no es utilizado por *E. histolytica*, ya que la formación de vesículas fue similar en ambas poblaciones. Posteriormente se probó si la resistencia podía ser transferida por incubación de amibas (S) con lisados de amibas (R). Se

encontró que las amibas (S) pueden adquirir resistencia a la lisis a los 30 min de coincubación. Debido a que las amibas virulentas presentan un alto grado de eritrofagocitosis (Trissl et al., 1978) y que está demostrado que los eritrocitos pueden transferir moléculas reguladoras del complemento *in vivo* (Kooyman et al., 1995), se investigó si las amibas son capaces de adquirir moléculas reguladoras de esta fuente. Se demostró que las amibas incorporan moléculas de los eritrocitos y este puede ser un mecanismo importante de resistencia a la lisis mediada por complemento.

III.2 Resultados adicionales

Tratamiento del lisado (R) con tripsina

Con el propósito de conocer algunas de las características de la molécula (s) responsable (s) de la transferencia, se trató un lisado preparado a partir de 10×10^6 trofozoítos con tripsina. Se incubaron amibas (S) con este lisado y se realizó el ensayo de lisis. Se observó que el lisado tratado con tripsina conservó su capacidad de transferir resistencia a las amibas (S).

Filtración molecular del lisado de amibas (R)

Con el propósito de hacer un fraccionamiento por peso molecular del lisado de amibas (R) se utilizó una columna de Sephacryl-S-200. Se pasaron 3 ml de un lisado hecho a partir de 100×10^6 trofozoítos (R), se colectaron fracciones de 1 ml y se juntaron las que presentaron mayor concentración de

proteína por absorbencia a 280 nm. Con estas fracciones se hicieron incubaciones con amibas (S) y los ensayos de lisis respectivos. Se observó que la capacidad de transferir resistencia se encuentra en las fracciones que de acuerdo a su elución tienen un peso molecular que oscila entre 40 y 20 kDa.

CAPITULO V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El sistema del complemento es uno de los mecanismos más importantes contra agentes infecciosos. Todos los parásitos que entran en contacto con plasma humano deben en una forma o en otra evadir el efecto destructivo de este poderoso sistema de defensa (Jokiranta et al., 1995). Los parásitos han desarrollado una serie de estrategias que actúan a diferentes niveles de la cascada del complemento, lo que les permite sobrevivir en el ambiente inmunológicamente hostil del huésped.

El parásito protoctista *Entamoeba histolytica* puede permanecer como comensal en el tracto digestivo o invadir algunos órganos como el hígado. Al tornarse invasivo requiere desplegar una serie de capacidades entre ellas la resistencia al complemento. Este parásito activa al sistema por las dos vías. Uno de los mecanismos de activación es a través de la proteasa de cisteína de 56 kDa que actúa como una convertasa de C3 (Reed et al., 1989). Las amibas pueden desarrollar resistencia a la lisis mediada por complemento por la exposición continua a suero humano (Calderón y Tovar, 1986). También el tratamiento con suero bovino las hace resistentes a suero humano y de hámster e incrementa su capacidad de producir abscesos hepáticos en el hámster (Mogyoros et al., 1986). Tanto las cepas susceptibles como las resistentes presentan mecanismos y niveles de activación similares, por lo que las diferencias en susceptibilidad deben radicar en el manejo del MAC. Se ha descrito que uno de los principales componentes de superficie de *E. histolytica*, la adhesina específica para GalNAc,

tiene un efecto inhibitorio en la formación del MAC (Braga et al., 1992). Es una glicoproteína heterodimérica compuesta de dos subunidades de 170 y 35 kDa probablemente unidas covalentemente (McCoy et al., 1993). La subunidad de 35 kDa está anclada a la membrana por GPI, pero la actividad reguladora del complemento reside en un dominio rico en cisteínas de la subunidad transmembranal de 170 kDa. Se ha sugerido que una sección de esta subunidad muestra reactividad cruzada y poca similitud en su secuencia de nucleótidos con CD59 (Braga et al., 1992; Mann et al., 1993). Flores-Romo y cols. (Flores-Romo et al., 1994) han concluido que *E. histolytica* presenta una molécula similar a CD59, ya que al utilizar un anticuerpo monoclonal fluoresceinado contra CD59, las amibas HM1: IMSS virulentas se marcan en forma mucho más intensa que la cepa BG3 no virulenta.

En este trabajo se investigaron los posibles mecanismos involucrados en la resistencia de *Entamoeba histolytica* al complejo de ataque a membranas del complemento. En la formación de este complejo participan los componentes C5, C6, C7, C8 y C9. El C9 tiene un papel muy importante en la lisis de células nucleadas ya que se requiere de la polimerización de esta proteína para la formación de la lesión lítica (Podack et al., 1982). Por esta razón y otras como su estructura de una sola cadena la elegimos como marcador del destino del MAC posterior a la interacción de las amibas con suero humano.

Para estudiar las diferencias en el manejo del MAC entre amibas susceptibles (S) y resistentes (R), se preparó la cepa (R) de acuerdo al método

de Calderón y Tovar (Calderón y Tovar, 1986). La cepa (R) siempre presentó un porcentaje de lisis menor que la cepa (S), pero tal como se observa en las figuras 1 y 4-6 del artículo la lisis de la cepa (R) en suero humano fue variable.

Teniendo en algunos experimentos porcentajes de lisis de 50 y en otros de 10 con suero humano al 50%. No sabemos a que se deben estas diferencias, ya que las condiciones de cultivo siempre se mantuvieron lo más constante posible. El suero humano siempre fue fresco y de un solo donador que no presentó anticuerpos anti-amiba por la prueba de inmunodifusión. De acuerdo a Calderón y Tovar una vez que las amibas alcanzan la resistencia al 40% de suero, ésta se mantiene durante un mes aproximadamente sin requerir la presencia de suero humano. Nosotros no logramos mantener la resistencia por un periodo similar, en nuestro caso las amibas volvían a ser susceptibles después de una semana o dos de no estar en contacto con el suero. Por esta razón, la cepa (R) con la que trabajamos fue retada continuamente con suero humano fresco al 100%.

Para localizar los complejos C5b-9 en las amibas de ambas cepas, éstas se incubaron con suero humano normal al 10% (concentración subléctica) adicionado con ^{125}I -C9 y se realizó un fraccionamiento subcelular de acuerdo a Rosenberg y Gitler (Rosenberg y Gitler, 1985). Se encontró que el C9 se asocia en ambas cepas a las fracciones correspondientes a membrana plasmática, pero la cantidad de C9 unido es del doble en la cepa (S). Se pensó que las amibas (R) unían menos C9 porque de alguna manera lo estaban eliminando. Se investigó

la posibilidad de que las amibas utilizaran la exocitosis en vesículas como mecanismo de evasión, el cual es utilizado por neutrófilos y otras células nucleadas (Carney et al., 1985; Morgan et al., 1987). Esto se realizó mediante la exclusión de vesículas en una columna de Sepharosa-Cl-2B y no se observaron diferencias en el patrón de elución entre ambas cepas. La formación de vesículas, demostrada por el pico en la fracción 7, fue independiente del medio de incubación y no se encontró al ^{125}I -C9 asociado a esta fracción (Fig. 3 del artículo). Esto demostró que las amibas no eliminan el C9 por exocitosis en vesículas.

Una de las formas utilizadas por los parásitos para evadir la lisis mediada por complemento es la posesión de moléculas con funciones similares a las proteínas reguladoras del sistema presentes en mamíferos o el secuestro de alguna de estas proteínas del huésped. En la búsqueda de alguno de estos mecanismos en *E. histolytica*, se probó si lisados preparados a partir de amibas (R) eran capaces de transferir resistencia a trofozoítos (S) al co-incubarlos por 30 min a 37 ° C. Se observó que esta incubación cambiaba la susceptibilidad de las amibas (S) al suero humano, ya que se obtenían valores de viabilidad similares a los obtenidos con la cepa (R). Las amibas (S) se incubaron también con un lisado de amibas (S) y éste no cambió su viabilidad en suero humano con lo que se demostró que la transferencia de resistencia no se da por la incubación con un lisado, sino que tiene que ser un lisado hecho con amibas resistentes a suero humano. En un intento por conocer algunas de las propiedades de la (s)

molécula (s) responsables de la transferencia de resistencia, hicimos algunos tratamientos al lisado (R) como calentamiento a 60 ° C por 30 min, a 100 ° C por 3 min, centrifugación a 436,000 g, adición de tripsina y del inhibidor de proteasas E-64. Posteriormente a estos tratamientos los lisados fueron incubados con amibas (S) y se realizaron los ensayos de lisis. Se observó que el calentamiento a 60 ° C y la adición de tripsina o E-64 no afectaron la propiedad de conferir resistencia del lisado, mientras que el calentamiento a 100 ° C si lo hizo.

El paso del lisado por una columna de filtración molecular de Sephacryl-S-200 dio 3 picos de elución y al probar la capacidad de transferir resistencia de las fracciones de mayor concentración de proteína de cada uno de ellos se observó que esta capacidad se encuentra en las fracciones con un peso molecular entre 40 y 20 kDa.

Debido a que las amibas (R) poseen estas moléculas responsables de la transferencia de resistencia y las amibas (S) no las tienen o las tienen en cantidad insuficiente para lograr la resistencia, pensamos que las amibas (R) las estaban incorporando de alguna fuente. El fenómeno de incorporación de moléculas reguladoras del complemento y adquisición de resistencia en distintos tipos celulares y bajo diferentes condiciones experimentales *in vitro* está ampliamente documentado y recientemente se ha observado *in vivo* también. Desde 1969 Hoffmann demostró que un lisado de eritrocitos humanos podía proteger a eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpos de la lisis por complemento.

Posteriormente se demostró que la incorporación de moléculas como DAF en células inhibe la activación del complemento (Medof et al., 1984). En eritrocitos de pacientes con PNH, la incorporación de CD59 los hace resistentes a la lisis mediada por complemento (Holguin et al., 1989; Okada et al., 1990).

Debido a que las amibas virulentas presentan una elevada eritrofagocitosis (Trissl et al., 1978), pensamos que estas amibas podían adquirir moléculas reguladoras de los eritrocitos. La incubación de amibas (S) con un lisado de eritrocitos o con eritrocitos enteros modificó la viabilidad de éstas en suero humano y se obtuvieron valores similares a los obtenidos con la cepa (R).

Estos resultados sugirieron que las amibas adquieren resistencia a la lisis mediada por complemento por la incorporación de moléculas de los eritrocitos. Para probar en forma más definitiva esta hipótesis se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti antígenos de superficie de eritrocitos humanos y un segundo anticuerpo fluoresceinado. El tratamiento con estos anticuerpos de amibas (S), (R), (S) incubadas con un lisado (R) y amibas (S) incubadas con eritrocitos enteros por 48 h mostró diferencias en la intensidad de fluorescencia y éstas correlacionaron con los porcentajes de lisis en suero humano al 20% (Tabla II. y Fig. 7 del artículo). Mediante el fraccionamiento subcelular de amibas, posterior a la incubación de éstas con eritrocitos marcados con ^{125}I , se observó que la mayor parte de las cpm están asociadas a membrana plasmática. Al analizar estas fracciones por electroforesis se observan bandas de determinados pesos moleculares que

corresponden a algunas de las bandas presentes en el patrón de corrimiento de un lisado de eritrocitos. Se observan tres bandas principales que corresponden a la banda 3 (Mr 97 kDa), banda 4.1 (Mr 78 kDa) y actina (Mr 43 kDa). Esta correspondencia con los pesos moleculares reportados para algunas proteínas de eritrocitos indica que hay proteínas del eritrocito que se transfieren en forma intacta a la amiba y lo mismo debe ocurrir con proteínas reguladoras del complemento. Una de las razones por las que se observa la captación por parte de las amibas de las proteínas antes mencionadas y no de una proteína reguladora como el CD59 puede ser el número de moléculas de cada tipo de proteína presente en la membrana del eritrocito. La banda 3 es la proteína más abundante en la membrana del eritrocito con un número aproximado de copias por célula de 1,000,000, en segundo lugar se encuentra la actina junto con las glicoforinas con 500,000 copias por célula y de la banda 4.1 existen 100,000 copias por célula (Repasky y Gregorio, 1991). El número de moléculas de CD59 por eritrocito es de 20-25,000 y en un experimento de incorporación aproximadamente 5000 moléculas por célula son suficientes para proteger (Lachmann, 1990).

