



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**MECANISMOS DE RESISTENCIA
NATURAL DE LA RATA A LA
AMIBIASIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A
SCARLET GUADALUPE LICEAGA PRIETO



MÉXICO, CDMX

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **PROFESOR:** ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

VOCAL: **PROFESOR:** ENRIQUE ORTEGA SOTO

SECRETARIO: **PROFESOR:** ALFONSO OLIVOS GARCÍA

1ER SUPLENTE: **PROFESOR:** JOSE CORDERO HERNÁNDEZ

2DO SUPLENTE: **PROFESOR:** OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL, LABORATORIO DE PATOLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DR. ALFONSO OLIVOS GARCÍA

(NOMBRE Y FIRMA)

SUPERVISOR TÉCNICO: BIOL. MARIO NEQUIZ AVENDAÑO

(NOMBRE Y FIRMA)

SUSTENTANTE: SCARLET GUADALUPE LICEAGA PRIETO

(NOMBRE Y FIRMA)

AGRADECIMIENTOS

“Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN214617.

“Investigación realizada gracias al apoyo CONACyT 247430”.

Agradezco al CONACyT la beca recibida”.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Amibiasis	2
1.2 <i>E. histolytica</i>	3
1.3 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	5
1.4 Amibiasis intestinal y extraintestinal	7
1.5 Respuesta del hospedero a la infección amibiana	7
1.6 Sistema de complemento	9
1.6.1 Vía clásica	10
1.6.2 Vía alterna	11
1.6.3 Vía de las lectinas.....	13
1.6.4 Formación del MAC	14
1.6.5 Regulación del sistema de complemento	16
1.6.6 Estructura de C3	18
1.7 Resistencia de <i>E. histolytica</i> al complemento	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OJETIVO GENERAL	23
5. OBJETIVOS PARTICULARES	23

6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Declaración de Ética	24
6.2 Parásitos y virulencia	24
6.3 Infección hepática amibiana en hámsters y ratas	25
6.4 Suero de diferentes especies animales	26
6.5 Niveles de complemento (CH50) determinado mediante ensayo automatizado basado en liposomas	26
6.6 Efecto lítico amibiano de los sueros de diferentes especies animales.....	27
6.7 Purificación del CVF	27
6.8 Efecto del CVF <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	28
6.9 Susceptibilidad amibiana al suero de rata fresco diluido con suero de hámster	29
6.10 Suero fresco heterólogo en la infección hepática amibiana del hámster. ...	29
6.11 Inducción de resistencia amibiana al suero de rata fresco	30
6.12 Niveles de C3 y C4 en el suero de rata, hámster y humano	30
6.13 Efecto de un inhibidor del receptor C3b sobre la actividad amibicida del complemento de la rata.	30
6.14 Análisis estadístico.	31
7. RESULTADOS	32
8. DISCUSIÓN	45

9. CONCLUSIÓN	50
10. BIBLIOGRAFÍA.....	51

APÉNDICE

A. Información de las pruebas realizadas	57
• Inhibidor del receptor de C3b (Azul tripan)	57
• Prueba de CH50 (complement hemolytic 50)	58
• Factor hipocomplementémico del veneno de cobra (CVF).....	58
B. Preparación de reactivos	60
C. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	62
D. Tinción de PAS	63

ANEXO

A. Absceso hepático amibiano en hámster / virulencia de <i>E. histolytica</i>	64
B. Actividad hipocomplementémica del CVF	65

ABREVIATURAS

AHA	Absceso hepático amibiano
AHAE	Absceso hepático amibiano experimental
APS	Persulfato de amonio
C1inh	Proteína Inhibidora de C1
CH50	Unidades hemolíticas de complemento al 50%
CR1	Receptor de C1
CVF	Factor hipocomplementémico del veneno de cobra
DAF	Factor acelerador del decaimiento
FH	Factor H
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
IEHA	Infección hepática amibiana experimental
LPPG	lipopéptidofosfoglucano
LPS	Lipopolisacáridos
MAC	Complejo de ataque a la membrana
MASP	Proteasas de serina activadas por MBL

MBL	Lectina de unión a manosa
MCP	Proteína cofactor de membrana
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PAS	Tinción de ácido periódico (Schiff)
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SC	Sistema de complemento
TAC	Tomografía axial computarizada

RESUMEN

La amibiasis es una parasitosis causada por *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad es prevalente en países subdesarrollados y en el mundo causa alrededor de cien mil muertes cada año. El conocimiento de los mecanismos de resistencia natural de la rata al absceso hepático amibiano (AHA) puede revelar nuevos factores de patogenicidad que permitan el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento de la amibiasis en humanos. En este trabajo, estudios histológicos sugieren que el sistema complemento puede desarrollar un papel central en la resistencia natural de la rata al AHA ya que los trofozoítos de *E. histolytica* desaparecen del hígado de la rata 6 h después de la infección con un infiltrado inflamatorio mínimo o nulo. Experimentos *in vitro* mostraron que el complemento de rata es letal para el parásito, es ~ diez veces más potente que el del hámster, que es un animal extremadamente susceptible al AHA y los niveles de CH50 no se correlacionan con la actividad amibicida. Además, la transferencia de suero fresco de rata en hámsters les confirió resistencia total al AHA. La vía alterna del complemento es responsable de la potente actividad amibicida del suero de rata ya que dicho efecto fue inhibido por el azul tripan, que es un inhibidor del receptor de C3b. Los resultados sugieren que la alta afinidad de la membrana amibiana por C3b y/o baja para el factor H, en comparación con la del hámster, puede dar como resultado una mayor formación del complejo de ataque a la membrana y muerte del parásito.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Amibiasis

La amibiasis es una infección parasitaria causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Éste afecta especialmente al intestino grueso, aunque también se ha observado que tiene la capacidad de dañar a otros órganos como el cerebro, hígado y pulmón (Espinosa-Castellano y Martínez-Palomo, 2000).

La descripción del parásito fue realizada por primera vez en 1873 por el médico ruso Fedor Alexandrovich Lösh. Éste médico analizó las heces de un campesino llamado J. Markov quien padecía de un constante dolor abdominal acompañado de diarrea crónica; en ellas halló múltiples organismos microscópicos, los cuales debido a su forma los considero amibas. A pesar de los intentos del Dr. Lösh para combatir a las amibas, el joven Markov falleció, sin embargo con el contenido intestinal de Markow, el Dr. Lösh fue capaz de reproducir la enfermedad en un perro. En 1890 Councilman y Lafleur publicaron la primera monografía sobre la patología de la amibiasis, en la que introdujeron los términos de disentería amibiana y absceso hepático amibiano. Posteriormente en 1893 los médicos alemanes Quincke y Roos describieron al parásito en forma de quiste, al cual consideraron como la forma de resistencia. Más tarde, en 1913 Walker y Sellards determinaron que la transmisión de la enfermedad ocurre únicamente por medio de los quistes. En 1925 el parasitólogo Émile Brumpt, basado en datos epidemiológicos, sugirió por primera vez que había dos especies de amibas: una invasora capaz de causar enfermedad; *Entamoeba histolytica* y otra incapaz de provocar la enfermedad a la que llamó *Entamoeba dispar*. Brumpt denominó esto como “la teoría dual de las

amibas” y además puntualizó que microscópicamente era imposible diferenciar a ambas amibas (Pinilla *et al.*, 2008).

En 1961 el Dr. Louis Diamond hizo una de las contribuciones más importantes para el estudio de la amibiasis: la implementación del medio de cultivo axénico (sin asociación con bacterias) para *E. histolytica*, *E. dispar* y otras amibas. Esto permitió el estudio de la biología celular y molecular de *E. histolytica*, lo cual ha tenido un profundo impacto en el conocimiento de los mecanismos moleculares de patogenicidad de este parásito y en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la amibiasis. En 1993 Diamond y Clark por medio de análisis bioquímicos, inmunológicos y genéticos determinaron que *E. histolytica* es una cepa patógena y *E. dispar* una comensal. Finalmente, en 1997 la OMS, a través de un comité de expertos, aceptó esta hipótesis adicionando que ambas especies solamente pueden ser diferenciadas por patrones isoenzimáticos y por la identificación específica de la adhesina Gal-GalNAC en materia fecal o por técnicas moleculares (Olivos *et al.*, 2005).

1.2 *E. histolytica*

El nombre científico del parásito se compone de cuatro términos griegos que significan: *Ent-* “intestino”; *ameba-* “amoeba”, *hist-* “tejido” y *lisis-* “destrucción”, lo cual explica la naturaleza de la enfermedad. Durante su ciclo de vida *E. histolytica* presenta distintos estados morfológicos. Las dos fases más importantes del parásito son: 1) El quiste (Fig. 1A): fase de resistencia e infección, caracterizado por poseer una forma esférica bien definida y de 1-4 núcleos dependiendo de su estado de maduración, y 2) el trofozoíto (Fig. 1B): fase móvil, reproductora e

invasiva, caracterizado por tener de 1 a 6 núcleos en su citoplasma y sin forma definida. El movimiento de los trofozoítos es debido a pseudópodos (Becerril, 2011).

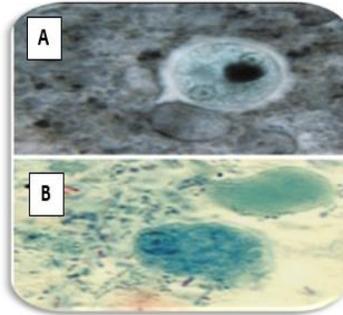


Figura 1. Fases de *Entamoeba histolytica*. **A)** Quiste inmaduro. **B)** Trofozoíto

El cambio de estado morfológico de *E. histolytica* depende de las condiciones en las que ésta se encuentre. En un ambiente favorable de pH~7, temperatura~37°C y con los nutrientes necesarios, el parásito comenzará su ciclo de reproducción. Por el contrario, si *E. histolytica* se encuentra en un ambiente desfavorable iniciará el proceso de enquistamiento. Durante este proceso las células pierden movilidad y adquieren una forma esférica. Poco a poco el quiste va reproduciendo sus núcleos; el primero a partir del que tenía como trofozoíto (quiste inmaduro binucleado) y posteriormente se duplican los dos núcleos para dar lugar a un quiste maduro tetranucleado (Fig. 2), los cuales son capaces de contaminar agua y/o alimentos (Becerril, 2011).