Está demostrado que DAF y CD59 se transfieren *in vivo* en forma funcional al endotelio vascular (Kooyman et al., 1995). El significado funcional de este proceso no se conoce, pero se piensa que debido a la función de estas proteínas como inhibidores del complemento la transferencia podría ayudar al mantenimiento de la integridad vascular. Puede ser que los eritrocitos sirvan

como depósitos de estas moléculas y que estas puedan ser transferidas a células que las han perdido como resultado de la activación del complemento como ocurre durante una isquemia transitoria (Vakeva et al., 1994).

En el caso de la transferencia de moléculas reguladoras del complemento de eritrocitos a *E. histolytica*, las moléculas que muy probablemente están involucradas son HRF o CD59 más que DAF o MCP. Como ya se mencionó anteriormente, las diferencias en la resistencia al complemento entre amibas (S) y (R) no radican en la forma o grado de activación del complemento sino en el manejo del MAC. La incorporación de una molécula como DAF se reflejaría en diferencias en el depósito de C3 o los diferentes productos de su ruptura entre las dos poblaciones de amibas. MCP queda descartada debido a que no está presente en eritrocitos. De los inhibidores del ensamblaje del MAC, HRF y CD59, nuestras evidencias experimentales y otras, apoyan que la molécula responsable de la transferencia de resistencia es el CD59. En la caracterización parcial de la molécula responsable de la transferencia de resistencia de lisados (R) a amibas (S) se observó que es muy estable y resistente a tripsina, las cuales son características descritas para CD59 (Sugita et al., 1992). Además por filtración molecular se determinó que la molécula está en un rango de peso molecular de 40 a 20 kDa y el HRF tiene un peso molecular de 65 kDa. Los experimentos de Flores-Romo y cols. (Flores-Romo et al., 1994) demuestran la presencia de CD59 o una molécula que cruza con el anticuerpo monoclonal anti CD59 utilizado en la

superficie de amibas virulentas. Este anticuerpo monoclonal puede estar reaccionando con el CD59 incorporado por las amibas virulentas y también con la adhesina específica para GAL-NAc, que de acuerdo a Braga y cols. (Braga et al., 1992) presenta reacción cruzada con esta molécula. Nuestros resultados no son inconsistentes con los de Braga y cols., ya que además de que la adhesina puede funcionar en la inhibición del MAC, es muy probable que la amiba requiera de un mayor número de moléculas reguladoras para lograr una protección completa.

La amiba además de incorporar moléculas de los eritrocitos, puede también transferir ^{las podría} ~~otras~~ a células cercanas. Está reportado que un anticuerpo monoclonal, el CD6, dirigido contra la lectina específica para Gal/GalNAc reconoce epítopes en la superficie de células epiteliales durante un co-cultivo con amibas. Esta transferencia es contacto dependiente y requiere de amibas enteras. Se especula que este proceso tiene relevancia en la citopatogenicidad de la amiba y que podría funcionar en el rompimiento de la integridad funcional de algunas células (Leroy et al., 1995).

En este trabajo demostramos que uno de los mecanismos mediante el cual el parásito *Entamoeba histolytica* evade la lisis mediada por complemento es la incorporación de moléculas reguladoras provenientes de los eritrocitos. Este tipo de transferencia está descrito para células endoteliales, pero es la primera descripción que se hace como mecanismo de evasión en un parásito.

CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFIA

- Altieri, D. C. y T. S. Edgington. 1988. The saturable high affinity association of factor X to ADP-stimulated monocytes defines a novel function of the Mac-1 receptor. *J. Biol. Chem.* **263**: 7007-7015.
- Altieri, D. C., R. Bader, P. M. Mannucci y T. S. Edgington. 1988. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J. Cell. Biol.* **107**: 1893-1900.
- Anderson, D. C., L. J. Miller, F. C. Schmalstieg, R. Rothlien y T. A. Springer. 1986. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit specific monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **137**: 15-27.
- Arlaud, G. J., M. G. Colomb y J. Gagnon. 1987. A functional model of the human C1 complex. *Immunol. Today* **8**: 106-110.
- Asch, A. S., T. Kinoshita, E. A. Jaffe y V. Nussenzweig. 1986. Decay-accelerating factor is present on cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Exp. Med.* **163**: 221.
- Bakker-Grunwald, T. y C. Wöstmann. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eucaryotic cell. *Parasitol. Today* **9** (1): 27-31.
- Beller, D. I., T. A. Springer y R. D. Schreiber. 1982. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J. Exp. Med.* **156**: 1000-1009.
- Bhakdi, S., J. Trantum-Jensen y O. Klump. 1980. The terminal membrane C5b-9 complex of human complement. Evidence for the existence of multiple protease-resistant polypeptides that form the trans-membrane complement channel. *J. Immunol.* **124**: 2451-2457.
- Bhakdi, S. J. y J. Trantum-Jensen. 1986. C5b-9 assembly: Average binding of one C9 molecule to C5b-8 without poly-C9 formation generates a stable transmembrane pore. *J. Immunol.* **136**: 2999-3005.
- Bhakdi, S. J. y J. Trantum-Jensen. 1991. Complement lysis: A hole is a hole. *Immunol. Today* **12**: 318-320.

- Blackwell, J. M., R. A. B. Ezekowitz, M. B. Roberts, J. Y. Channon, R. B. Sim y S. Gordon. 1985. Macrophage complement and lectin-like receptors bind leishmania in the absence of serum. *J. Exp. Med.* **162**: 324-331.
- Braga, L. L., H. Ninomiya, J. J. McCoy, S. Eacker, T. Wiedmer, C. Pham, S. Wood, P. J. Sims y W. A. Petri. 1992. inhibition of the membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **90**: 1131-1137.
- Bülow, R., P. Overath y J. Davoust. 1988. *Biochemistry* **27**: 2384-
- Calderón, J. y R. Tovar. 1986. Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* HM1 by treatment with human serum. *Immunology.* **58**: 467-471.
- Campbell, R. D., S. K. A. Law, K. B. M. Reid y R. B. Sim. 1988. Structure, organization and regulation of the complement genes. *Ann. Rev. Immunol.* **6**: 161-195.
- Carney, D. F., C. L. Koski y M. L. Shin. 1985. Elimination of terminal complement intermediates from the plasma membrane of nucleated cells: the rate of disappearance differs from cells carrying C5b-7 or C5b-8 or a mixture of C5b-8 with a limited number of C5b-9. *J. Immunol.* **134**: 1804-1809.
- Chang, K. P. 1983. *Int. Rev. Cytol.* (Suppl. **14**): 267-302.
- Clark, C. G. y L. S. Diamond. 1994. Pathogenicity, virulence and *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Today* **10** (2): 46-47.
- Cooper, N. R. 1991. Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunol. Today* **12**: 327-331.
- Cooper, A., H. Rosen y J.M. Blackwell. 1988. Monoclonal antibodies that recognize distinct epitopes of the macrophage type three complement receptor differ in their ability to inhibit binding of leishmania promastigotes harvested at different phases of their growth cycle. *Immunology.* **65**: 511-514.
- Cooper, N. R. 1991. Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunol. Today.* **12** (9): 327-331.
- Dalmasso, A. P., G. M. Vercelotti, J. L. Platt y F. H. Bach. 1991. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay

accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation*. 52: 530.

Da Silva, R. P., B. F. Hall, K. A. Joiner y D. L. Sacks. 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* to macrophages. *J. Immunol.* 143: 617.

Davies, A., D. L. Simmons, G. Hale, R. A. Harrison, H. Tighe, P. J. Lachmann y H. Waldmann. 1989. CD59, an Ly-6 like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J. Exp. Med.* 170: 637-654.

Davitz, M., M. Low y V. Nussenzweig. 1986. Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase (PIPLC). *J. Exp. Med.* 163: 1150-1161.

Diamond, M. S., D. E. Staunton, A. R. de Fougères, S. A. Atacker, J. García-Aguilar, M. L. Hibbs y T. A. Springer. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell. Biol.* 111: 3129-3139.

Erdei, A., G. Füst y J. Gergely. 1991. The role of C3 in the immune response. *Immunol. Today*. 12(9): 332-337.

Esser, A. F., W. P. Kolb, E. R. Podack y H. J. Müller-Eberhard. 1979. Molecular reorganization of lipid bilayers by complement: A possible mechanism of membranolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1410-1414.

Esser, A. F. 1991. Big MAC attack: Complement proteins cause leaky patches. *Immunol. Today* 12: 316-318.

Farries T. C. y J. P. Atkinson. 1991. Evolution of the complement system. *Immunol. Today*. 12 (9): 295-300.

Fátima, M., M. Horta y F. Juarez Ramalho-Pinto. 1991. Role of human decay-accelerating factor in the evasion of *Schistosoma mansoni* from the complement-mediated killing in vitro. *J. Exp. Med.* 174: 1399-1406.

Fischer, E., M. Ouassi, P. Velge, J. Cornette y M. Kazatchkine. 1988. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the alternative complement pathway. *Immunology*. 65: 299-303.

Fishelson, Z. 1994. Complement-related proteins in pathogenic organisms. *Springer Semin. Immunopathol.* 15: 345-368.

- Flores-Romo, L., V. Tsutsumi, T. Estrada-García, M. Shibayama, J. P. Aubry, K. B. Bacon y A. Martínez-Palomo. 1994. CD59 (protectin) molecule, resistance to complement, and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Trans. Roy.Soc.Trop. Med. Hyg.* 88: 116-117.
- Fuhrman, S. A. y K. A. Joiner. 1989. Complement evasion by protozoa. *Exp. Parasitol.* 68: 474-481.
- Hall, B. F. y K. A. Joiner. 1991. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Immunol. Today.* 12: A22-27.
- Hemler, M. E. 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 365-400.
- Hoffmann, E. M. 1969. Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. I. Extraction from human erythrocytes stromata. *Immunochemistry* 6: 391-
- Holguin, M. H., L. R. Fredrick, N. J. Bernshaw, L. A. Wilcox y C. J. Parker. 1989. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Clin. Invest.* 84: 7-17.
- Hourcade, D., V. M. Holers y J. P. Atkinson. 1989. The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv. Immunol.* 45: 381.
- Iida, K., M. B. Whitlow y V. Nussenzweig. 1989. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. *J. Exp. Med.* 169: 881-891.
- Ishihara, A., Y. Hou y K. Jacobson. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1290-
- Janatova, J., K. B. M. Reid y A. C. Willis, A. C. 1989. Disulfide bonds are localized within the short consensus repeat units of complement regulatory proteins: C4b-binding protein. *Biochemistry.* 28: 4754.
- Joiner, K. A. 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 201-230.
- Joiner, K. A., A. Sher, T. Gaither y C. Hammer. 1986. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi*: Result from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6593-6597.

- Jokiranta, T. S., L. Jokipii y S. Meri. 1995. Complement resistance of parasites. *Scand. J. Immunol.* **42**: 9-20.
- Juang, 1994.
- Keizer, G. D., A. A. te Velde, R. Schwarting, C. G. Figdor y J. E. de Vries. 1987a. Role of p150,95 in adhesion, migration, chemotaxis, and phagocytosis of human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **17**: 1317-1322.
- Keizer, G. D., J. Borst, W. Visser, R. Schwarting, J. E. de Vries y C. G. Figdor. 1987b. Membrane glycoprotein p150,95 of human cytotoxic T-cell clones is involved in conjugate formation with target cells. *J. Immunol.* **138**: 3130- 3136.
- Kinoshita, T., M. E. Medof, R. Siber y V. Nussenzweig. 1985. Distribution of decay accelerating factor in the peripheral blood of normal individual and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Exp. Med.* **162**: 75-
- Kipnis, T. L., J. R. David, C. A. Alper, A. Sher y W. Dias da Silva. 1981. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of the alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 602-605.
- Kipnis, T. L., D. V. Tambourgi, M. Sucupira y W. Dias da Silva. 1986. Effect of *Trypanosoma cruzi* membrane components on the formation of the classical pathway C3 convertase. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **19**: 271.
- Kishimoto, T. K., R. S. Larson, A. L. Corbi, M. L. Dustin, D. E. Staunton y T. A. Springer. 1989. The leukocyte integrins: LFA-1, Mac-1, and p150,95. *Adv. Immunol.* **46**: 149-182.
- Kooyman, D. L., G. W. Byrne, S. McClellan, D. Nielsen, M. Tone, H. Waldmann, T. M. Coffman, K. R. McCurry, J. L. Platt y J. S. Logan. 1995. In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* **269**: 89-92.
- Krettli, A. U. y Z. Brener. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* **128**: 2009-2012.
- Krettli, A. U., P. Weisz-Carrington, P. y R. S. Nussenzweig. 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain

- differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.* **37**: 416.
- Lachmann, P. J. 1990. Protection against complement lysis. *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 1159-1160.
- Lachmann, P. J. y C. Hughes-Jones. 1984. Initiation of complement activation. *Springer Seminar. Immunopathol.* **7**: 143-162.
- Laclette, J. P., C. B. Shoemaker, D. Richter, L. Arcos, N. Pante, C. Cohen, D. Bing y A. Nicholson-Weller. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* **148**: 124-128.
- Ley, V., N. W. Andrews, E. S. Robbins y V. Nussenzweig. 1989. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **168**: 649-659.
- Lisanti, M., 1989. *J. Cell Biol.* **109**: 2145-
- Lisanti, M. P., E. Rodríguez-Boulan y A. R. Saltiel. 1990. *J. Membr. Biol.* **117**: 1-
- Liszewski, M. K., T. W. Post y J. A. Atkinson. 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 431.
- Loike, J. D., B. Sodeik, L. Cao, S. Leucona, J. Y. Weitz, P. A. Detmars, S. D. Wright y S. C. Silverstein. 1991. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N-terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 1044-1048.
- Lutz, H. U., P. Stammer, S. Fasler, M. Ingold y J. Fehr. 1992. Density separation of human red blood cells on self-forming Percoll gradients: correlation with cell age. *Biochim. Biophys. Acta.* **1116**: 1.
- Mann, B. J., C. Y. Chung, J. M. Dodson, L. S. Ashley, L. L. Braga y T. L. Snodgrass. 1993. Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170-kilodalton subunit. *Infect. Immun.* **61**: 1772-1778.
- Martínez-Palomo, A. 1982. The Biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. Gran Bretaña. pp. 1-161.

- McCoy, J. J., B. J. Mann, T. S. Vedvick, Y. Pak, D. B. Heimark y W. Petri Jr. 1993. Structural analysis of the light subunit of the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adherence lectin. *J. Biol. Chem.* **268**: 2423-2431.
- Medof, M. E., T. Kinoshita y V. Nussenzweig. 1984. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay accelerating factor (DAF) into their membranes. *J. Exp. Med.* **160**: 1558-
- Medof, M., E. I. Walter, W. L. Roberts, R. Haas y T. L. Rosenberry. 1986. Decay accelerating factor of complement is anchored to cells by a C-terminal glycolipid. *Biochemistry*, **25**: 6740.
- Mogyoros, M., E. Calef y C. Gitler. 1986. Pathogenicity of *Entamoeba histolytica* correlates with the capacity to develop complement resistance. *Isr. J. Med. Sci.* **22**: 915-917.
- Morgan, B. P. 1989. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem. J.* **264**: 1-14.
- Morgan, B. P. 1992. Isolation and characterization of the complement-inhibiting protein CD59 antigen from platelet membranes. *Biochem. J.* **282**: 409.
- Morgan, B. P., J. R. Dankert y A. F. Esser. 1987. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis. *J. Immunol.* **138**: 246-253.
- Morgan, B. P. y Meri. 1994. Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin. Immunopathol.* **15**: 369-396.
- Mosser, D. M., S. K. Burke, E. C. Coutavas, J. F. Wedgewood y P. J. Edelson. 1986. Leishmania species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp. Parasitol.* **62**: 394-404.
- Mosser, D. M. y P. J. Edelson. 1984. Activation of the alternative complement pathway by leishmania promastigotes: Parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.* **132**: 1501-1505.
- Mosser, D. M. y P. J. Edelson. 1985. The mouse macrophage receptor for iC3b (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of leishmania promastigotes. *J. Immunol.* **135**: 2785-2789.
- Mosser, D. M. y P. J. Edelson. 1987. Serum complement is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature.* **327**: 329-331.

- Muir, R. 1911. On the relationships between the complement and the immune bodies of the different animals. *J. Pathol. Bacteriol.* **16**: 523.
- Myones, B. L., J. G. Dalzell, N. Hogg, and G. D. Ross. 1988. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J. Clin. Invest.* **82**: 640-651.
- Nicholson-Weller, A., J. Burge y K. F. Austen. 1981. Purification from guinea pig erythrocyte stroma of a decay-accelerating factor for the classical C4 convertase, C4b,2a. *J. Immunol.* **127**: 2035.
- Nicholson-Weller, A., J. Burge, D. T. Fearon, P. F. Weller y K. F. Austen. 1982. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J. Immunol.* **129**: 184.
- Ninomiya, H., B. H. Stewart, S. A. Rollins, J. Zhao, A. L. M. Bothwell y P. J. Sims. 1992. Contribution of the N-linked carbohydrate of erythrocyte antigen CD59 to its complement-inhibitory activity. *J. Biol. Chem.* **267**: 8404.
- Nogueira, N., C. Bianco y Z. Cohn. 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **142**: 224-229.
- Norris, K. A., B. Bradt, N. Cooper y M. So. 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *J. Immunol.* **147**: 2240-2247.
- Norris, K. A., G. Harth y M. So. 1989. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* **57**: 2372-2377.
- Norris, K. A. y J. E. Schrimpf. 1994. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **62** (1): 236-243.
- Oglesby, T. J., C. J. Allen, M. K. Liszewski, D. J. G. White y J. P. Atkinson. 1992. Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* **175**: 1547.
- Okada, N., R. Harada, T. Fujita y H. Okada. 1989. A novel membrane glycoprotein capable of inhibiting membrane attack by homologous complement. *Int. Immunol.* **1**: 205-208.

- Ouaissi, M. A., D. Afchain, A. Capron y J. A. Grimaud. 1984. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature*. 308: 380-382.
- Ouaissi, M. A. y A. Capron. 1989. Some aspects of protozoan parasite-host cell interactions with special reference to RGD-mediated recognition process. *Microb. Pathogen*. 6: 1-5.
- Pangburn, M. K. y H. J. Müller-Eberhard. 1984. The alternative pathway of complement. *Springer Semin. Immunopathol*. 7: 163-192.
- Pearce, E. J., B. F. Hall y A. Sher. 1990. Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase c-sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. *J. Immunol*. 144 (7): 2751-2756.
- Podack, E. R., J. Tschopp y H. H. Müller-Eberhard. 1982. molecular organization of C9 within the membrane attack complex of complement. induction of circular C9 polymerization by the C5b-8 assembling. *J. Exp. Med*. 156: 268-282.
- Pommier, C. G., 1983. *J. Exp. Med*. 157: 1844-1854.
- Puentes, S. M., D. M. Dwyer, P. A. Bates y K. A. Joiner. 1989. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol*. 143: 3743-3749.
- Puentes, S. M., D. L. Sacks, R. P. da Silva y K. A. Joiner. 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med*. 167: 887-902.
- Rasmussen, K. R. y W. M. Kemp. 1987. *Schistosoma mansoni*: interactions of adult parasites with the complement system. *Parasite Immunol*. 9: 235.
- Reed, S. L., W. E. Keene, J. H. McKerrow e I. Gigli. 1989. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol*. 143: 189-195.
- Reeves, R. E. y J. M. Bischoff. 1968. Classification of *Entamoeba* species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. *J. Parasitol*. 54: 594-600.
- Reeves, R. E. 1984. *Adv. Parasitol*. 23: 105-142.

- Reiter, Y., A. Ciobotariu y Z. Fishelson. 1992. Sublytic complement attack protects tumor cells from lytic doses of antibody and complement. *Eur. J. Immunol.* 22: 1207-1213.
- Rifkin y Landsberge 1990.
- Rimoldi, M. T., A. Sher, S. Heiny, C. Lituchy, C. Hammer y K. A. Joiner. 1988. Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 193-197.
- Rimoldi, M. T., A. J. Tenner, D. A. Bobak y J. A. Joiner. 1989. Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J. Clin. Invest.* 84: 1982-1989.
- Sargeant, P. G. y J. E. Williams. 1978. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 164-166.
- Rosenberg, I y C. Gitler. 1985. Subcellular fractionation of amoebapore and plasma membrane components of *Entamoeba histolytica* using selfgenerating Percoll gradients. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 231-248.
- Sargeant, P. G. y J. E. Williams. 1982. Study of intestinal protozoa including non-pathogenic *Entamoeba histolytica* from patients in a group of mental hospitals. *Am. J. Public Health* 72: 178-179.
- Sargeant, P. G., J. E. Williams y R. A. Neal. 1980. A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH-200:HK9, etc), "*Entamoeba histolytica*-like", and other morphologically identical amoebae using an isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 469-474.
- Sargeant, P. G., J. E. Williams y R. Bohojnani. 1982. A review of the isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 13: 89-93.
- Schenkman, S., M. S. Guthrie y N. Yoshida. 1986. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of a specific monoclonal antibody. *J. Immunol.* 137: 1623-1628.

- Schifferli, J. A., Y. C. Ng y D. K. Peters. 1986. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N. Engl. J. Med.* **315**: 488.
- Schifferli, J. A., Y. C. Ng., J-P. Pascaud y M. J. Walport. 1989. The role of hypocomplementaemia and low erythrocyte complement receptor type 1 numbers in determining abnormal immune complex clearance in humans. *Clin. Exp. Immunol.* **75**: 329.
- Schönermark, S., E. W. Rauterberg, M. L. Shin, S. Loke, D. Roelcke y G. M. Hänsch. 1986. Homologous species restriction in lysis of human erythrocytes: a membrane-derived protein with C8-binding capacity functions as an inhibitor. *J. Immunol.* **136**: 1772.
- Schönermark, S., S. Felsing, B. Berger y G. M. Hänsch. 1988. The C8-binding protein of human erythrocytes: interaction with the components of the complement attack phase. *Immunology.* **63**: 585.
- Schumaker, V. N., P. Zavodsky y P. H. Poon. 1987. Activation of the first component of complement. *Ann. Rev. Immunol.* **5**: 21-42.
- Seya, T. y J. P. Atkinson. 1989. Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem. J.* **264**: 581.
- Seya, T., J. Turner y J. P. Atkinson. 1986. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) which is a cofactor for cleavage for C3b and C4b. *J. Exp. Med.* **163**: 837.
- Shibata, T., F. G. Cosio y D. J. Birmingham. 1991. Complement activation induces the expression of decay-accelerating factor on human mesangial cells. *J. Immunol.* **147**: 3901.
- Smith, C. W., S. D. Marlin, R. Rothlein, C. Toman y D. C. Anderson. 1989. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* **83**: 2008-2017.
- Springer, T. A. 1990. Adhesion receptors in the immune system. *Nature (Lond.)*. **346**: 425-432.
- Sugita, Y., T. Mazda y M. Tomita. 1989. Amino terminal amino acid sequence and chemical and functional properties of a membrane attack complex inhibiting factor from human erythrocytes. *J. Biochem.* **106**: 589.

- Talamas-Rohana, P., S. D. Wright, M. R. Lennartz y D. G. Russell. 1990. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J. Immunol.* **144**: 4817-4824.
- te Velde, A. A., G. D. Keizer y C. G. Figdor. 1987. Differential function of LFA-1 family molecules (CD 11 and CD 18) in adhesion of human monocytes to melanoma and endothelial cells. *Immunology.* **61**: 261-267.
- Trissl, D., A. Martínez-Palomo, M. de la Torre, R. de la Hoz y E. Pérez de Suárez. 1978. Surface properties of Entamoeba: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* **148**: 1137-1145.
- Vakevã, A., P. Laurila y S. Meri. 1993. Loss of expression of protectin (CD59) associates with complement membrane attack complex deposition y myocardial infarction. *Lab. Invest.* **67**: 608.
- Walsh, J. A. 1986. The world problem of amebiasis: Current status, research and opportunities for advancement. In *Tropical and Geographic Medicine*, ed. K. S. Warren y A. A. F. Mahmoud. New York, Mc. Graw Hill.
- Walter, E. I., W. L. Roberts, T. L. Rosenberry, W. D. Ratnoff y M. E. Medof. 1990. Structural basis for variations in the sensitivity of human decay accelerating factor to phosphatidylinositol-specific phospholipase C cleavage. *J. Immunol.* **144**: 1030.
- Walter, E. I., W. D. Ratnoff, K. E. Long, J. W. Kazura y M. E. Medof. 1992. Effect of glycoinositolphospholipid anchor lipid groups on functional properties of decay-accelerating factor protein in cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 1245.
- Watts, M. J., J. R. Dankert y B. P. Morgan. 1990. Isolation and characterization of a membrane attack complex inhibiting protein present in human serum and other biological fluids. *Biochem. J.* **265**: 471.
- Whitlow, M. B., K. Iida, I. Stefanova, A. Bernard y V. Nussenzweig. 1990. H19, a surface membrane molecule involved in T-cell activation, inhibits channel formation by human complement. *Cell. Immunol.* **126**: 176-184.
- Wilson, M. E. y R. D. Pearson. 1988. Roles for CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* **56**: 363-369.