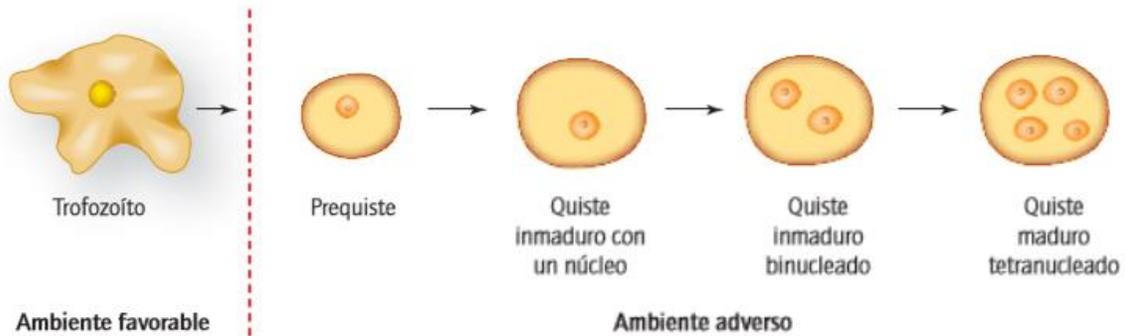


Figura 2. Etapas de la transformación del trofozoíto de *E. histolytica* en quiste.

1.3 Ciclo de vida de *E. histolytica*

La infección con *E. histolytica* inicia cuando una persona ingiere agua o alimentos contaminados con materia fecal que contiene los quistes maduros. Éstos pasan a través del estómago y son capaces de soportar el jugo gástrico y a las enzimas hidrolíticas, las cuales afectan únicamente a la pared celular. Una vez que el quiste llega al final del intestino delgado el parásito inicia el desenquistamiento. Por cada quiste emergen ocho trofozoítos uninucleados denominados metaquísticos. Éstos se dividen por fisión binaria y se pueden adherir a la mucosa intestinal donde pueden vivir como comensales. El quiste maduro se elimina con las heces y está listo para reiniciar su ciclo biológico (Fig. 3) (Becerril, 2011).

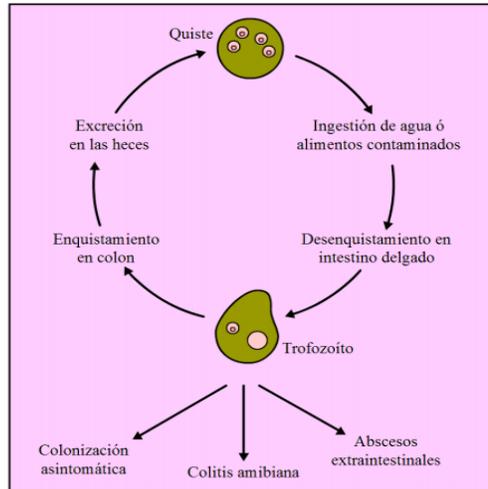


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*

Por medio de la circulación sanguínea y mediante mecanismos moleculares aún no caracterizados, se han observado casos en los que *E. histolytica* es capaz de atravesar la mucosa intestinal e invadir diversos tejidos como son: hígado, pulmón y cerebro, siendo el primero el más común y caracterizado por presentar múltiples abscesos en el sitio de lesión (Fig. 4) (Song y Lambris, 2000).

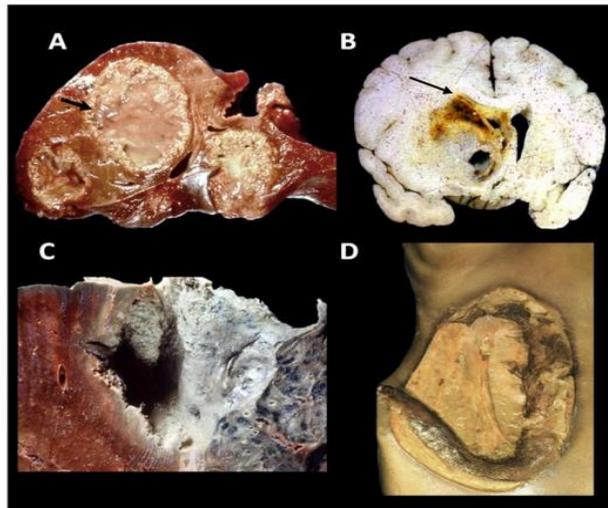


Figura 4. Amibiasis extraintestinal en diferentes órganos del ser humano. **A)** hígado **B)** Cerebro **C)** Pulmón **D)** Lesión en piel abdominal debido a la cercanía con el intestino y/o hígado dañado.

1.4 Amibiasis intestinal y extraintestinal

La manifestación clásica de la amibiasis intestinal es la disentería. Lo más habitual es que en un inicio se muestre una sintomatología poco intensa que incluye dolor abdominal, alteraciones en el tránsito del intestino y diarrea no sanguinolenta. En esta fase, la enfermedad se puede prolongar por varios meses. Por otro lado, la amibiasis extraintestinal se produce cuando los trofozoítos de *E. histolytica* invaden los vasos sanguíneos de los tejidos más próximos y son capaces de diseminarse hacia diferentes órganos causando múltiples lesiones. El absceso hepático amibiano (AHA) es la manifestación extraintestinal más frecuente, los pacientes presentan un cuadro clínico agudo o crónico que incluye dolor abdominal en el hipocondrio derecho, además de pérdida de peso, mialgias, malestar en general y fiebre que puede alcanzar los 39 °C. El diagnóstico del AHA se realiza de acuerdo a la evidencia clínica del absceso mediante una ecografía, TAC y serología positiva para el microorganismo (Becerril, 2011).

1.5 Respuesta del hospedero a la infección.

El hospedero se defiende del parásito a través de mecanismos inmunológicos y no inmunológicos. Así, por ejemplo, entre los mecanismos no inmunológicos están la producción de mucinas (que produce una capa viscosa de moco con la finalidad de proteger al intestino), la motilidad intestinal y la presencia de la microbiota. Los mecanismos inmunológicos involucran tanto al sistema inmune innato como al adaptativo (Becerril, 2011).

La respuesta inmune innata es la primera en hacer frente a *E. histolytica*. En una infección causada por el parásito las primeras células del sistema inmune en

interaccionar con el parásito son los neutrófilos, los cuales probablemente son reclutados por la actividad quimiotáctica de un péptido en la membrana del parásito (Guerrant *et al.*, 1981). Los neutrófilos aumentan su actividad amibicida cuando son estimulados por interferón gamma (INF- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), lipopolisacáridos (LPS) y/o antígenos amibianos. Posteriormente, las demás células inflamatorias como son los macrófagos y las células NK participan en este proceso. Es común que los neutrófilos no logren eliminar a las amibas debido a que el parásito provoca apoptosis y lisis de los mismos. Además, los macrófagos reconocen componentes en la superficie de la amiba a través de los receptores tipo Toll, como son el lipopéptido fosfogluano (LPPG) y el DNA de la amiba. Cuando *E. histolytica* logra penetrar al epitelio intestinal, el complemento puede ser activado por la vía clásica o alterna mediante la proteasa de cisteína de 56 KDa de la amiba, en la que se generan los factores de C3a y C5a los cuales se convierten en potentes agentes quimiotácticos, favoreciendo el reclutamiento y activación de las células inflamatorias (Reed *et al.*, 1990).

Por otro lado, la inmunidad adaptativa, también llamada adquirida es una segunda fase de respuesta ante la infección causada por *E. histolytica*. El objetivo de esta fase es reconocer específicamente al patógeno y eliminarlo.

El sistema inmune adaptativo está integrado por la inmunidad celular y la inmunidad humoral. En la primera, la principal célula involucrada es el linfocito T, mientras que en la inmunidad humoral la célula responsable es el linfocito B, el cual al ser estimulado por un Ag se diferencia en célula plasmática capaz de producir anticuerpos o inmunoglobulinas específicas. Se espera que tanto la respuesta inmune celular como la humoral participen en la defensa contra *E. histolytica*. Para

esto se requiere de la activación de células T específicas del hospedero por células presentadoras de antígeno (células dendríticas o macrófagos). Posteriormente, el hospedero procederá a generar anticuerpos anti-amiba de clase IgG e IgA, que si bien, su capacidad protectora es débil son de gran valor diagnóstico (Toche, 2012).

1.6 Sistema de Complemento

El sistema de complemento (SC), descubierto en 1896 por Bordet, conecta el sistema inmune innato con el adaptativo. Éste está conformado por un grupo de ~20 proteínas séricas, las cuales se encuentran en el torrente circulatorio (Łukawska *et al.*, 2018).

El SC es el mayor componente del sistema inmune innato y participa en muchas funciones como son: 1) protección contra los microorganismos invasores, 2) eliminación de células apoptóticas y 3) modulación de la respuesta inmune adaptativa. Las proteínas del SC funcionan como enzimas o proteínas de unión las cuales poseen una actividad proteolítica y actúan de forma parecida a las que conforman la cascada de coagulación (Berron *et al.*, 2003). El SC es activado principalmente mediante 3 vías: 1) la vía clásica (VC), la vía alterna (VA) y la vía de las lectinas (VL). La primera vía forma parte de la inmunidad adaptativa, puesto que necesita de la formación de un anticuerpo, mientras que las otras dos pertenecen a la inmunidad innata. Las tres vías convergen en la activación de la proteína C3, la cual es un punto clave del eje de activación del complemento. La finalidad de la activación de las tres vías del complemento son: 1) atracción de células inflamatorias a la zona de lesión, 2) opsonización o recubrimiento de los patógenos y 3) producción del complejo de ataque a la membrana (MAC), el cual produce un

poro en la membrana del patógeno que lo conducirá a su muerte (Sarma y Ward, 2014).

1. 6 .1 Vía Clásica.

Esta vía es denominada así debido a que fue la primera en ser descubierta. En ella participan los factores C1, C2, C3 y C4.

El factor C1 es un complejo multiproteico compuesto de diferentes subunidades: la subunidad estructural C1q (Fig. 5) son proteínas filamentosas terminadas en un dominio globular y los factores C1s y C1r, los cuales tienen actividad enzimática.