Wright, S. D., J. I. Weite, A. J. Huang, S. M. Levin, S. C. Silverstein y J. D. Loike. 1988. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7734-7738.

Wright, S. D., P. E. Rao, W. C. Van Voorhis, L. S. Craigmyle, K. Iida, M. A. Talle, E. F. Westberg, G. Goldstein y S. C. Silverstein. 1983. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 5699-5703.

Wright, S. D. y S. C. Silverstein. 1983. *J. Exp. Med.* **158**: 2016-2023.

Wyler, D. J., J. P. Sypek y J. A. McDonald. 1985. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect. Immun.* **49**: 305-311

Zalman, L. S., L. M. Wood y H. J. Müller-Eberhard. 1986. Isolation of a human erythrocyte membrane protein capable of inhibiting expression of homologous complement transmembrane channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 6975.

Zalman, L. S., L. M. Wood, M. M. Frank y H. J. Müller-Eberhard. 1987. Restriction of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Exp. Med.* **165**: 572.

Zalman, L. S., M. A. Brothers y H. J. Müller-Eberhard. 1988. Self-protection of cytotoxic lymphocytes by a soluble form of homologous restriction factor y cytoplasmic granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4827.

Zhang, 1992.

INTERACCIONES ENTRE *Entamoeba histolytica* Y EL COMPLEMENTO

Laila Gutiérrez Kobeh y Ruy Pérez Montfort. Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-242, 04510 México, D.F.

RESUMEN

La resistencia de *Entamoeba histolytica* al complemento es un factor importante en la capacidad invasora de este parásito. En el presente trabajo se resumen los principales hallazgos sobre la interacción de las amibas con el sistema del complemento. Los trofozoítos de *E. histolytica* activan al complemento por las vías clásica y alterna. Existen diferencias entre las amibas patógenas y las no patógenas en la resistencia a la lisis mediada por el complemento. El mecanismo preciso de la resistencia a la lisis no se conoce, pero ya se han propuesto algunas hipótesis acerca de como las amibas resisten la muerte por el complejo de ataque a membranas.

PALABRAS CLAVE: *Entamoeba histolytica*, complemento, lisis, resistencia, complejo de ataque a membranas.

ABSTRACT

The resistance of *Entamoeba histolytica* to complement is an important factor in the invasive capacity of this parasite. This work summarizes the main findings about the interaction of amebas with the complement system. Trophozoites of *E. histolytica* activate complement by the classical and alternative pathways. There are differences between pathogenic and non-pathogenic amebas in their resistance to complement mediated lysis. The precise mechanism of the resistance to complement is not known, but there are some proposed ways of how amebas resist killing by membrane attack complexes

KEY WORDS: *Entamoeba histolytica*, complement, resistance, lysis, membrane attack complex.

INTRODUCCION

La amibiasis es el padecimiento provocado por el parásito *Entamoeba histolytica*. Este parásito puede permanecer como comensal en el tracto digestivo o invadir algunos órganos como el hígado. Se sabe

que en este cambio de comportamiento están involucrados diversos factores tales como inducción de muerte por contacto en las células del hospedero, liberación del ameboporo y proteasas de cisteína y resistencia a los mecanismos de defensa del huésped. Uno de estos mecanismos es el sistema del complemento. Este sistema está formado por un conjunto de reacciones altamente integradas y controladas que combinan mecanismos primitivos de reconocimiento y funciones efectoras que juegan un papel muy importante en otros sistemas de defensa de los organismos.

I. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El complemento es el principal sistema efector citolítico presente en el suero. Está formado por 30 o más proteínas, presentes en el plasma o en las membranas celulares, que actúan solas o en cooperación con anticuerpos o con células que expresan receptores del complemento. Desempeña varias funciones en los organismos como incrementar la permeabilidad vascular, contracción de músculo liso, liberación de mediadores de células cebadas, opsonización y fagocitosis, activación y quimiotaxis de neutrófilos y lisis de células, entre otras (Tabla I).

El sistema del complemento puede activarse por dos vías, la clásica o la alterna, las cuales llevan al ensamblaje del complejo de ataque a las membranas. La función primaria de las vías de activación es la formación de las convertasas de C3 que rompen al componente C3 en C3a y C3b. Esta ruptura provoca la exposición de un enlace tioéster que puede reaccionar con grupos amino o hidroxilo (Fig 1).

II. LA VIA CLASICA

Esta vía se inicia por la interacción del complejo C1, constituido por C1q, C1s, C1r, con complejos inmunes formados por anticuerpos de las clases IgG o IgM unidos a sus antígenos respectivos. Esta interacción permite la activación de las proenzimas

TABLA I

| PROTEINAS DEL COMPLEMENTO Y ALGUNAS DE SUS CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES | | |
|--|----------------------|---------------------------------|
| Proteínas | Masa molecular (kDa) | Características estructurales |
| Vías de activación | | |
| C1q | 462 | Similar a la colágena |
| C1r/C1s | 83/83 | Proteasa de serina, SCR* |
| Factor D | 24 | Proteasa de serina |
| C2/Factor B | 102/92 | Proteasa de serina, SCR |
| C4/C3 | 205/185 | Contiene tioéster |
| Vía terminal | | |
| C5 | 190 | Similar a C3 y C4, sin tioéster |
| C6/C7 | 120/110 | Formadoras de poros, SCR |
| C8/C9 | 150/71 | Formadoras de poros |
| Proteínas reguladoras | | |
| Plasmáticas | | |
| Properdina (P) | 220 | |
| Inhibidor de C1 | 110 | Inhibidor de proteasa de serina |
| Factor I | 88 | Proteasa de serina |
| Proteína que une C4 (C4bp)/Factor H | 500/150 | SCR |
| Proteína S o vitronectina | 83 | |
| Unidas a membranas | | |
| Factor acelerador del decaimiento (DAF) | 70 | SCR, ancla de PI ^b |
| Proteína cofactor de membrana (MCP) | 45/70 | SCR |
| Factor de restricción homóloga | 65 | Ancla de PI |
| CD59 | 18 | Ancla de PI |
| Receptores del complemento | | |
| CR1 (4 alotipos) | 250, 220, 190, 160 | SCR |
| CR2 | 145 | SCR |
| CR3 | 165 (α) 95 (β) | Integrina de leucocito |
| p150, 95 | 150 (α) 95 (β) | Integrina de leucocito |

*SCR: Repeticiones consensales cortas; ^bPI: fosfatidilinositol

C1r y C1s. El C1s activado rompe al C4 en C4a y C4b. El C4b interacciona con C2, lo que provoca su ruptura y la formación de la convertasa de C3 de la vía clásica que rompe al C3 en C3a y C3b. El C3b se une covalentemente a la membrana activadora y funciona como aceptor de C5, lo que modifica la especificidad de la convertasa de C3. Se forma así la convertasa de C5, que hidroliza a C5 en C5a y C5b, con lo que se inicia el ensamblaje del complejo de ataque a las membranas.

III. LA VIA ALTERNA

La activación de este vía no requiere de la participación de anticuerpos y juega un papel muy importante en la defensa contra los agentes infecciosos. Las partículas activadoras son de naturaleza diversa como bacterias, virus, hongos, parásitos, células infectadas por virus y algunas células tumorales. La iniciación de esta vía se da cuando el C3, modificado en el tioéster por agua (C3H₂O), sufre un cambio y expresa una conformación y función del tipo C3b

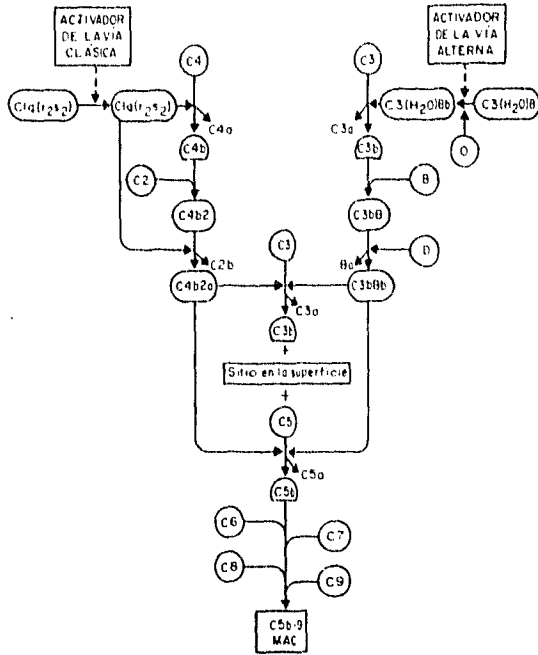


Figura 1. Diagrama que representa las vías de activación del complemento que culminan con el ensamblaje del complejo de ataque a membranas. La vía clásica (izquierda) se dispara por complejos inmunes y la vía alterna (derecha) se activa por una gran variedad de compuestos y superficies celulares.

llamado C3i. El C3i se une al factor B y este complejo es roto por el factor D. Se forma la convertasa de C3 de la vía alterna que rompe al C3 en C3a y C3b. Cada molécula de C3b puede formar una convertasa de C3, por lo que se producen muchas enzimas en la superficie celular y en la fase fluida. La formación indiscriminada de convertasas de C3 se evita con la acción de los factores H e I. El factor H compite con B por la unión a C3b y facilita la disociación de C3bBb. El factor I hidroliza a C3b. La properdina estabiliza las convertasas de C3 y C5 de la vía alterna, lo que impide el decaimiento de estas enzimas.

IV. LA VIA MEMBRANOLITICA

Esta vía se inicia con el rompimiento de C5 en C5a y C5b. El C5b forma un complejo con C6 que se une a la membrana celular y a este complejo se unen C7 y C8. El complejo C5b8 permite la asociación y polimerización de C9 y la formación de las lesiones. Las lesiones producidas por el complejo de ataque a las membranas permiten el intercambio de pequeñas moléculas e iones y la entrada de agua, lo que provoca que las células se hinchen y se lisen.

El complemento puede participar en el daño a los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* por mecanismos como lisis provocada por la acción del complemento en forma dependiente o independiente de anticuerpos y muerte de las amibas mediada por células fagocíticas (1).

V. ACTIVACION DEL COMPLEMENTO POR *Entamoeba histolytica*

En los primeros estudios sobre la interacción de *E histolytica* y el complemento se demostró que los trofozoítos de las cepas HK9 y NIH200 eran lisados por suero de humano normal (SHN) a una concentración mayor de 10% v/v. La lisis de amibas con suero adsorbido con trofozoítos mostró que el efecto lítico se debía al complemento y no a los anticuerpos. La participación del complemento en el efecto citopatógeno (ECP) del suero de humano sobre *E histolytica* se demostró por la inhibición de éste por calentamiento a 56°C por 30 minutos, por la adición de zimósán, factor del veneno de cobra (CVF), EDTA o EGTA. En el último tratamiento el ECP se restauró al añadir, además de EGTA, iones de magnesio (0.3 mM). Esto demostró la participación de la vía alterna del complemento, ya que la activación de la vía alterna requiere de la presencia de iones de magnesio, a diferencia de la activación de la vía clásica que requiere iones de calcio. Además, los trofozoítos de *E histolytica* indujeron la conversión del componente B en Bb y Ba (2). La incubación del suero con *E histolytica* causó una disminución de los niveles de complemento determinados en el sobrenadante de la reacción. Al analizar los niveles de los componentes C1, C4, C2 y C3 en el suero adsorbido con trofozoítos, se encontró que el nivel de C3 se redujo significativamente, mientras que los niveles de C1, C2 y C4 mostraron una leve disminución. Esto fue una demostración más de que las amibas eran lisadas por la activación de la vía alterna (2). Otros autores también demostraron esto utilizando suero de cebra y deficiente en C4, con el cual no hubo lisis de *E histolytica* (3).