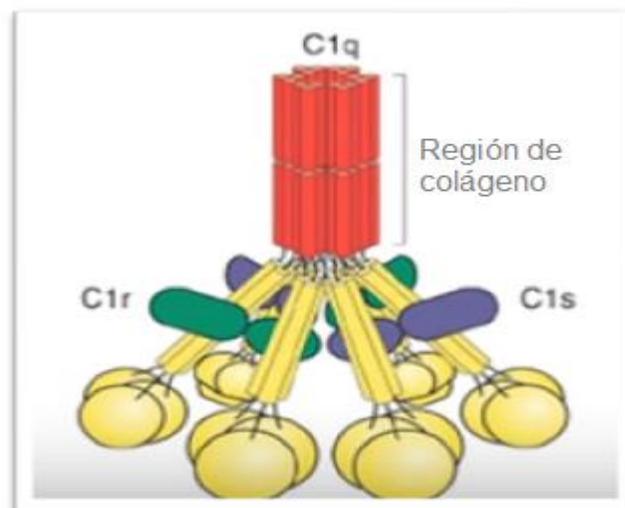


Figura 5. Estructura del complejo C1 del complemento (q,r,s)

Inicio de la vía: La proteína C1q a través de sus dominios globulares va a reconocer y a unirse a inmunoglobulinas (anticuerpos unidos en la superficie del patógeno, de clase IgM e IgG), posteriormente activa a C1r (subunidad lítica) que a su vez activa a C1s (subunidad lítica también), el cual actúa secuencialmente sobre C4 fragmentándolo en C4a y C4b, y sobre el factor C2 fragmentándolo en C2a y C2b. Los factores C2b y C4b se depositan en la superficie del patógeno y los factores

C2a y C4a se liberan al medio. De esta manera se forma así una nueva enzima: la convertasa de C3 (C2bC4b) la cual tiene actividad proteolítica sobre la proteína C3 liberando fragmentos C3b y fragmentos C3a. La unión de C3b sobre la membrana del patógeno es un elemento crítico para el proceso de opsonización y fagocitosis. Posteriormente el factor C3b se une a C2bC4b formando un complejo trimolecular (C3bC2bC4b) denominado la convertasa C5 de la vía clásica. Llegado este punto se inicia la llamada vía lítica o común (Noris y Remuzzi, 2013).

1.6.2 Vía Alterna.

Esta vía es filogenéticamente la más primitiva y no requiere de la presencia de anticuerpos. En esta vía participan los factores C3 y los factores B, D y P.

Esta vía es estimulada por diferentes estructuras de los patógenos, como son los polisacáridos y estructuras similares a éstos. La vía inicia con la ruptura del factor C3, el cual está unido con un enlace de tipo tioéster (carbono y azufre) (Fig. 6). Cuando la proteína C3 es hidrolizada en sus dos fragmentos C3a y C3b, queda expuesto el enlace tioéster y el factor C3b con el enlace expuesto es altamente inestable por lo que busca estabilizarse mediante una unión covalente a la superficie del patógeno. Posteriormente, a éste se le une el factor B y sobre ellos actúa el factor D, liberando el fragmento pequeño Ba. Esta unión de dos proteínas (C3bBb) es ahora la convertasa de C3 de la vía alterna la cual es estabilizada por el factor P o properdina. Esta convertasa es muy eficiente hidrolizando a C3 por lo que produce cientos de fragmentos que amplifican la cascada; el fragmento grande siempre se va a unir a la superficie del patógeno y el pequeño siempre se va a liberar. Eventualmente uno de los complejos de C3b se va a unir al complejo enzimático y

se va a formar un complejo trimolecular (C3bC3bBb) denominado la convertasa C5 de la vía alterna que sigue unido a la properdina como factor estabilizante y convergiendo en los mismos pasos que la vía clásica para la formación del MAC (Noris y Remuzzi, 2013).

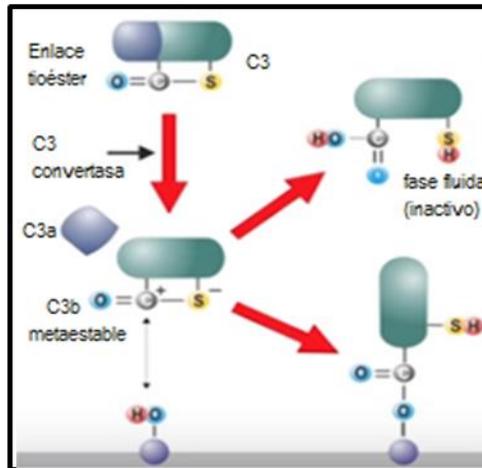


Figura 6. Esquema del factor C3. Se aprecia el enlace tioéster y su ruptura.

1.6.3 Vía de las Lectinas.

En esta ruta participan los componentes MBL (lectina de unión a manosas) o las más recientemente descubiertas ficolinas, MASP-1 y MASP-2 (proteasas de serina activadas por MBL), C2 y C4.

Esta vía puede ser iniciada por la MBL o por las ficolinas. Estas dos proteínas poseen una estructura muy similar (Fig. 7), ambas tienen una serie de triples hélices de tipo colágeno terminadas en dominios globulares. La diferencia entre MBL y ficolinas radica en el tipo de azúcar que reconocen; las primeras reconocen como lo indica su nombre manosa, mientras que las segundas se van a unir a otros azúcares acetilados. Una vez que alguna de estas dos proteínas reconoce un determinado azúcar se forman complejos de seis subunidades de MBL o seis subunidades de ficolina, a las cuales se les asocian las proteasas de serina MASP-1 y MASP-2 de forma muy parecida al factor C1q de la vía clásica (Noris y Remuzzi, 2013).

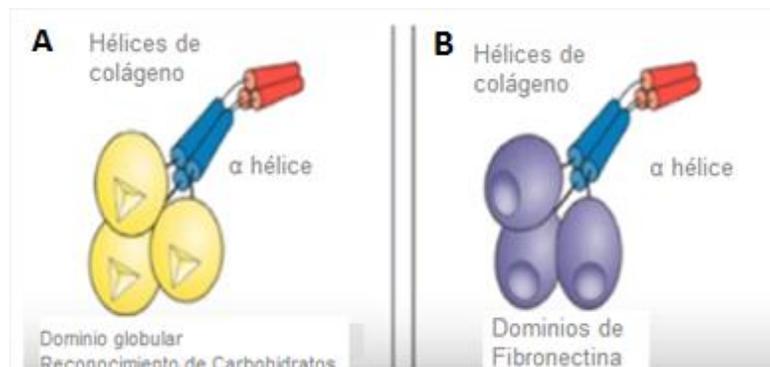


Figura 7. Estructura de las ficolinas (A) y de las MBL (B)

Inicio de la vía: La MBL reconoce la presencia de manosa en la superficie y posteriormente se le unen las MASP que se activan y actúan de modo secuencial

sobre los factores C4 y C2, fragmentándose en C4b, C4a y C2b, C2a, respectivamente. La unión de C2b y C4b forman la misma convertasa de C3 de la vía clásica (C2bC4b) y actúan sobre cientos de moléculas de C3 produciendo la acción descrita anteriormente. De igual manera el factor C3b se une a la convertasa de C3, formando el complejo trimolecular C3bC2bC4b conocido como la convertasa de C5 de la vía clásica (Sarma y Ward, 2014).

1.6.4 Formación del MAC

Esta vía es la consecuencia de la activación del complemento por cualquiera de las tres rutas ya antes mencionadas, por lo que se le denomina vía lítica común. El objetivo de esta vía es la perforación de la membrana celular del patógeno.

En esta vía participan las proteínas o factores C5, C6, C7, C8 y C9. Ya sea que el sistema del complemento haya sido activado por cualquiera de las vías (VC, VA, VL) todas tienen un paso central o común el cual es la ruptura de la proteína C5 y la formación de la C5 convertasa.

Para que esta vía pueda ser iniciada, tiene que haberse formado previamente una enzima por cualquiera de las tres rutas: la convertasa de C5, la cual puede ser de dos tipos, dependiendo de la vía de su procedencia; la formada por la vía clásica y de las lectinas (C4bC2bC3b), y la convertasa C5 formada por la vía alterna (C3bBbC3b). Estas convertasas van a actuar sobre la proteína C5 y van a hidrolizarla en dos fragmentos, el grande "C5b" y el pequeño "C5a". El fragmento C5a es la anafilotoxina más potente del sistema del complemento. Cuando el fragmento C5b se une a la membrana, éste no lo hace solo, sino que en el camino hacia la superficie del patógeno, se le unen los factores C6 y C7, de modo que lo

que se deposita sobre la superficie del patógeno es un complejo trimérico. Una vez depositado éste, se le añade el factor C8 que es la primera proteína que penetra físicamente la membrana del microorganismo y por último se les une el factor C9 que polimeriza sobre sí mismo un indeterminado número de veces. Esto da como resultado una estructura de forma similar a la de un “barril” (Fig. 8) la cual permite la libre circulación de líquidos entre el interior y el exterior de la célula produciendo así un choque osmótico en el patógeno (Fig. 9). A todo el conjunto de proteínas, es decir, el fragmento grande C5b, C6, C7, C8 y n veces C9 se le conoce como complejo de ataque a la membrana o MAC (Abbas *et al.*, 2010).

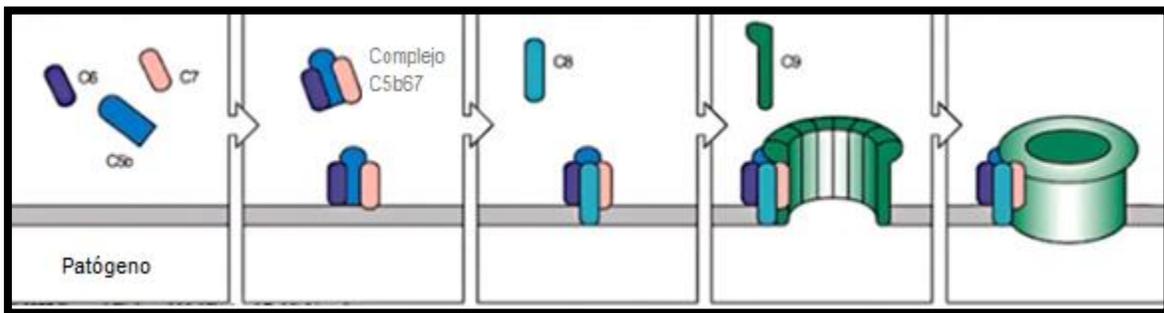


Figura 8. Esquema de la vía lítica

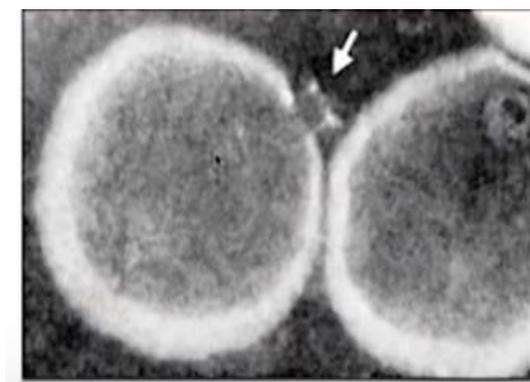


Figura 9. Micrografía con microscopio de barrido de un corte donde se aprecia el MAC (flecha) y la libre circulación entre el medio interno y externo.

1.6.5 Regulación del Sistema del Complemento

Las proteínas del SC, como ya se describió anteriormente, se van amplificando y terminan en una serie de procesos que resultan letales para los patógenos. Sin embargo, de no ser detenidas a tiempo, pueden ser letales también para nuestro organismo, por lo que existe un sistema complejo de regulación.

Las proteínas reguladoras se pueden clasificar de acuerdo al momento de activación, es decir, a qué parte de la cascada del complemento inhibe. Éstas pueden ser de tres tipos: 1) las que inhiben el inicio de cualquiera de las vías, 2) las que inhiben el eje de activación (convertasa C3), y 3) las que inhiben la formación del MAC. Otra forma de clasificación de las proteínas inhibidoras del SC son las que actúan en la fase soluble y en la membrana (Noris y Remuzzi, 2013):

- C1inh: Es una glicoproteína inhibidora soluble que actúa al inicio de la vía clásica. Ésta se une a las subunidades enzimáticas C1r y C1s, y las libera de la subunidad estructural C1q dejándola inactiva.
- C4bp (“C4 binding protein”): Es una glicoproteína inhibidora soluble cuya función es disociar la C3 convertasa. Actúa sobre C4b o C3b impidiendo la formación de la C3 convertasa. También actúa como cofactor para la proteólisis de C4b por el Factor I.
- Proteína S (Vitronectina): Es una proteína inhibidora soluble que actúa en la fase terminal de la cascada de complemento impidiendo la formación del MAC, su mecanismo de acción radica en la unión con el complejo trimolecular C5b-C7.

- Clusterina: En una proteína inhibidora soluble, actúa en la fase terminal de la cascada de complemento impidiendo la formación del MAC y su mecanismo de acción radica en la unión con el complejo trimolecular C5b-C7.
- Factor H: Es una proteína inhibidora soluble que afecta directamente a la C3 convertasa. Se une a la molécula C3b acelerando la destrucción de la C3 convertasa de la vía alterna (C3bBb). También puede actuar como cofactor para la proteólisis de C3b por el Factor I.
- Factor I: Es una proteína inhibidora soluble que afecta directamente a la C3 convertasa. Actúa proteolíticamente sobre C4b y C3b usando C4bp, factor H, CR1 o MCP como cofactores.
- CR1 (receptor de C1): Es una proteína de membrana que ejerce una función inhibidora directamente sobre la convertasa C3; actúa sobre los factores C3b o C4b acelerando la disociación de la C3 convertasa y también actúa como cofactor para la proteólisis de C4b o C3b por el factor I.
- MCP (proteína cofactor de membrana) o CD46: Es una proteína inhibidora de membrana que actúa sobre la convertasa de C3 como cofactor en la proteólisis de C4b o C3b por el factor I.
- DAF (factor acelerador del decaimiento) o CD55: Es una proteína inhibidora de membrana que actúa sobre la convertasa de C3, acelerando su disociación.
- Protectina o CD59: Es una proteína expresada en la superficie de la mayoría de las células e impide que el MAC actúe en nuestras células, se une a los cuatro factores que inician su formación (C5b, C6, C7, C8) e impide que C9

se una y polimerize evitando así la formación del poro. (Noris y Remuzzi, 2013)

1.6.6 Estructura de C3

La molécula clave del sistema del complemento es la proteína C3 de ~185 kDa, la cual es constantemente activada en la vía alterna. C3 es también la proteína del complemento más abundante en suero. El gen humano que codifica para C3 está localizado en el cromosoma 19 (19p13,2-13,3) y consiste de 41 exones (52-213 pb). C3 es sintetizado principalmente por el hígado, pero también es producido por monocitos, neutrófilos, fibroblastos, células presentadoras de antígeno, epitelio de los túbulos renales y endotelio capilar. El precursor de la proteína C3 (pre-pro C3) es formado a partir de una cadena polipeptídica compuesta de 1663 aminoácidos que se somete a varias modificaciones postraduccionales, tales como: 1) la escisión del péptido señal de 22 aminoácidos N-terminal, 2) la eliminación de los residuos de arginina por la enzima tipo furina, 3) la glucosilación, y 4) la formación de enlaces tioéster internos. La proteína C3 madura se divide en dos cadenas: una cadena beta β de ~75 kDa y una cadena α de ~110 kDa. Estas cadenas se combinan mediante un puente disulfuro en la posición 917 en la cadena α y la posición 63 en la cadena β (Fig. 10). Finalmente, la proteína C3 comprende 8 dominios de macroglobulina que tienen sitios de unión específicos para receptores de complemento y proteínas reguladoras. El dominio TED, localizado en la región C3d, contiene un enlace tioéster y es el responsable de la fijación a la superficie de la célula, el cual es crucial para la activación de la vía alterna del complemento (Łukawska *et al.*, 2018).

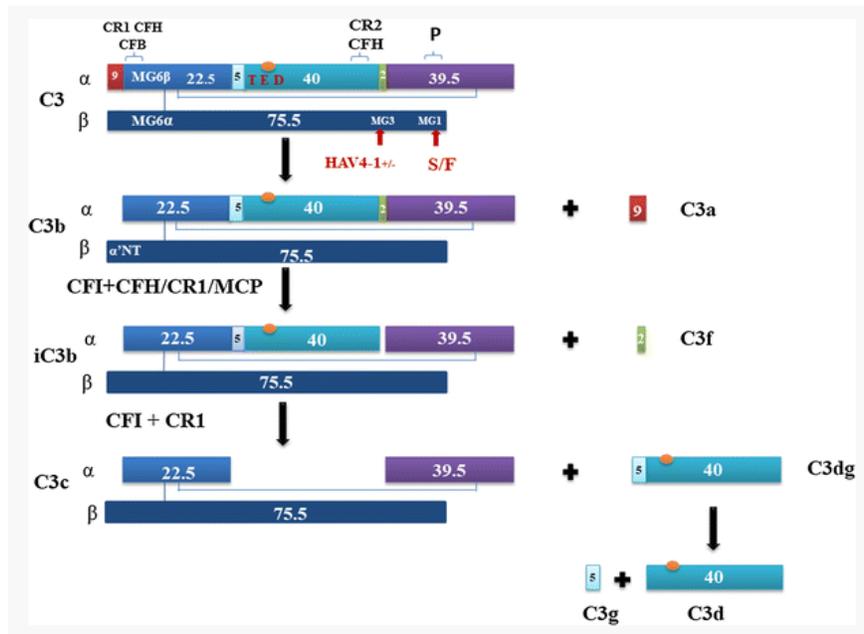


Figura 10. Estructura de la proteína C3 y su cascada proteolítica. El C3 maduro comprende las dos cadenas (α y β) combinadas covalentemente por un único enlace disulfuro entre seis alfa macroglobulina (6α MG) en la cadena β y seis beta macroglobulina ($MG6\beta$) en la cadena α .

1.7 Resistencia de *E. histolytica* al complemento

Las proteasas de cisteína son un importante factor de resistencia de *E. histolytica* a la lisis por el complemento. Se ha observado que los cultivos de *E. histolytica* provenientes de pacientes con amibiasis extraintestinal son resistentes a la lisis mediada por complemento y que su capacidad de evasión se debe a la proteasa de cisteína de 56 kDa (EhCP56) presente en la superficie amibiana que degrada al C3 y a las anafilotoxinas del complemento C3a y C5a. Además, la EhCP56 también está implicada en la evasión inmune específica del hospedero ya que es capaz de degradar IgA, IgG e IL-18 (moléculas claves en procesos inflamatorios) (Joiner *et*

al., 1982). Por otro lado, la adhesina EhGal-GalNAC presente en la superficie de la amiba contiene un epítipo que posee una gran similitud con la proteína de membrana humana CD59, que se encuentra ampliamente distribuida en las membranas de las células humanas y cuya función es evitar la lisis celular inhibiendo la inserción del factor C9 al complejo C5b-8 y por tanto evita la formación del MAC (Reed, 1990).

2. JUSTIFICACIÓN

En México la amibiasis es un grave problema de salud pública ya que de todas las parasitosis, ésta presenta los más altos índices de morbilidad lo cual afecta de manera negativa el desarrollo social y económico del país. Se estima que a nivel mundial, cerca de 50 millones de individuos están infectados con *E. histolytica* (WHO, 2002).

El tratamiento para la amibiasis varía dependiendo del cuadro clínico del paciente y de la especie de amiba presente. Para el tratamiento de la amibiasis invasiva los fármacos de elección provienen de la familia de los nitromidazoles, siendo el metronidazol el de mayor elección (Becerril, 2011). Sin embargo, estudios recientes muestran que el uso indiscriminado de estos medicamentos puede causar efectos adversos severos, principalmente en la microbiota intestinal y resistencia en *E. histolytica*. Es por esto que es importante el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas de mayor eficacia e inocuidad (Ximénez *et al.*, 2009).

El conocimiento de los mecanismos naturales de resistencia de las ratas al desarrollo del absceso hepático amibiano puede revelar nuevos factores de patogenicidad y por tanto ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas contra la amibiasis.

3. HIPÓTESIS

El complemento es un factor de resistencia natural de la rata al desarrollo del absceso hepático amibiano experimental.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del complemento de la rata en su resistencia al absceso hepático amibiano experimental.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el nivel de la actividad del complemento del suero de diferentes especies animales (susceptibles y resistentes a la amibiasis) y su asociación con su capacidad amibicida.
- Purificar el factor hipocomplementémico del veneno de cobra (CVF) y determinar su actividad hipocomplementémica *in vivo* e *in vitro*.
- Determinar el tiempo de sobrevida de *E. histolytica* en el hígado de rata y de hámster.
- Determinar el tiempo de sobrevida amibiana en el hígado de rata hipocomplementémica
- Cuantificar las concentraciones de C3 y C4 en suero fresco de rata, hámster y humano.
- Evaluar la potencia lítica del complemento de rata.
- Determinar el papel que desempeña la vía alterna del complemento de la rata en su actividad amibicida.
- Transferencia de suero fresco de rata en el torrente sanguíneo del hámster y evaluación de su efecto en el desarrollo del AHA.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Declaración Ética

Todos los experimentos realizados con animales se concibieron bajo la Ley mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo el protocolo número 091-2016, aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Además, se tomaron todas las medidas posibles para minimizar el sufrimiento de los animales.