En otros experimentos se demostró que la amiba activa también al complemento por la vía clásica. El uso de sueros deficientes en componentes requeridos para la activación de las vías del complemento permitió conocer que la superficie de la amiba promueve la activación del complemento por la vía clásica, sin la participación de anticuerpos específicos

(4). Estos autores probaron la activación del complemento al medir el depósito de C3 y la lisis celular. Al incubar trofozoítos con suero de humano normal adicionado con $I^{125}C3$, éstos unieron moléculas de C3b a sus membranas en ausencia de anticuerpos específicos.

VI. COMPONENTES AMIBIANOS QUE PARTICIPAN EN LA ACTIVACION DEL COMPLEMENTO

La superficie celular de la amiba, rica en carbohidratos, es un contribuyente muy importante en el consumo de componentes de las vías clásica y alterna del complemento en la fase fluida (4 y 5). Actualmente se sabe que una de las proteasas amibianas, la proteasa neutra de cisteína de 56 kDa, activa al sistema del complemento por el rompimiento de C3 en la fase fluida (6). La degradación del C3 se da en la cadena α entre los residuos Ser y Asn en las posiciones 78 y 79, de manera muy similar a la ruptura de C3 por las convertasas.

VII. LA RESISTENCIA AL COMPLEMENTO COMO UN FACTOR DE PATOGENIA DE *Entamoeba histolytica*

Los trofozoítos que infectan tejidos parecen ser refractarios al daño por complemento. Para demostrar las diferencias en sensibilidad al complemento se han empleado muestras clínicas cultivadas en condiciones que imitan las del intestino del humano por la adición de bacterias y almidón. Según Reed y colaboradores (7), la resistencia o susceptibilidad al complemento está correlacionada con los zimodemos de los trofozoítos aislados. Las amibas mantenidas en medio de Robinson con zimodemo I y III no patógenos fueron susceptibles a la lisis por la activación de la vía alterna del complemento. Por el contrario, 9 de 11 cepas patógenas (zimodemos II, IX y XIV) cultivadas bajo condiciones idénticas, fueron resistentes a la muerte por complemento (7).

Otros autores probaron la susceptibilidad al suero de humano y de hámster en amibas patógenas, con diferente grado de virulencia, crecidas en medio axénico y medida por la formación de abscesos hepáticos en hámster. Encontraron que las amibas capaces de inducir los abscesos hepáticos en el hámster son resistentes al complemento y tienen la capacidad de consumir componentes del comple-

mento, mientras que las amibas que no son capaces de inducir abscesos son susceptibles al complemento. De acuerdo a estos resultados, los trofozoítos deben adquirir resistencia al complemento para poder sobrevivir dentro del animal y desarrollar las lesiones hepáticas (8). Además, las condiciones de crecimiento son un factor muy importante en el desarrollo de la resistencia a la lisis por complemento. En otro estudio hecho con aislados recientes de amibas patógenas y no patógenas se reportaron resultados diferentes a los mencionados anteriormente. Estos autores observaron que los aislados patógenos eran lisados por la activación de la vía alterna, mientras que los aislados recientes no patógenos fueron insensibles a la lisis dependiente de la activación por la vía alterna (9).

Para lograr comprender como *E histolytica* invade ciertos órganos del huésped en presencia del complemento, se cultivaron trofozoítos en un medio adicionado con suero normal de humano y se probó su sensibilidad a la lisis. Las amibas de la cepa HM1 y la clona 5C1, derivada de esta cepa, fueron tratadas repetidamente con suero normal de humano y mostraron una susceptibilidad reducida a la lisis por complemento. La resistencia fue revertida cuando el tratamiento con suero normal de humano fue suspendido (10). Estos autores sugieren que la resistencia es una capacidad adquirida y no el resultado de un proceso de selección de una subclona genéticamente resistente. Esta resistencia depende de la presencia continua de suero, lo que sugiere que es inducida por el complemento.

VIII. ACTIVACION DEL COMPLEMENTO POR AMIBAS SENSIBLES Y RESISTENTES AL SUERO DE HUMANO

Las amibas sensibles y las resistentes al suero son capaces de activar al complemento. Ambas cepas consumen componentes del complemento en forma rápida, demostrado por la cantidad de suero requerida para lisar el 50% de eritrocitos (CH_{50}) y actividades hemolíticas de C3, C7 y C59. Cuando ambas cepas se incuban con $I^{125}C3$ en presencia de SHN al 10%, la cadena alfa de C3 en la fase fluida se rompe en C3b o C3bi. Por otro lado, en la superficie celular sólo se localizan moléculas de C3 con la cadena alfa intacta (11). Se sugiere que las cepas sensibles al complemento se lisan por una reacción que incluye el ensamblaje del complejo de ataque a las membra-

nas iniciado por el rompimiento de C3 en la fase fluida (11).

Otros autores probaron la unión de C3 a diferentes aislados de *E histolytica*. Al determinar cuantitativamente el C3 unido a las amibas de un aislado patógeno, un aislado patógeno pasado por hígado de hámster y un aislado no patógeno, observaron que las amibas patógenas sensibles al complemento unieron más productos de C3 que las amibas resistentes al complemento. Los productos de C3 unidos covalentemente a los parásitos fueron C3bi y C3d (9). Estos autores adjudican las diferencias en sus resultados, con respecto a lo observado anteriormente, a que en el primer estudio las amibas fueron incubadas a una concentración de suero del 10%. Esta concentración subfísica de suero pudo resultar en una activación del complemento insuficiente para detectar C3b en la superficie del parásito.

El mecanismo por el cual estos organismos evaden la destrucción mediada por los componentes citolíticos no se conoce. Es probable que las cepas patógenas de *E histolytica* utilicen mecanismos similares a los descritos para otros parásitos para evadir la lisis por el complemento.

Como un acercamiento en la búsqueda de un mecanismo de resistencia al complemento en *E histolytica* similar a los encontrados en otros parásitos, Braga y colaboradores (12) utilizaron amibas cultivadas en presencia de suero de humano (resistencia 50% mayor que en amibas no cultivadas), para inmunizar ratones A/J e identificaron dos clones que aumentaron la lisis de *E histolytica* por el suero de humano. Este aumento en la lisis se presentó en amibas expuestas a las proteínas de C5b-9 en ausencia de cualquier otro componente, se dio con los fragmentos Fab del anticuerpo, no hubo lisis en presencia del anticuerpo solo o sin C9 y el anticuerpo aumentó la unión de I^{125} -C9 a las amibas de la cepa HM1 resistente al suero. El componente celular afectado por el anticuerpo monoclonal es intrínseco a la membrana de la amiba y no derivado del suero, ya que el efecto se observó en amibas resistentes a suero humano preparadas sin la presencia de éste. Estos resultados sugirieron que el anticuerpo 3D12 potenciaba la activación de C9 por el C5b-8, posiblemente al neutralizar un inhibidor de la formación del poro. El anticuerpo monoclonal 3D12 inmuno pre-

cipitó una proteína que migraba junto con la subunidad de 170 kDa de la lectina específica para galactosa o "adhesina". Esta adhesina es uno de los principales componentes de la superficie celular de la amiba. La adhesina purificada por afinidad redujo en un 90% la lisis mediada por los componentes del complejo C5b-9 y este efecto fue parcialmente revertido por la adición del anticuerpo 3D12. Se demostró que la adhesina específica para galactosa une C8 y C9 e inhibe la lisis de amibas sensibles en el punto del ensamblaje de C8 y C9. Esto la hace similar a la proteína reguladora del complemento, el CD59, cuya función parece residir en su capacidad de unirse a C8 y C9 en el complejo C5b-9.

Por medio de estudios de citofluorometría se encontró que un anticuerpo monoclonal contra CD59 reconoce una molécula fuertemente expresada en la cepa de *E histolytica* HM1: IMSS. Se comparó la reactividad cruzada entre dos cepas de *E histolytica* HM1: IMSS y la mutante BG3, que es menos virulenta en términos de producción de abscesos hepáticos en el hámster y se observó que la marcación fue sustancialmente más intensa en la cepa altamente virulenta (intensidad de fluorescencia media MFI = 249.7) que en la mutante BG3 (MFI = 102.3) (13).

En otros experimentos se observó que la resistencia al complemento inducida en *E histolytica* patógena, por el paso por hígado de hámster, fue completamente abolida por fijación en glutaraldehído o tratamiento con tripsina y se revirtió parcialmente con citocalasina B. El efecto de la tripsina dependió del tiempo entre el tratamiento con la enzima y la exposición al complemento y resultó en un incremento del doble en la cantidad de productos de C3 unidos a las amibas, por lo que estos autores piensan que un factor, sensible a tripsina, interfiere con la amplificación de la vía alterna. A diferencia de lo encontrado con las amibas patógenas, la resistencia al complemento de las formas no patógenas no se vio afectada por ninguno de los componentes usados. Al fijar en glutaraldehído a las amibas resistentes y a las sensibles al complemento, no sólo fueron altamente susceptibles a la lisis sino que también unieron cantidades similares de productos de C3. Bajo estas condiciones la unión de C3 fue siete veces mayor que en las amibas no tratadas. Esto sugiere que los mecanismos que intervienen en la resistencia al complemento difieren entre amibas patógenas y no patógenas (14).

IX. LA ACTIVACION DEL COMPLEMENTO EN EL DESARROLLO DE LA AMIBIASIS

El papel de la activación del complemento en el rechazo de la infección amibiana *in vivo* fue estudiado en hámster tratados con CVF e inoculados posteriormente con *E histolytica*. El tratamiento con el CVF resultó en una disminución del complemento por al menos dos días, lo cual fue mostrado por la actividad hemolítica del suero y provocó en estos animales pérdida de peso, mayor frecuencia y gravedad en las lesiones hepáticas y disminución en el tiempo de sobrevivencia, en comparación con los animales control (15). Los hámster tratados con el CVF y los controles mostraron títulos similares de hemaglutinación directa. Esto indica que la frecuencia y exacerbación de los abscesos hepáticos en el hámster no parecen deberse a una alteración o supresión de la respuesta de anticuerpos a las amibas.

El desarrollo de la infección amibiana en el humano es un fenómeno multifactorial en donde el complemento juega un papel muy importante en la relación huésped-parásito. La presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie indica que el complemento puede ser activado por

la vía clásica. Los pacientes con abscesos hepáticos amibianos presentan niveles variables de complemento dependiendo de la fase del absceso. En general, los niveles de C3 son bajos y los de C1q son normales. Esto sugiere que la vía alterna es activada o que el daño hepático puede disminuir la producción de C3. Por otro lado, se ha observado que las concentraciones plasmáticas de C3d están elevadas en pacientes con padecimientos hepáticos crónicos, independientemente de las concentraciones séricas de C3.

CONCLUSIONES

La resistencia de *Entamoeba histolytica* a una de las defensas del hospedero, como lo es el complemento, representa un factor muy importante en la invasividad de este parásito. Los trofozoítos son capaces de desarrollar resistencia al complemento si se cultivan en presencia continua de suero. Las cepas resistentes y susceptibles al suero activan y consumen los componentes iniciales del complemento en la misma forma y al mismo grado, por lo que la resistencia a este mecanismo de defensa del huésped debe radicar en la forma como las amibas impiden el ensamblaje del complejo de ataque a las membranas.

REFERENCIAS

1. Calderón J (1988) The role of complement in host defense against *Entamoeba histolytica*. En Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*, Editor: Ravdin, JI, John Wiley and Sons, New York, pp453-463.
2. Ortiz-Ortiz L, Capin R, Capin N R, Sepúlveda, B y Zamacona G (1978) Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. Clin Exp Immunol 34: 10-18.
3. Huldtt G, Davies P, Allison A C y Schorlemmer H U (1979) Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. Nature 277: 214-217.
4. Calderón J y Schreiber R D (1985) Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. Infect Immun 50: 560-565.
5. Reed S L, Curd J G, Gigli I, Gillin F D y Braude A I (1986) Activation of complement by pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Immunol 136: 2265-2270.
6. Reed S L, Keene W E, Mc Kerrow J H y Gigli I (1989) Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. J Immunol 143: 189-195.
7. Reed S L, Sargeant P G y Braude A I (1983) Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Trans R Soc Trop Med Hyg 77: 248-253.
8. Mogyoros M, Calef E y Gitler C (1986) Pathogenicity of *Entamoeba histolytica* correlates with the capacity to develop complement resistance. Isr J Med Sci 22: 915-917.
9. Hamelmann C, Foerster B, Burchard G D, Shetty N y Horstmann R D (1993) Induction of complement resistance in cloned pathogenic *Entamoeba histolytica*. Par Immunol 15: 223-228.
10. Calderón J y Tovar R (1986) Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* HM1 by treatment with human serum. Immunology 58: 467-471.
11. Reed S L y Gigli I (1990) Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. J Clin Invest 86: 1815-1822.
12. Braga L L, Ninomiya H, McCoy J J, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims P J y Petri W A Jr (1992)

Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 90: 1131-1137.