6.2 Parásitos y virulencia

Se preparó medio de cultivo TYI-S-33 y en condiciones axénicas se cultivaron trofozoítos virulentos de *E. histolytica* pertenecientes a la cepa HM1-IMSS de acuerdo con la metodología descrita por Diamond *et al.*, 1978.

La virulencia del parásito se mantuvo mediante la recuperación mensual de las amibas del absceso hepático amibiano en hámsters (*Mesocricetus auratus*). Para esto, cuatro hámster machos (de la especie Sirio dorado) se anestesiaron con una inyección de pentobarbital sódico (6.3 mg/100 g peso) por vía intraperitoneal y mediante laparotomía se les inyectaron en la vena porta 1×10^6 de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* resuspendidos en 0.2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Para detener la hemorragia del sitio de inyección se utilizó un fragmento de gelfoam y se procedió a suturar la herida con hilo de seda. Enseguida los hámsters se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*. Después de siete días

de infección, los animales fueron eutanasiados con sobredosis de éter y en condiciones asépticas se les extirpó el hígado, se cortó en pequeños fragmentos y éstos se depositaron en tubos que contenían medio TYI-S-33 y una mezcla de antibióticos (bencilpenicilina, estreptomina y ceftriaxona). Después de 24 h de incubación a 37°C, el medio y los trozos de hígado se eliminaron por decantación y las amibas adheridas al vidrio se siguieron cultivando en las mismas condiciones. Después de 2 subcultivos de 72h sin antibióticos, las amibas se utilizaron en los diferentes experimentos. La virulencia del parásito se definió como la capacidad de 1×10^6 trofozoítos de producir abscesos hepáticos múltiples en 4/4 hámsters.

6.3 Infección hepática amibiana aguda en hámsters y ratas

Cuatro hámsters machos o hembras de ~120 g se anestesiaron como ya se ha mencionado y se les inyectaron en la vena porta 1×10^6 trofozoítos virulentos de *E. histolytica* resuspendidos en 0.2 mL de PBS.

Después de la inyección intraportal, los animales fueron eutanasiados a diferentes tiempos con sobredosis de éter. Los hígados se extrajeron, se pesaron y cortaron para una inspección macroscópica exhaustiva y posterior a esto los fragmentos de hígado se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS. Finalmente, los hígados fijados fueron incluidos en parafina y los cortes teñidos mediante la técnica de ácido periódico de Schiff (PAS) para su estudio histológico. Por otra parte, el mismo procedimiento de infección hepática amibiana se realizó en ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) de 200-250 g de peso, pero inyectando 1×10^6 amibas / 100 g de peso corporal.

El nivel de respuesta inflamatoria de cada condición se determinó contando los leucocitos presentes en micrografías de 13 focos inflamatorios, seleccionados previamente mediante microscopía de luz con aumento de 40X. El conteo de leucocitos se realizó de manera automatizada mediante el software *ImageJ 1.47v* *National Institutes of Health, USA, JAVA 1.6.0_20*.

6.4 Suero de diferentes especies de animales

Diferentes especies animales susceptibles de desarrollar infección hepática amibiana (humano y hámster) y resistentes (rata Wistar, cobayo, rata Long Evans, cabra, borrego, vaca y conejo) fueron sangradas mediante diferentes técnicas de extracción, obteniendo entre 6-10 mL de sangre total por cada una. El suero fue separado mediante centrifugación a 4 °C y almacenado a -70 °C hasta su uso. Para esta obtención se usaron cuatro animales (machos o hembras) de cada especie.

6.5 Niveles de complemento (CH50) determinado mediante ensayo automatizado basado en liposomas

La actividad de complemento (CH50) se determinó en todos los sueros de las diferentes especies de animales utilizando el kit comercial de inmunoensayo de liposomas (Wako Autokit CH50) en el equipo automatizado Beckman AU680.

Cuando la muestra en cuestión es mezclada con el reactivo que contiene los liposomas, el complemento presente es activado mediante complejos inmunes antígeno-anticuerpo contenidos en la membrana de los liposomas, provocando la formación del MAC y por tanto una lisis del liposoma, quien libera a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) contenida dentro de él. Posteriormente,

la G6PDH reacciona con NAD y con glucosa-6-fosfato (segundo reactivo) produciendo una reacción enzimática donde el NAD es reducido a NADH, siendo éste último cuantificado espectrofotométricamente ($\lambda=340$ nm). El aumento en la absorbancia de la muestra es proporcional a la actividad total del complemento (CH50) presente en la muestra.

Es importante mencionar que el intervalo del ensayo CH50 basado en liposomas es lineal dentro de un rango que va de 10 a 60 U/mL. Por lo tanto, los resultados que no entren dentro de este rango pueden no ser fidedignos si las muestras se diluyen. Es por esto que los resultados obtenidos fuera de este rango se expresan como < ó > respectivamente.

6.6 Efecto lítico amibiano de los sueros

Los trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (1×10^6) obtenidos de cultivos celulares se incubaron con 1 mL de cada suero durante 2 h a 36 °C en balancín. Después de este período, la viabilidad celular se determinó mediante la exclusión de azul tripan, por medio de conteo directo en la cámara de Neubauer. La viabilidad se comparó con muestras control que contenían medio de cultivo TYI-S-33 en lugar de suero.

6.7 Purificación del CVF

El factor hipocomplementémico del veneno de cobra (CVF) se purificó a partir de preparaciones comerciales crudas del veneno de *Naja haje* (Sigma) mediante cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico como lo describe Sharma *et al.* (2001). La pureza del CVF fue verificada por medio de

electroforesis SDS-PAGE. La cantidad de CVF fue cuantificada por medio del método de Bradford.

La actividad hipocomplementémica del CVF purificado se evaluó *in vivo* inyectando 100 µg de CVF puro vía intraperitoneal en ratas de ~200 g de peso, de acuerdo con los procedimientos descritos por Van den Berg *et al.* (1991). Posterior a la administración, cada 24 h se sangraron las ratas de la cola (~1.5 mL), el suero se obtuvo por centrifugación a 4 °C y el efecto lítico amibiano *in vitro* se evaluó como ya ha sido mencionado. Este procedimiento se realizó hasta observar la pérdida del efecto lítico amibiano.

6.8 Efecto del CVF *in vitro* e *in vivo*

Para evaluar el efecto hipocomplementémico del CVF *in vitro*, se obtuvo suero de rata fresco y se descomplementó mediante incubación con CVF (5µg / mL) durante 2 h a 36 °C. Enseguida se determinó el efecto lítico amibiano del suero de rata fresco (control) y del preincubado con CVF.

Para los experimentos *in vivo*, se inyectaron 100 µg de CVF vía intraperitoneal en 4 grupos de ratas (4 ratas / grupo) y 24 h más tarde se les inyectaron en la vena porta 1×10^6 amibas / 100 g de peso corporal. Además, 4 grupos de hámsters normales (control) fueron inyectados intraportalmente con la misma cantidad de parásitos. Finalmente, los animales fueron eutanasiados a las 6, 12, 24 y 48 h después de la inyección de los parásitos y sus hígados se procesaron para el análisis histológico, como arriba se menciona.

El nivel de respuesta inflamatoria de cada periodo se determinó contando los leucocitos presentes en micrografías de 13 focos inflamatorios de manera automatizada utilizando el software antes mencionado.

6.9 Susceptibilidad amibiana al suero de rata fresco diluido con suero de hámster

Se obtuvo suero fresco de rata y de hámster como arriba se menciona. El suero de rata se diluyó con suero de hámster en proporción 1:10, 1:1 y 10:1, y se incubó con trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (1×10^6 / mL) durante 2 h a 36 °C en balancín. Enseguida se comparó la viabilidad amibiana con los controles: a) sueros frescos de rata y de hámster sin diluir, y b) suero de rata fresco descomplementado con CVF (5 µg / mL). Este procedimiento se repitió tres veces por duplicado. Además, este experimento fue repetido de la misma manera el mismo número de veces, excepto que se utilizó suero de hámster descomplementado con calor (56 °C x 30 min).

6.10 Suero fresco heterólogo en la infección hepática amibiana del hámster

A un grupo de hámsters (4 animales / grupo) le fueron retirados 3 mL de sangre de la vena cava e inmediatamente después, por la misma vena, se le inyectaron 3 mL de suero fresco de rata. Enseguida, a los hámsters se les inyectaron en la vena porta 1×10^6 amibas virulentas resuspendidas en 2 mL de PBS. Los animales se eutanasiaron 7 días después de la inyección del parásito y los hígados se procesaron por histología como se mencionó anteriormente.

6.11 Inducción de la resistencia amibiana al suero fresco de rata

El suero fresco de rata se diluyó en proporción 1:5 con PBS y se esterilizó por filtración con filtros Millipore de 0.45 µm. Después, en condiciones estériles, los trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (1×10^6) se resuspendieron en 1 mL de suero de rata diluido y se incubaron durante 2 h a 36 °C en balancín. Finalmente, la viabilidad amibiana se determinó por la exclusión del azul tripan en cámara de Neubauer. De manera simultánea, los parásitos sobrevivientes de tubos duplicados se cultivaron y después de 72 h se volvieron a exponer al suero de rata fresco diluido. El procedimiento se repitió 10 veces.

6.12 Niveles C3 y C4 en sueros de rata, hámster y humano

El contenido de C3 y C4 en sueros fresco de rata, hámster y humano se cuantificó mediante un método inmunturbidimétrico. Para este procedimiento se utilizó un kit comercial que utiliza el equipo automatizado Architect c4000 de Abbott Laboratories, Diagnostics Division. El método utilizó anticuerpos de cabra policlonales anti-C3 y anti-C4, y ambas determinaciones se realizaron en tres diferentes animales de cada especie. Además, también se determinó el contenido de proteína total de cada suero.

6.13 Efecto de un inhibidor del receptor C3b sobre la actividad amibicida del complemento de la rata

Para explorar la posible participación de un receptor C3b de *E. histolytica* en la actividad amibicida del complemento de rata, se incubaron 1×10^6 trofozoítos virulentos durante 2 h a temperatura ambiente en balancín en presencia de 5 mg de

azul de tripan (inhibidor de los receptores de C3b) previamente disuelto en 0.5 mL de medio TYI-S-33. Después, las muestras se centrifugaron a 500 g x 3 min, se descartaron 0.45 mL del sobrenadante y se añadieron 0.45 mL del suero fresco de rata previamente incubado con 10 mg de azul tripán durante 1 h a 4 °C en balancín. Enseguida las amibas se incubaron durante 2 h a 37 °C en balancín y la viabilidad celular se determinó como arriba se menciona. Para este experimento, se usaron sueros de ratas Wistar (2 machos y 2 hembras). La viabilidad se comparó con muestras de parásitos control que contenían medio de cultivo más azul tripan.

6.14 Análisis estadístico.

La prueba estadística utilizada se menciona, cuando sea el caso, en las leyendas de las figuras. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7 RESULTADOS

7.1 *E. histolytica* desaparece del hígado de rata en aproximadamente 6 h

Para determinar el tiempo de eliminación del parásito del hígado de la rata, se realizó un estudio curso temporal de la infección hepática amibiana en ratas y hámsters. El tiempo de eliminación del parásito del hígado de la rata fue de ~6 h, con mínimo infiltrado inflamatorio (Fig. 11 A y E). Después de 24 h, solo se observaron lesiones residuales sin parásitos (Fig. 11 B y E). Esto contrasta con lo que ocurre en el hámster, el cual muestra un aumento gradual en la proliferación amibiana, infiltrado inflamatorio y destrucción tisular (Fig. 11 C - E).

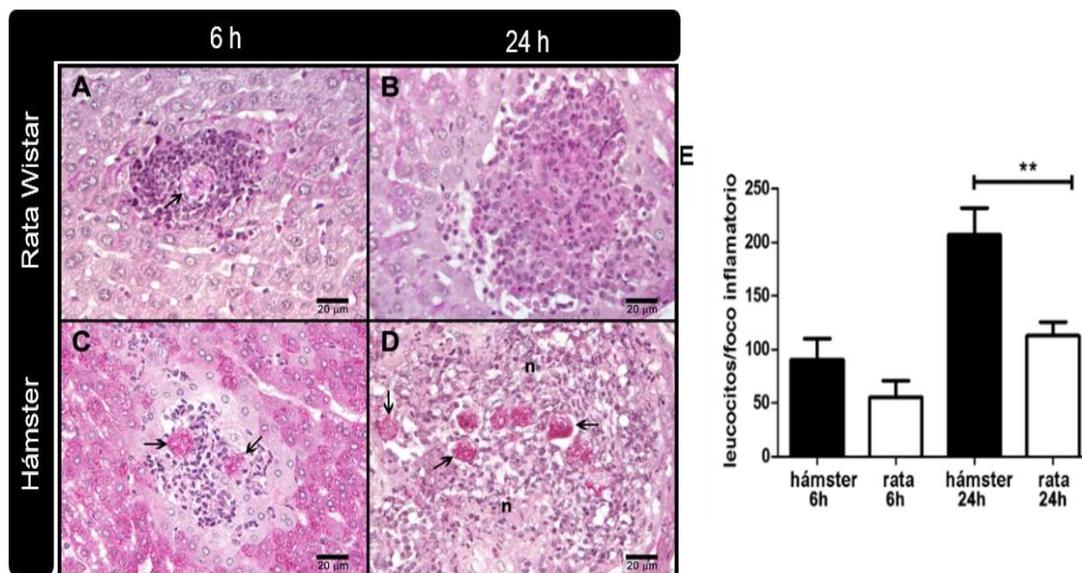


Figura 11. Fotomicrografías de cortes histológicos de hígados de rata y hámster, muestran la supervivencia de *E. histolytica*. Amibas (1×10^6 /100 g de peso) fueron inyectadas en la vena porta de hígados de rata y hámsters normales (4 / por grupo) y después de 6 y 24 h los cortes de hígado fueron procesados para histología y teñidos mediante tinción de PAS. Además del análisis cualitativo, también se cuantificó la

respuesta inflamatoria contando los leucocitos presentes en los focos inflamatorios. **A.** Hígado de rata 6 h después de la infección. Se aprecian escasas amibas, rodeadas por algunas células inflamatorias. **B.** Hígado de rata 24 h después de infección. Sólo se observan lesiones inflamatorias residuales sin amibas. **C.** Hígado de hámster después de 6 h de infección. Se observan amibas bien conservadas rodeadas por células inflamatorias y necrosis. **D.** Hígado de hámster después de 24 h de infección. Se observan abundantes parásitos bien conservados con destrucción tisular. **E.** El infiltrado inflamatorio incrementa solamente en el hámster después de 24 h de infección. Las amibas (flechas) y la necrosis (n) están señaladas. Para comparar ambos grupos se utilizó ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni (nivel de significancia establecido en $P \leq 0.0083$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica; ** $P \leq 0.01$. Los datos se presentan como la media \pm EEM.

7.2 La actividad amibicida *in vitro* del suero de rata se correlaciona con su resistencia a la infección hepática amibiana

Para conocer si el complemento estaba relacionado con la rápida eliminación de *E. histolytica* del hígado de la rata, se determinó la actividad amibicida *in vitro* del suero fresco de rata (resistente) y del suero fresco de hámster (susceptible). La actividad amibicida de los diferentes sueros de hámster muestran gran variabilidad (26-96%), sin embargo la correspondiente a las ratas es 100% lítica para el parásito (Fig. 12).

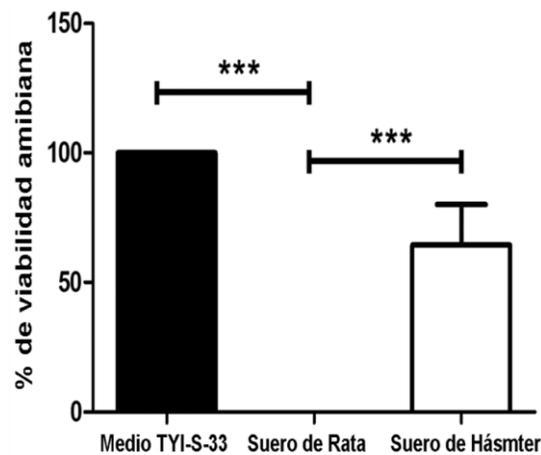


Figura 12. Susceptibilidad de *E. histolytica* a suero fresco de hámster y rata.

Las amibas (1×10^6 / mL) fueron incubadas con suero fresco de rata y de hámster (4 animales / especie), y en medio de cultivo como control. Después de 2 h se determinó la viabilidad amibiana. Mientras que con el suero de hámster la sobrevivencia amibiana es variable, con el de rata siempre es cercana a 0%. El análisis estadístico se realizó mediante el uso de ANOVA de una vía, la comparación entre los grupos se realizó según la corrección de Bonferroni (nivel de significancia, $P \leq 0.016$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica; *** $P \leq 0.001$. Los datos se presentan como media \pm EEM.

7.3 Los niveles de CH50 en las diferentes especies animales no está relacionado con su actividad amibicida

Se determinaron los niveles de CH50 en el suero de los animales normales, ya sea susceptibles (hámster, humano) o resistentes (conejo, vaca, cordero, cabra, ratas Long Evans y Wistar, y cobayo) a la amibiasis y se compararon con su actividad lítica sobre *E. histolytica*.

De todos los tipos de animales analizados, los sueros de la cabra y el humano mostraron los niveles más altos de CH50 (todas las muestras de cabra son >60 U/mL y las de humano están entre 50 y >60 U/mL). Por el contrario, el hámster mostró los niveles de CH50 más bajos (todas las muestras <10 U/mL), sin embargo en todos los demás animales se observaron niveles variables de CH50, que van de 17.5 a 48.5 U/mL (Fig. 13A). Además, los niveles de CH50 de los sueros de las diferentes especies animales no se correlaciona con su actividad amibicida ya que los que tienen una mayor actividad de CH50 (humanos y ratas) permiten una sobrevida amibiana de 60 y ~0%, respectivamente. Además, los sueros de hámster, que contienen el nivel más bajo de CH50, mostraron actividad amibicida similar al grupo humano (Fig. 13B).

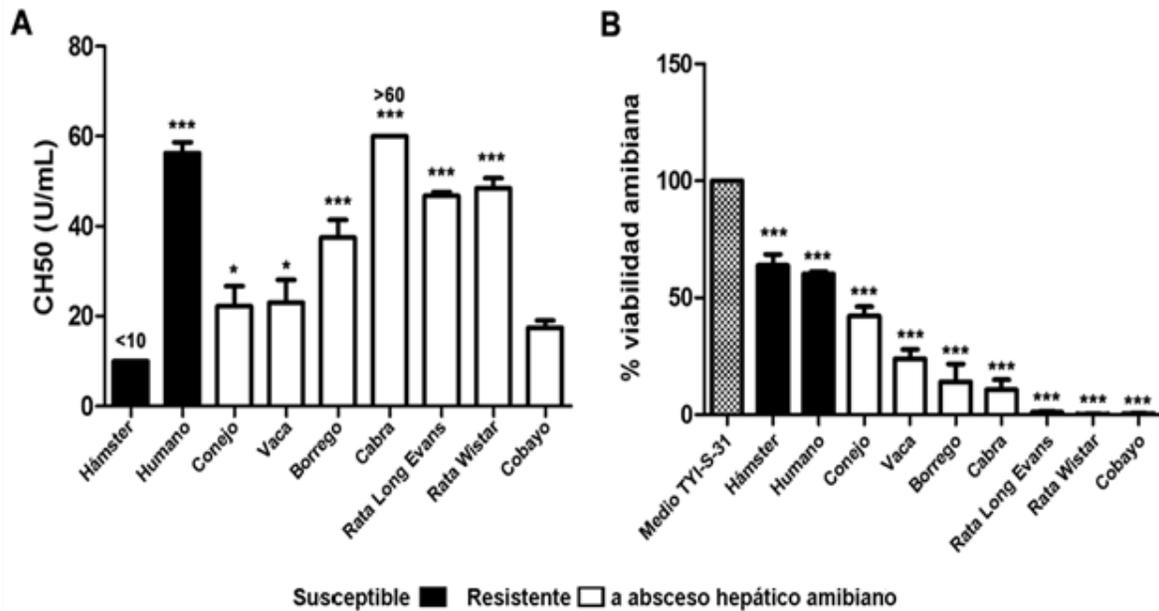


Figura 13. Niveles de CH50 de los sueros de diferentes mamíferos y su correlación con la actividad amibicida. A. Niveles séricos de CH50 de las diferentes especies animales (4 / grupo) determinados mediante el ensayo basado en liposomas. **B.** Niveles de susceptibilidad amibiana al suero de las diferentes especies de mamíferos. Trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (1×10^6 / mL) fueron incubados con los sueros de las diferentes especies (4 / especie) y después de 2 h se determinó la viabilidad amibiana. No se observa una correlación directa entre ambos valores. De todos los animales, solamente el hámster y la cabra no se encontraron dentro del rango confiable de este ensayo (10-60 U/mL). El análisis estadístico se realizó mediante el uso de ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Dunnett ($\alpha=5\%$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al hámster (en **A**) y al grupo control (amibas en medio TYI-S-33) (en **B**) como se indica; * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$. Los datos se presentan como media \pm EEM.