13. Flores-Romo L, Tsutsumi V, Estrada-García T, Shibayama M, Aubry JP, Bacon KB y Marínez-Palomo A (1994) CD59 (protectin) molecule, resistance to complement, and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 88: 116-117.
14. Hamelmann C, Urban B, Foerster B y Horstmann R D (1993) Complement resistance of pathogenic *Entamoeba histolytica* mediated by trypsin-sensitive surface component(s). *Infect Immun* 61: 1636-1640.
15. Capin R, Capin N R, Carmona R, Ortiz-Ortiz L (1980) Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscesses in the hamster. *Arch Invest Méd (Méx)* 11: 173-180.

Version corregida reenviada el 13 de Mayo de 1996

RH: GUTIERREZ-KOBEN ET AL. - COMPLEMENT RESISTANCE OF E. HISTOLYTICA

A MECHANISM OF ACQUIRED RESISTANCE TO COMPLEMENT MEDIATED LYSIS BY ENTAMOeba HISTOLYTICA

Laila Gutiérrez-Kobeh, Wallely Cabrera and Ruy Pérez-Montfort

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México.

Corresponding author: Dr. Ruy Pérez-Montfort
Departamento de Microbiología
Instituto de Fisiología Celular
U.N.A.M.
Apartado Postal 70242
04510 México D.F., MEXICO
Tel. +52 5 622 5657

ABSTRACT: Some Entamoeba histolytica strains resist complement mediated lysis by serum. Both susceptible and resistant strains activate the complement system equivalently, but resistant amoebas evade killing by membrane attack complexes. Our objective was to determine the mechanism by which trophozoites of E. histolytica resist lysis by human serum. Amoebas were made resistant to lysis by incubations with increasing concentrations of normal human serum. The possibility that resistant cells ingest membrane attack complexes was explored by subcellular fractionation of susceptible and resistant trophozoites treated with sublytic concentrations of human serum containing radiolabeled C9. In both cases, most of the label was found associated to the fractions containing plasma membrane. In equivalent conditions, the susceptible strain consistently showed more label associated to these fractions than the resistant strain. Thus, the possibility that the membrane attack complexes were released to the medium was explored. Both resistant and susceptible trophozoites release to the medium similar amounts of material excluded by Sepharose CL-2B in the presence or absence of normal human serum. Labeled C9 elutes, together with the main bulk of proteins from the medium, indicating that it is not in vesicles or high molecular weight aggregates. Coincubation of susceptible amoebas with lysates of resistant trophozoites makes

susceptible cells resistant within 30 min. Resistance to lysis by serum can also be acquired by susceptible amoebas after incubation with lysates from human erythrocytes or after feeding them with whole human red blood cells. Resistant trophozoites show intense immunofluorescent staining on their surface with anti-human erythrocytic membrane antibody, whereas susceptible cells do not. These results suggest that resistant strains of amoebas acquire resistance to lysis by serum by incorporating into their membranes complement regulatory proteins.

INDEX DESCRIPTORS: Entamoeba histolytica, complement, lysis resistance, mechanism.

Complement mediated lysis has been described as a host defense mechanism against different parasites and other organisms causing infectious diseases. In general pathogenic strains are more resistant to its action because they have developed different evasion strategies involving some aspect of complement activation (Joiner, 1988).

The interaction of complement with the protozoan Entamoeba histolytica has been studied for over 15 yr and most of the work has been focused on its activation by the trophozoite. It has been established that virulent strains generally resist lysis by fresh human serum, whereas non virulent strains do not (Reed et al., 1983). There are no significant differences in the activation of complement by resistant and susceptible strains (Reed et al., 1986). Activated terminal complement components C5b6, C7, C8, and C9 are able to lyse both resistant and susceptible strains to a similar extent (Reed and Gigli, 1990). On the other hand, an in vitro method has been developed that produces loss of susceptibility to complement lysis by exposing trophozoites to a series of treatments with normal human serum (Calderón and Tovar, 1986). Trophozoites made resistant to lysis by normal bovine serum using this method showed resistance to lysis by normal sera from hamster and human and also showed an enhanced capacity to produce amebic liver abscesses in hamsters (Mogyoros et al., 1986). This

was interpreted as evidence that resistance to lysis by normal serum also increases the virulence of the strain.

There are currently a few indications as to the mechanism by which amebas become resistant to complement and actually evade the action of the terminal components of the cascade. Calderón and Tovar (1986) suggested that resistance to lysis is an acquired rather than a genetic property, since susceptibility to lysis was regained within 6 wk after treatments with normal serum were terminated. Braga et al. (1992) have suggested that the galactose-specific adhesin mediates the inhibition of the C5b-9 or membrane attack complex (MAC) (because of its sequence similarity and antigenic crossreactivity with CD59, an inhibitor of MAC in human blood cells), by molecular mimicry and shared complement inhibitory functions. Flores-Romo et al. (1994) observed that virulent HMI-IMSS strain had a mean fluorescence intensity which was almost two and a half times higher than that of the non virulent mutant BG3 of the same strain, when stained with a rat monoclonal antihuman CD59 and FITC-labeled sheep antirat F(ab')₂ fragments as secondary antibody and analyzed by flow cytometry. They conclude that the parasite contains a CD59-like molecule and uses the strategy of molecular mimicry of complement regulatory proteins to evade the host.

In this work we have analyzed the mechanism by which trophozoites of E. histolytica evade lysis by serum. Initially, we tried to determine if they internalize or release the MAC, as has been observed for several nucleated eukaryotic cells (Carney et al., 1985; Morgan, 1989). Since our results were negative, we tested if resistance could be transferred by coinubation with lysates of resistant cells. We found that susceptible amebas could acquire lysis resistance within 30 min of coinubation. Since virulent amebas have a high rate of erythrophagocytosis, we also investigated if they could acquire complement regulatory molecules from this source. Our results show that this is indeed the case, and suggest that this may be an important mechanism by which trophozoites resist complement lysis.

MATERIALS AND METHODS

Trophozoites of E. histolytica strain HM1:DM33 were cultured axenically in TYI-S-33 medium at 36.5 C (Diamond, 1983). The cells were harvested at either 48 or 72 hr and washed twice with phosphate buffered saline for amebas (PBS-A) consisting of 1 part 150 mM phosphate buffer pH 7.2 and 9 parts 190 mM NaCl.

Amebas resistant to lysis by human serum were prepared according to the method of Calderón and Tovar (1986). Briefly, 1×10^8 cells were incubated for 2 hr at 37 C in modified TYI-S-33 medium, with 500 μ M MgCl₂ and 150 μ M CaCl₂ and fresh human serum. After this incubation, the cells were centrifuged and the medium with human serum was replaced by the usual medium containing bovine serum. The cell number was determined after 24 hr and readjusted to the initial number and the treatment with medium containing fresh human serum was repeated. The initial concentration of fresh human serum was 10% (v/v) and was increased in 5% intervals to 40%. Once resistance to lysis was achieved (after 120 days) it was maintained by periodic treatments with fresh human serum (100%) during 2 hr.

For control experiments with decomplexed serum, 1 ml fresh human serum was sequentially treated 5 times with 1 mg

of Zymosan. Under these conditions we did not find any residual complement activity.

For the lysis assays, 200 μ l with 3×10^5 trophozoites were mixed with 200 μ l of fresh or Zymosan inactivated human serum. The final concentrations of serum were 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50% (v/v). Serum was diluted in Veronal saline buffer for amoebas (VBS-A) which contained 5 mM diethylbarbiturate, 500 μ M $MgCl_2$, 15 μ M $CaCl_2$, and 193 mM NaCl, pH 7.2. The mixtures were incubated at 37 C for 30 min and the cells were resuspended every 8 min. They were centrifuged at 164 g for 10 sec to eliminate the serum. The residual trophozoites were resuspended in 250 μ l of TYI-S-33 medium to count viable cells, using phase contrast microscopy in a modified Neubauer chamber. The percentage of lysis was defined as the reduction of viable amoebas in fresh human serum compared to that in inactivated human serum, as follows:

$$\frac{(\text{viable cells in control} - \text{viable cells in fresh serum})}{\text{viable cells in control}} \times 100$$

Susceptibility to lysis under equal complement concentrations in the lytic assay was defined as the quotient of:

$$\frac{\% \text{ lysis for amoebas pretreated with fresh serum}}{\% \text{ lysis for amoebas pretreated with inactivated serum}} \times 100$$

Human C9, was purified as described previously (Biesecker and Müller-Eberhard, 1980; Hammer et al., 1981). For some experiments, 27.5 μ g of C9 were iodinated to a specific activity of 1-2 μ Cl/ μ g with 1 washed iodobead (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois) at 4 C for 5 min. Free iodine was removed as previously described (Tuszynski et al., 1980). With this procedure, the radiolabeled protein retained between 45 and 100% of the specific hemolytic activity. Subcellular fractions of trophozoites incubated with sublytic concentrations of serum containing ^{125}I C9 were obtained as described by Rosenberg and Gitler (1985).

Release of high molecular weight material, such as vesicles, by trophozoites to the medium was analyzed by incubating 10×10^5 trophozoites in different conditions (see Results), centrifuging the cells at 500 g, and passing 0.5 ml of supernatant through a Sepharose CL-2B column (1 \times 20 cm) (Morgan et al., 1987). Fractions of 0.3 ml were collected and read at 280 nm in a spectrophotometer and counted in a gamma radiation counter, when necessary. Human serum deficient in C9, used in some experiments, was purchased from Sigma (St. Louis, Missouri).

Amebic lysates of susceptible and resistant amebas were prepared by washing 10×10^6 trophozoites with PBS-A and subjecting them to 10 freeze-thaw cycles. After this, N-[N-(L-3 transcarboxyan-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine (E-64) was added to a final concentration of $10 \mu\text{M}$. Some of these lysates were heated at 60 C for 30 min, put in a boiling water bath for 3 min or centrifuged at $436,000 \text{ g}$ in a Beckman tabletop ultracentrifuge.

Human erythrocyte lysates were prepared by obtaining 5 ml of normal human blood and diluting them into 5 ml of sterile Alsevers solution. The red cells were washed 3 times in 2.3% dextrose, 0.1% gelatin, 5 mM diethyl barbiturate, $150 \mu\text{M CaCl}_2$, 1 mM MgCl_2 , pH 7.4 (DGVBS¹), and were counted in a hemacytometer. From a solution containing 8.8×10^8 cells/ml in DGVBS¹, 300 μl were lysed by adding 500 μl distilled water. Isotonic salt concentrations for amebas were restored by adding NaCl to a final concentration of 190 mM.

Susceptible trophozoites were exposed to different lysates by washing 5×10^6 cells with PBS-A and then incubating them in 200 μl of lysate for 30 min at 37 C . The supernatant was eliminated by centrifugation and the pellet was resuspended in PBS-A to give a final concentration of

1.5×10^6 cells/ml. Samples of 200 μl were taken to perform the lysis experiments described above.

Phagocytosis of red cells was performed by adding 500 or 750 μl of human erythrocyte suspension (8.8×10^8 cells/ml) to a 25 cm^3 tissue culture flask of a 48 hr culture of trophozoites (9 or 10×10^6 cells) in sterile conditions and cultivating the amebas for another 48 hr. Cells were then harvested and the resistance to complement lysis was determined as previously described.