7.4 La actividad amibicida del suero de rata es más alta que la del suero de hámster y se debe al complemento

Para medir la potencia lítica del suero de rata, éste se diluyó con suero de hámster fresco y suero de hámster descomplementado por calor. La actividad amibicida del suero de rata se mantiene si se diluye diez veces con suero de hámster fresco. Esta actividad se debe al complemento ya que la preincubación con CVF inhibió por completo la actividad lítica sobre *E. histolytica* (Fig. 14A). Además, cuando se diluye suero de rata fresco con suero de hámster inactivado por calor (hipocomplementémico), el complemento de rata mantiene su potente actividad amibicida; incluso cuando está en dilución 1:10 destruye casi todos los parásitos (~87%) (Fig. 14B). Otro resultado interesante fue que las amibas no desarrollan resistencia al complemento de rata después de repetidas exposiciones (10 veces) a concentraciones DL50.

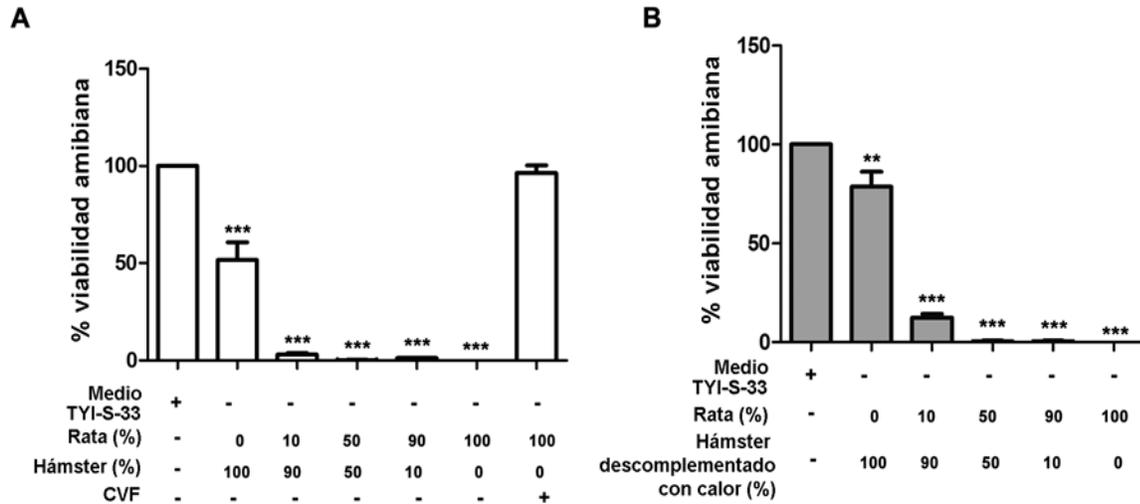


Figura 14. Efecto lítico amibiano del suero de rata fresco diluido con suero de hámster. **A.** Trofozoítos de *E. histolytica* (1×10^6 / mL) fueron incubados con suero de rata fresco, suero preincubado con CVF o suero diluido con suero de hámster y después de 2 h se determinó la viabilidad amibiana. **B.** Se realizó un procedimiento similar pero con suero de rata diluido con suero de hámster descomplementado por calor 1:10, 1:1, 10:1. Ambas determinaciones en (A) y (B) se realizaron tres veces por duplicado. Además, en ambos grupos se incluyeron sueros de hámster y rata sin diluir (controles). El análisis estadístico se realizó mediante el uso de ANOVA de una vía con post-prueba estadística de Dunett ($\alpha=5\%$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control (amebas en medio TYI-S-33) como se indica; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Los datos se presentan como media \pm EEM.

7.5 El complemento es un factor de resistencia natural de la rata a la infección hepática amibiana

Para explorar si el complemento está involucrado en la resistencia natural de la rata a la infección hepática amibiana, la sangre de hámster se diluyó de manera *in vivo* con suero de rata fresco o suero de rata descomplementado por calor antes de la inyección intraportal con las amibas virulentas. De estos tratamientos, solamente el suero de rata fresco confirió resistencia al hámster a la infección hepática amibiana. Además, contrario a los hámsters control (Fig. 15A), los parásitos desaparecieron de los hígados en ausencia de daño tisular (Fig. 15B).



Figura 15. Resistencia del hámster a la infección hepática amibiana inducida por transferencia intravenosa de suero de rata fresco. A los hámsters (4 animales / grupo) le fueron retirados tres mililitros de sangre total, los cuales fueron remplazados inmediatamente con tres mililitros de suero de rata fresco o tres mililitros de suero de

rata inactivado por calor (control), paso seguido se inyectó por vena porta 1×10^6 amibas y los animales se eutanasiaron después de 7 días. **A.** Aspecto macroscópico de los hígados de hámster tratados con suero de rata descomplementado por calor (control). Se observan múltiples lesiones tisulares además de hepatomegalia. **B.** Hígados de hámster tratados con suero de rata fresco. Se observa una completa inhibición del absceso hepático amibiano.

7.6 El complemento no es el único factor de resistencia de la rata a la infección hepática amibiana

Para determinar si el complemento es el único factor de resistencia natural de la rata contra *E. histolytica*, se realizó un estudio histológico curso temporal de la infección hepática amibiana en ratas normales y de complementadas mediante la inyección intraperitoneal con CVF. La hipocomplementemia no hizo susceptible a la rata al AEAE. Ésta únicamente prolongó la supervivencia de las amibas de 6 a 12 h, en la cual se pueden observar algunos parásitos rodeados por leucocitos polimorfonucleares (Fig. 16A). Sin embargo, a pesar de la hipocomplementemia, los parásitos desaparecen después de las 24 h (Fig. 16B). Por el contrario, el hígado de hámster se caracterizó por un aumento gradual de amibas, infiltrado inflamatorio y daño tisular (Fig. 16 C - E).

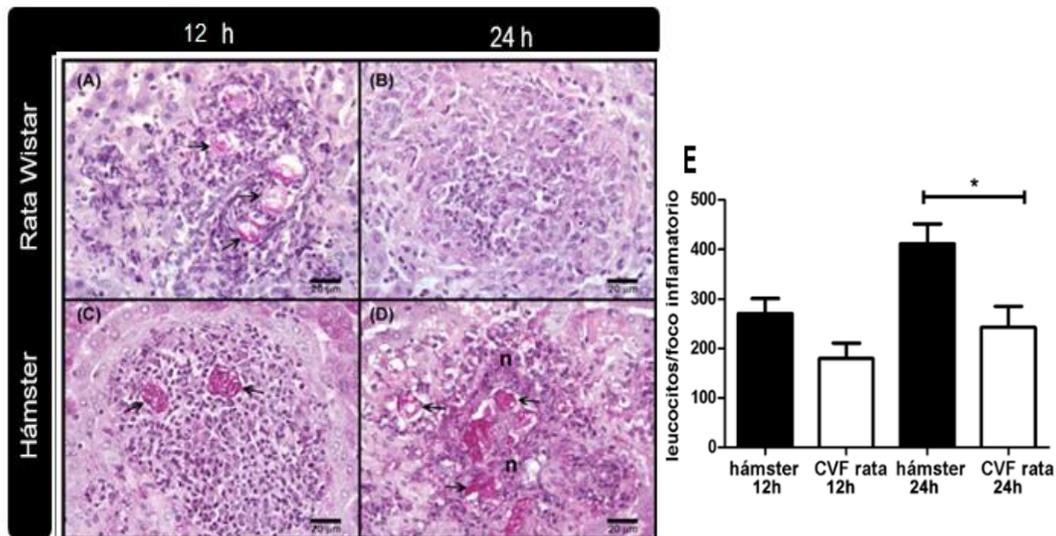


Figura 16. Supervivencia de *E. histolytica* en hígados de hámster normal e hígados de ratas hipocomplementémicas. Amibas ($1 \times 10^6/100$ g de peso) fueron inyectadas en la vena porta de hígados de rata descomplementadas y hámsters normales (4 / por

grupo) y después de 12 y 24 h los hígados fueron procesados para histología y teñidos mediante tinción de PAS. También se determinó la respuesta inflamatoria contando los leucocitos presentes en los focos inflamatorios. **A.** Rata tratada con CVF después de 12 h de infección. Las amibas se encuentran bien conservadas, rodeadas por pocas células inflamatorias y sin daño tisular. **B.** Rata tratada con CVF después de 24 h de infección. Se observan lesiones inflamatorias residuales sin amibas. **C.** Hámster después de 12 h de infección. Se observan amibas bien conservadas rodeadas por células inflamatorias. **D.** Hámster después de 24 h de infección. Los parásitos bien conservados y la destrucción tisular incrementan. **E.** Después de 24 de infección, el nivel inflamatorio en los hígados es más alto solamente en los hámsters. Las amibas (flechas) y la necrosis (n) están indicadas. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, α se estableció en 0.0125 de acuerdo con la corrección de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica; * $P \leq 0.05$. Los datos se presentan como media \pm EEM.