In order to observe the proteins from the erythrocyte membrane incorporated to the amebas, 5×10^6 trophozoites were fed for 48 hr with ^{125}I erythrocytes labeled with lactoperoxidase (Marchalonis, 1969). Briefly, two 50 ml conical tubes each containing 2 ml of a suspension of 5×10^6 cells/ml were incubated with 1 mCi Na^{125}I and 200 μl of lactoperoxidase (5 mg/ml). 40 μl of hydrogen peroxide (0.03%) were added to each tube at 0, 2, 4 min of incubation at 37 C . At 6 min, 50 ml of cold DGVBS¹ were added to each tube and cells were washed exhaustively. Iodinated erythrocytes were added to a 25 cm^3 tissue culture flask of a 48 hr culture of trophozoites (9 or 10×10^6 cells) in sterile conditions and cultivating the amebas for another 48 hr. Cells were then harvested, washed extensively, fractionated as described by Rosenberg and Gitlin (1985) and counted for

¹²⁵I. Subsequently, individual fractions were precipitated with trichloroacetic acid (10% final concentration), incubated in ice for 1 hr and centrifuged at 109,000 g for 1 hr. Precipitates and supernatants were also counted for ¹²⁵I.

Alternatively, some amebas fed with ¹²⁵I erythrocytes as described above, were lysed with homogenization buffer which contained 100 mM Tris pH 7.4, 250 mM sucrose, 10 μ M E-64 (final concentration) and centrifuged at 109,000 g for 1 hr. Sedimented material was resuspended in sample buffer and electrophoresed in 12.5% slab gels according to Laszli (1970). A lysate of ¹²⁵I erythrocytes was also electrophoresed as a control. Gels were dried in a gel dryer (BioRad, Richmond, California) and the lanes were cut into 2 mm slices and counted for ¹²⁵I.

Rabbit antiserum against human erythrocyte membrane antigens was obtained from Dako Corporation (Carpinteria, California). Secondary antirabbit IgG antibodies coupled to fluorescein were obtained from Zymad (San Francisco, California).

Immunofluorescence of trophozoites was performed as follows: some susceptible trophozoites were made resistant by incubation with amebic lysates or by erythrophagocytosis, as previously described. All 3 types of cells (1×10^6) were fixed in either cold methanol or cold 70% ethanol with

equivalent results. They were washed three times with VBS-A and incubated for 1 hr at 4 C with a 1:10 dilution of the rabbit antiserum against human erythrocyte membrane antigens. The cells were washed 3 times with VBS-A and incubated for 1 hr at 4 C with a 1:20 dilution of the secondary antibody in 10% normal goat serum and VBS-A. After washing the cells 3 times in VBS-A they were observed in a fluorescence microscope or analyzed by flow cytometry in an Epics II cytofluorometer (Coulter Electronics, Hialeah, Florida).

RESULTS

Trophozoites resistant to lysis by serum were obtained according to the method described by Calderón and Tovar (1986). Lysis tests were performed by incubating the resistant and susceptible cells with fresh or Zymosan treated serum at concentrations of 10, 15, 20, 30, 40 and 50%. Figure 1 shows representative results of several tests in which a mean of 94.3% of susceptible amebas and a mean of 30% resistant amebas were lysed by fresh human serum at a concentration of 50% (v/v).

The fixation kinetics of radiolabeled C9 in fresh serum for susceptible and resistant amebas was practically identical for both susceptible and resistant amebas. More than 90% of the counts bound within 60 min at 37 C were already bound to the cells within 15 min of adding serum containing 125 I-C9 (data not shown).

We tested for the possibility that trophozoites internalized membrane attack complexes by incubating susceptible and resistant trophozoites with 10% serum containing radiolabeled human C9 for 30 min at 37 C. After washing of the incubation medium cells were washed twice with cold PBS-A. Each cell pellet was then subjected to the subcellular fractionation method of Rosenberg and Gitler (1985). Figure 2 shows a representative experiment in which protein was determined in each fraction as an internal

control. The discontinuous line shows the radioactivity due to C9 in a peak centering around fraction 15 for both the susceptible (A) and the resistant (B) trophozoites. In this method, fractions 12-18 have been identified as those being most enriched in plasma membrane markers (Rosenberg and Gitler, 1985). There seem to be no significant differences in distribution of the counts indicating that C9 is associated to the plasma membrane, but the size of the peak for susceptible amebas was consistently higher than that of the resistant amebas. Table I shows the relative values obtained for the peaks in several experiments. These data demonstrate that more C9 is bound per cell by susceptible amebas than by resistant amebas.

Since resistant amebas could be eliminating part of the MAC by shedding it to the medium, we tested for this possibility by incubating susceptible and resistant amebas with fresh serum, serum deficient in C9 or PBS-A, for 1 hr at different temperatures, and analyzed the components shed into the medium by centrifuging the cells for 5 min at 500 g and passing the supernatant through a Sepharose CL-2B column (20 x 1 cm). Vesicles shed by amebas should appear in the first fractions collected and free proteins should appear afterwards. Figure 3 shows the elution pattern observed in both susceptible and resistant amebas incubated with normal human serum (A and B, respectively), human serum deficient in C9 (C and D), PBS-A (E and F), and normal human serum

containing ^{125}I C9 (G and H) for 1 hr at 37 C. There were no differences in the elution patterns between susceptible and resistant amebas. The formation of vesicles, demonstrated in the peak observed in fraction 7, was independent of the medium of incubation and ^{125}I C9 was not associated to this fraction (see G and H). This indicates that amebas do not eliminate C9 by shedding it in vesicles.

Since trophozoites did not internalize or shed the MAC on their membrane, the possibility that they acquire molecules that regulate the membranolytic pathway of complement fixation was explored. This was done by preparing extracts of both susceptible and resistant trophozoites from 10×10^6 cells by freeze-thaw cycles in the presence of $10 \mu\text{M}$ E-64 (final concentration). Two lots of the same susceptible trophozoites were incubated with the corresponding extract for 30 min at 37 C. After centrifugation the supernatant was eliminated and the cells were resuspended at a concentration of 1.5×10^6 cells/ml and incubated with serum as previously described. Figure 4 shows that the incubation of susceptible amebas with extracts of resistant cells increased their resistance to lysis in fresh human serum to levels similar to those of resistant cells, whereas those incubated with the extract of susceptible cells remained similar to the corresponding control. Thus, susceptible trophozoites could be made resistant to lysis by serum in 30 min of incubation.

17

Since the transference of resistance to complement lysis by this method is reminiscent of that used to protect antibody coated sheep red blood cells from complement attack (Hoffman, 1969), we speculated that perhaps amebas could become resistant by incorporating regulatory molecules for the membranolytic pathway from phagocytosed erythrocytes or erythrocyte products in the medium. To test this hypothesis, the following experiment was performed. A lysate of human erythrocytes was prepared by hemolysing them in distilled water. This lysate was incubated in a proportion of 1000:1 (erythrocytes:trophozoite), with susceptible amebas for 30 min at 37 C. After washing the amebas they were resuspended at a concentration of 1.5×10^6 cells/ml and a lysis assay was performed as described previously. Figure 5 shows that susceptible amebas incubated with erythrocyte lysate show a similar degree of lysis resistance to fresh serum than susceptible amebas incubated with lysate from resistant amebas and to amebas made resistant to lysis by repeated treatments with fresh serum.

Experiments in which whole human erythrocytes were phagocytosed by trophozoites also gave similar results. Human erythrocytes in a proportion of 450 or 750 per ameba were added to a 25 cm² tissue culture flask and the trophozoites were cultured additionally for 48 hr. Amebas were then washed and resuspended to a final concentration of 1.5×10^6 /ml and a lysis assay was performed as described

18

previously. The cells became more resistant to lysis by serum after 48 hr of having ingested red blood cells, and this resistance correlated with the proportion of erythrocyte: trophozoites within this range (Figure 6). Trophozoites did not grow well in the presence of higher numbers of erythrocytes per ameba.

To test if amebas incorporated erythrocyte components that made them resistant to lysis by serum, immunofluorescence studies of susceptible and resistant amebas, prepared by the 3 methods described previously were performed using an antiserum to human erythrocyte membrane antigens. Susceptible amebas fluoresced less intensely under microscopic inspection than trophozoites made resistant to lysis by different methods (Figure 7). Quantitative analysis of fluorescence by flow cytometry showed that cells resistant to lysis had a mean fluorescence intensity several orders of magnitude higher than susceptible trophozoites (Table II).

The fate of erythrocyte membrane proteins in amebas was followed by feeding surface iodinated red cells to trophozoites (400 erythrocytes per ameba) and culturing them for 48 hr. Amebas were then washed and resuspended at a final concentration of 2.5×10^6 /ml and lysed. Subcellular fractions were obtained as described and the fractions counted. Figure 8 A shows that most of the counts were present in fractions 12 to 18, which correspond to amebic

plasma membrane. Figure 8 B shows that over 80% of the counts were precipitated by trichloroacetic acid in those fractions, while the counts in fractions containing other subcellular components showed less precipitability.

The sedimented material of amebic lysates obtained from trophozoites that had ingested surface iodinated erythrocytes 48 hr earlier, was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. Figure 9 shows that radioactive bands that correspond to some of the intact proteins labeled by lactoperoxidase in erythrocyte membranes are also present in the crude membrane fraction of trophozoites. Erythrocytes show labeled bands with Mr of 97, 78, 43 and 25 kDa with a steep rise in counts near the buffer front of the gel. Amebic membranes also show a big peak with an Mr of 97 kDa, two small peaks at 78 and 43 kDa and two big peaks centering at 33 and 25 kDa.

DISCUSSION

The results of this work show that one of the mechanisms by which trophozoites of *E. histolytica* become resistant to lysis by serum is the incorporation into their membrane of erythrocyte molecules, and perhaps other molecules from the medium, that regulate the membranolytic pathway of complement fixation. This observation is consistent with several other findings that have been reported for pathogenic amebas (Triassi et al., 1978; Rivera et al., 1984; Mora-Galindo and Anaya-Valázquez, 1993; Flores-Romo et al., 1994).

Phagocytic capacity and increased rates of phagocytosis of human erythrocytes are characteristic of pathogenic strains (Triassi et al., 1978). Up to 50 erythrocytes per trophozoite of *E. histolytica*, strain HM1:IM45, have been observed, with a mean around 8. The cytoplasm of the erythrocyte is digested relatively rapidly but its membrane persists in the vacuoles for hrs and is degraded much more slowly (Mora-Galindo and Anaya-Valázquez, 1993). Thus, pathogenic amebas with a higher digestion rate and digesting more erythrocytes, could incorporate more regulatory molecules into their membranes. Also, regulatory proteins present in the serum of the culture medium or in the fresh human serum to which amebas are exposed, could incorporate

into the trophozoite plasma membrane, like other culture medium proteins (Rivera et al., 1984).

This could explain why *E. histolytica* reacts with a polyclonal antibody against erythrocyte membrane antigens (Figure 8 and Table II) and a monoclonal antibody to human CD59 (Flores-Romo et al., 1994). Although *E. histolytica* antigens crossreact with antiCD59 antibodies (Braga et al., 1992), our experiments suggest that the latter can recognize a crossreacting molecule or human CD59 incorporated from the culture medium.

Lysates of resistant amebas transmit the property of resistance to lysis to susceptible cells within 30 min (Figure 4). Erythrocytes are also able to do this directly as a lysate or after some time when ingested whole by trophozoites (Figures 5 and 6).

Several lines of evidence indicate that some erythrocyte membrane molecules are transferred intact to the amebic surface. The reactivity with antibody against human erythrocyte membrane antigens in resistant cells (Figure 7 and Table II) increases. Trichloroacetic acid precipitable red blood cell membrane proteins are found mainly in subcellular fractions with amebic plasma membrane (Figure 8). Electrophoretic analysis of crude amebic membranes obtained from amebas that phagocytosed surface labeled erythrocytes 48 hr earlier, show bands observed in intact red cell membranes. In particular, labeled proteins that

have the Mr of band 3 (Mr 97 kDa), band 4.1 (Mr 70 kDa) and actin (Mr 43 kDa) (Repasky and Gregorio, 1991) are visible in both preparations (Figure 9). Thus, other molecules from erythrocyte membranes, including complement regulatory proteins, should have the same fate.

The variability of resistance to lysis by serum (compare the resistance of the S or R strains in Figures 1, 4, 5, and 6) can be explained by different numbers and/or different types of molecules being incorporated into trophozoite membranes.

Our observations are not inconsistent with amebas producing molecules that mimic complement regulatory proteins (Braga et al., 1992). But these are unable to protect most cells from complement lysis, after routine axenic culture.

Amebas become highly virulent and also resistant to lysis by serum after liver passage in hamsters (Hogyoros et al., 1986). It may be significant in this context that the liver is the site for degradation of old erythrocytes and synthesis of many complement components (Law and Reid, 1988).

Other possible membranolytic pathway evasion mechanisms, important for various nucleated cells (Carney et al., 1985; Morgan, 1989), seem insignificant for *E. histolytica*. MAC remains on the plasma membrane after 30 min of incubation and is not eliminated (Figure 2 A,B). The

observations that consistently less C9 was bound per resistant trophozoite, and that human C8 and C9 are not digested by an amebic lysate containing all active amebic proteinases (L. Gutiérrez-Kobeh and R. Pérez-Montfort, unpubl. obser.), suggested that regulatory molecules on the surface of resistant amebas can partially block the binding of C9. This mechanism is similar to that of CD59 in red blood cells (Sugita et al., 1988). Trophozoites do not eliminate the MAC complexes by shedding, as has been shown for antibody (Calderón et al., 1980) (Figure 3).

Thus, the main mechanism of resistance to lysis by serum in *E. histolytica* seems to be through the action of regulatory molecules. Amebas are not the only cells that can acquire these molecules. Functional homologous restriction factor from human erythrocytes can be incorporated into the membrane of sheep erythrocytes and protect them from reactive lysis by C5b-9 (Zalman et al., 1987). Intermembrane transfer of CD59 from erythrocytes to vascular endothelial cells has also been recently demonstrated (McClellan et al., 1994; Kooyman et al., 1995).

Pathogenic amebas that invade the intestinal mucosa are in constant contact with blood components which include these regulatory factors. We propose that the acquired complement resistance is due to the incorporation and use of complement regulatory molecules of the host.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Ingrid Kleber and Dr. Volker Brade (Institut für Klinische Mikrobiologie, Universität Erlangen-Nürnberg, Germany) for the purified human C9, Dr. Alejandro Ruiz-Argüelles (Laboratorios Clínicos de Puebla) for the flow cytometric analysis, Dr. Armando Pérez-Torres (Departamento de Biología Celular y Tissular, Facultad de Medicina, U.N.A.M.) for help with the fluorescent microscopy and Dr. Julio Morán (Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.) for supplying fresh normal human blood. This work was financed by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Project No. IN202693) and the Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (Project No. 030357) of the Universidad Nacional Autónoma de México.

LITERATURE CITED

- Biesecker, G., and H. J. Müller-Eberhard. 1980. The ninth component of human complement: purification and physicochemical characterization. *The Journal of Immunology* 124: 1291-1296.
- Brags, L. L., H. Minomiya, J. J. McCoy, S. Eacker, T. Wiedmer, C. Pham, S. Wood, P. J. Sims, and W. A. Petri. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of Entamoeba histolytica. *Journal of Clinical Investigation* 90: 1131-1137.
- Calderón, J., M. L. Muñoz, and H. M. Acosta. 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoeba. *Journal of Experimental Medicine* 151: 184-193.
- _____ and R. Tovar. 1986. Loss of susceptibility to complement lysis in Entamoeba histolytica IM1 by treatment with human serum. *Immunology* 58: 467-471.
- Carney, D. F., C. L. Koski, and M. L. Shin. 1985. Elimination of terminal complement intermediates from the plasma membrane of nucleated cells: the rate of

disappearance differs for cells carrying C5b-7 or C5b-8 or a mixture of C5b-8 with a limited number of C5b-9. *The Journal of Immunology* 134: 1804-1809.

Diamond, L. 1983. Human dwelling protozoa: Entamoeba, Trichomonads, and Giardia. In *In vitro cultivation of protozoan parasites*, J. B. Jensen, (ed.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p. 65-109.

Flores-Romo, L., V. Tsubumi, T. Estrada-Garcia, M. Shibayama, J.-P. Aubry, K. B. Bacon, and A. Martinez-Falomo. 1994. CD59 (protectin) molecule, resistance to complement, and virulence of Entamoeba histolytica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 116-117.

Hammer, C. H., G. H. Wirtz, L. Renfer, H. D. Gresham, and B. F. Teck. 1981. Large scale isolation of functionally active components of the human complement system. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 3995-4006.

Hoffman, E. M. 1969. Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. I. Extraction from human erythrocyte stromata. *Immunochimistry* 6: 405-419.

Joiner, K. A. 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annual Review of Microbiology* 42: 201-230.

Kooyman, D. L., G. W. Byrne, S. McClellan, D. Nielsen, H. Tone, H. Waldmann, T. M. Coffman, K. A. McCurry, J. L. Platt, and J. S. Logan. 1995. In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* 269: 89-92.

Law, S. K. A., and K. B. M. Reid. 1988. Role of complement in health and disease. In *Complement*. D. Mele (ed.) IRL Press, Oxford, U. K., p. 67-64.

Marchalonis, J.J. 1969. An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochemical Journal* 113: 299-305.

McClellan, S., D. Kagan, G. Byrne, J. Platt, J. Logan, and D. Kooyman. 1994. Demonstration of intermembrane transfer of CD59 during coculture of human erythrocytes with porcine and bovine aortic endothelial cells. *Transplantation Proceedings* 26: 1240.

Mogyoros, M., E. Csef, and C. Gitler. 1984. Virulence of Entamoeba histolytica correlates with the capacity to

develop complement resistance. Israel Journal of Medical Sciences 22: 915-917.

Mora-Galindo, J., and F. Anaya-Velázquez. 1993. Intracellular digestion of human erythrocytes by Entamoeba histolytica: a kinetic study in vitro. Archives of Medical Research 24: 347-351.

Morgan, B. P., J. R. Dankert, and A. F. Esser. 1987. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. The Journal of Immunology 139: 246-253.

_____. 1989. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. Biochemical Journal 264: 1-14.

Reed, S. L., P. G. Sargeant, and A. I. Braude. 1983. Resistance to lysis by human serum of pathogenic Entamoeba histolytica. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 77: 248-253.

_____, J. G. Curd, I. Gigli, F. D. Gillin, and A. I. Braude. 1986. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. The Journal of Immunology 136: 2265-2270.

29

_____, and I. Gigli. 1990. Lysis of complement-sensitive Entamoeba histolytica by activated terminal complement components: initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. Journal of Clinical Investigation 86: 1815-1822.

Repasky, E. A. and C. C. Gregorio. 1991. Plasma membrane skeletons. In The structure of biological membranes. Yeagle, P. (ed) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida pp. 449-505.

Rivera, P., A. Cárabez-Trejo, L. F. Cortés, A. Islbaal, and J. Kumate. 1984. Immunochemical characterization of Entamoeba histolytica plasma membrane's own and culture medium antigens. Archivos de Investigación Médica (México) 15: 405-415.

Rosenberg, I., and C. Gitler. 1985. Subcellular fractionation of amoebapore and plasma membrane components of Entamoeba histolytica using selfgenerating Percoll gradients. Molecular and Biochemical Parasitology 14: 231-248.

30

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Sugita, Y., Y. Nakano, and M. Tomita. 1968. Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. *Journal of Biochemistry*. 104: 633-637.

Triessl, D., A. Martinez-Palomo, M. de la Torre, R. de la Hoz, and E. Pérez de Suárez. 1978. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *Journal of Experimental Medicine* 148: 1137-1145.

Tuszynski, G. P., L. Knight, J. R. Piperno, and P. N. Walsh. 1980. A rapid method for removal of ¹²⁵I iodide following iodination of protein solutions. *Analytical Biochemistry* 106: 118-122.

Zelman, L. S., L. M. Wood, and H. J. Müller-Eberhard. 1987. Inhibition of antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity by homologous restriction factor incorporated into target cell membranes. *Journal of Experimental Medicine* 166: 947-955.

TABLE I. Relative percentage of C9 associated with plasma membrane fractions of susceptible *Entamoeba histolytica* with respect to a resistant strain at sublytic serum concentrations.

| Experiment | Percent of susceptible strain (resistant strain = 100%) ^a |
|-------------|--|
| 1 | 128.1 |
| 2 | 123.4 |
| 3 | 245.5 |
| 4 | 257.0 |
| 5 | 178.7 |
| mean ± s.d. | 184.6 ± 65.7 |

^aTotal radioactivity of fractions 12 to 18 was considered

TABLE II. Mean fluorescence intensity of susceptible trophozoites and trophozoites made resistant to lysis by serum with different treatments.

| Treatment | Percent lysis in 20% NHS | Log mean fluorescence intensity |
|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| None | 84.3 | 0.86 |
| Fresh human serum | 6.4 | 2.48 |
| Lysate from resistant trophozoites | 17.4 | 1.28 |
| Erythrophagocytosis | 6.9 | 3.09 |

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1: Dose dependent serum lysis of *Entamoeba histolytica* susceptible (S) and resistant (R) to human complement. Amebas were incubated with 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50% of active or Zymosan inactivated normal human serum for 30 min at 37 C. Percent lysis was calculated as indicated in Materials and Methods. The results are the mean of 20 different experiments \pm standard deviation.

Figure 2: Distribution of ^{125}I C9 in subcellular fractions of *E. histolytica* susceptible (A) and resistant (B) to lysis by normal human serum. Trophozoites were incubated with ^{125}I C9 and normal human serum for 30 min at 37 C. Subcellular fractions were then obtained and individual fractions were counted for radioactivity (dotted line). Protein was determined in each fraction as an internal control (continuous line).

Figure 3: Gel exclusion chromatography of supernatants of susceptible and resistant trophozoites after incubation in different conditions. Susceptible (A, C, E, G) or resistant (B, D, F, H) amebas were incubated with 10% normal human serum (A, B), normal human serum deficient in C9 (C, D) or PBS-A (E, F) for 1 hr at 37 C. The cells were removed by centrifugation and the supernatant was applied to a column

of Sepharose CL-2B. The column was eluted and 300 μ l fractions were collected. Absorbance of the column fractions was measured at 280 nm (continuous line). In some experiments, 125 IIC9 was added to normal human serum (G, H) and individual fractions were counted for radioactivity (dotted line). Molecular mass standards are Dextr: dextran blue 2000 kDa, BSA: bovine serum albumin 66 kDa and Lys: lysocyme 14 kDa.

Figure 4: Dose dependent serum lysis of susceptible amebas incubated with a lysate of susceptible or resistant amebas. Susceptible amebas (5×10^5) were treated with 200 μ l lysate prepared from either susceptible or resistant amebas for 30 min at 37 C. Their susceptibility to normal human serum was then tested and compared with susceptible and resistant trophozoites. The results are the mean of 4 different experiments \pm standard deviation.

Figure 5: Dose dependent serum lysis of susceptible amebas incubated with a lysate of human erythrocytes. Susceptible amebas (3×10^4) were incubated with 300 μ l lysate prepared from human erythrocytes for 30 min at 37 C. Their susceptibility to serum was then tested and compared with susceptible amebas treated with an extract of resistant amebas and resistant trophozoites. The results are the mean of 9 different experiments \pm standard deviation.

35

Figure 6: Dose dependent lysis of susceptible amebas fed with human erythrocytes and cultured additionally for 48 hr at 37 C. Erythrocytes were added in the indicated proportion to a culture of 48 hr of trophozoites in sterile conditions and were further cultivated. Amebas phagocytosed erythrocytes as assessed by light microscopy. Their susceptibility to serum lysis was then tested and compared with the lysis of resistant and susceptible amebas. The results are the mean of 8 different experiments \pm standard deviation.

Figure 7: Immunofluorescence photomicrographs of susceptible A) and resistant B-D) E. histolytica stained with antibody against human erythrocytic membrane antigens and fluorescent secondary antibody. A) Control susceptible trophozoites grown in axenic medium. B) Trophozoites made resistant according to Calderón and Tovar (1986). C) Susceptible trophozoites made resistant by coincubation with lysate from resistant cells. D) Susceptible trophozoites made resistant by erythrophagocytosis. Bar = 20 μ m for all photographs.

Figure 8: Distribution of 125 I in subcellular fractions of E. histolytica which had been fed with surface labeled erythrocytes 48 hr earlier. A) Subcellular fractions were counted for radioactivity and B) the precipitability of the

36

counts by 10% trichloroacetic acid in each fraction was also determined.

Figure 9: Analysis of surface iodinated proteins in whole human erythrocytes (continuous line) and in crude membrane fractions of *E. histolytica* 48 hr after phagocytosis (dotted line). Amebas were fed with surface iodinated human red cells and cultured for 48 hr. Washed amebas and surface labeled erythrocytes were then electrophoresed on a 12.5% acrylamide gel. The gel was dried, cut into 2 mm slices and counted for ^{125}I .