7.7 C3b está relacionado con la potente actividad amibicida del complemento de rata

Para determinar si los niveles de C3 y C4 están asociados con la actividad amibicida del complemento de rata, se compararon los niveles de estas proteínas con los del hámster y humano. La rata, que es resistente al AHAE, mostró niveles más bajos de C3 y C4 en comparación con el hámster y el humano, que son susceptibles a la infección hepática amibiana (Fig. 17A). Por otro lado, se investigó si un receptor de C3b podría estar implicado en la actividad amibicida del complemento de rata. Para ese propósito, se determinó la capacidad lítica amibiana del suero fresco de rata y del suero fresco de rata incubado con azul tripan, que es un inhibidor del receptor de C3b. En el suero incubado con azul tripan, la actividad lítica del complemento de rata hacia *E. histolytica* se inhibió considerablemente (Fig. 17B), lo que sugiere que un receptor amibiano de C3b de rata está implicado en este fenómeno.

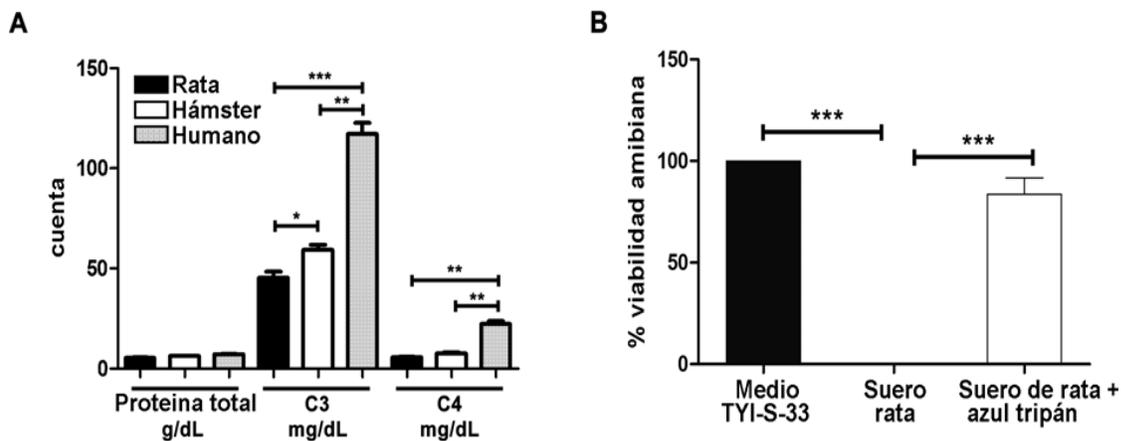


Figura 17. Cuantificación de los factores de (C3 y C4) mg/dL en suero fresco de rata, hámster y humano y efecto del azul tripán sobre la actividad lítica amibicida del complemento de rata. A. Niveles de C3 y C4 en los diferentes sueros, determinados mediante un método inmunturbidimétrico de tres especies diferentes, tanto resistentes (rata) y susceptibles a infección hepática amibiana (Hámster y humano). También, en todas las muestras, se determinó la cantidad de proteína total (g/dL). No se observa diferencia estadísticamente significativa en las proteínas totales de todas las muestras, sin embargo en todos los grupos sí hay diferencia significativa en los niveles de C3 y C4. **B.** Efecto del azul tripan sobre la actividad lítica amibicida del suero fresco de rata. Suero fresco de cinco ratas se incubó por separado con trofozoítos virulentos (1×10^6 / mL) durante 2 h, con y sin azul tripan. Después, la viabilidad amibiana se determinó y se comparó con la viabilidad de las amibas en el medio de cultivo (TYI-S-33). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, α se estableció en 0.016 de acuerdo con la corrección de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos como se indica; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$. Los datos se presentan como media \pm EEM.

8. DISCUSIÓN

A través de la evolución, *E. histolytica* ha desarrollado diversas estrategias para sobrevivir en sus hospederos, sobre todo las relacionadas con la evasión de la inmunidad innata (complemento y TLR) y adaptativa (inmuno-modulación) (Sacks y Sher, 2002). La presencia, ausencia y/o las diferencias estructurales en las moléculas involucradas en la respuesta inmune del hospedero podrían determinar la susceptibilidad o resistencia a una infección específica. Tal es el caso de la rata ante la infección causada por *E. histolytica* ya que, a diferencia de otras especies como el hámster, ésta es resistente a desarrollar infección hepática amibiana (Fig. 12).

Debido a que el ciclo de vida del parásito no se ha logrado reproducir en animales de experimentación, el modelo del absceso hepático amibiano experimental en hámsters (AHAE), ha sido ampliamente utilizado para explorar los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*, debido a su gran reproducibilidad y similitud con la enfermedad hepática amibiana humana.

En los experimentos realizados en este trabajo, todas las especies de animales examinadas mostraron niveles séricos variables de CH50 (Fig. 13A) los cuales no se correlacionan con su efecto amibicida (Fig. 13B). La activación del complemento humano por la vía clásica y la alterna ha sido observada en *E. histolytica*. La participación de la vía alterna o la vía de las lectinas del complemento en el efecto amibicida del suero no pueden ser descartadas ya que el ensayo de CH50 utilizado en este trabajo solamente evalúa la actividad de la vía clásica del complemento (Hamelmann *et al.*, 1992). El reconocimiento especie específico de la vía alterna del

complemento ha sido ampliamente documentado. En este trabajo, el efecto lítico amibicida que muestran los sueros frescos de cobayo y rata (Wistar y Long Evans) fueron sorprendentes. La resistencia al complemento humano observada en diferentes cepas amibianas o bien, la adquirida por la exposición repetida de *E. histolytica* con sueros de humano y hámster se correlaciona con su virulencia. De todas las especies animales analizadas, las amibas virulentas mostraron los más altos niveles de resistencia a los sueros frescos de hámster y humano (Fig. 13B). Esto pudo deberse a: 1) que la adhesina amibiana contiene un epítipo parecido al CD59 en humanos (proteína inhibitoria del MAC), 2) la activación del complemento en fase fluida por una proteasa de cisteína amibiana y 3) la incorporación y exposición de los reguladores del complemento en la superficie del parásito. A diferencia de esto, en los experimentos mostrados aquí, *E. histolytica* virulenta fue completamente susceptible el suero fresco de rata (Fig. 12) y ésta no desarrolla resistencia después de diez exposiciones repetidas, aún en una dilución subletal del suero de rata. Además, el potente efecto amibicida del suero fresco de rata se mantiene cuando se diluye diez veces con suero de hámster fresco o descomplementado (Fig. 14). En este trabajo se demostró que tal efecto se debe al complemento ya que se observó una viabilidad amibiana ~100% cuando el suero fresco de rata es incubado con CVF (Fig. 14A), que consume específicamente al complemento debido a su actividad de C3 convertasa. Por otro lado, a pesar de que el C3 es una proteína presente en las tres vías del complemento y C4 pertenece a la vía clásica y de las lectinas, su concentración en suero no se correlaciona con la actividad amibicida de los sueros de las especies resistentes y susceptibles a la infección hepática amibiana (Fig. 17A).

Por otra parte, se sabe que la lisis celular dependiente del MAC es hasta 100 veces más eficiente en superficies que contienen C3b que las desprovistas de éste (Guckian *et al.*, 1978). Además, la unión de la properdina a la superficies que activan el complemento es necesaria para estabilizar a la C3 convertasa de la vía alterna. Se ha observado que la activación de la vía alterna del complemento de rata por *Babesia rodhaini* da como resultado la unión de C3b a través del receptor C3b del parásito. Tal unión facilita la infección de los eritrocitos ya que también contienen un receptor para C3b. Se sabe que el azul tripan es capaz de bloquear los receptores C3b del complemento presentes en diferentes parásitos y células de diferentes especies animales. De forma similar, la unión de C3b del complemento de rata a la superficie amibiana puede estar involucrado en su potente actividad amibicida ya que su efecto fue inhibido por el azul tripan (Fig. 17B), que como ya se mencionó bloquea a los receptores de C3b.

El Factor H (FH) es un regulador negativo de la vía alterna del complemento que promueve la inactivación de C3b y opera tanto en la fase fluida como en las superficies propias. Varios patógenos como *Borrelia hermsii*, *Neisseria meningitidis*, estreptococos del grupo A, *Yersinia enterocolitica* y *Candida albicans* unen FH para promover la inactivación del complemento en sus superficies (Canales-Treviño *et al.*, 1990). Por el contrario, una baja afinidad de la superficie amibiana por el FH puede estar involucrada en la poderosa actividad amibicida del complemento de la rata. Nuestros hallazgos sugieren que la vía alternativa de complemento de la rata es la principal responsable de su poderosa actividad amibicida.

Por otra parte, en varios animales como el ratón, el conejo y el cobayo el parásito induce daño reversible en el tejido hepático y las amibas son eliminadas en

diferentes tiempos (Jarillo-Luna *et al.*, 2002). Contrario a esto la infección hepática amibiana en hámster y humanos es letal. Por lo tanto, es posible que todas las especies animales mencionadas anteriormente tengan diferencias en su inmunidad innata y/o adquirida las cuales pueden favorecer o evitar la supervivencia amibiana y el daño tisular.

En los experimentos *in vivo* realizados en este trabajo, *E. histolytica* desapareció del hígado de rata en aproximadamente 6 h con mínimo o nulo infiltrado inflamatorio (Fig. 11) y la hipocomplementemia prolongó el tiempo de depuración amibiana a 12 h, en el cual se observaron algunos parásitos rodeados de células inflamatorias (Fig. 16). Esto sugiere que el sistema de complemento es responsable de la eliminación temprana de las amibas (aproximadamente en 6 h) del hígado de rata y además apoya la idea que en este animal, y a diferencia de los hámsters, existen otros factores de resistencia natural a la amibiasis. Dentro de éstos, las células inflamatorias podrían ser responsables de la desaparición tardía de las amibas, (después de 12 h) probablemente por la actividad de la enzima iNOS que produce óxido nítrico, un radical libre extremadamente tóxico para *E. histolytica* (Olivos *et al.*, 2005). De acuerdo con esto, los macrófagos de diferentes especies animales tienen grandes diferencias en la expresión de iNOS en respuesta a un estímulo común; por ejemplo, los macrófagos alveolares de rata, pero no los de hámster o humano, sobre expresan la proteína iNOS en respuesta a LPS más IFN- γ . Por otra parte, en este trabajo también se demostró que la resistencia de la rata puede ser transferida a otras especies susceptibles ya que cuando se inyectó suero de rata fresco a los hámsters por vía intravenosa, seguida de la inyección parásitos a través de la vena porta, no se observó daño en el tejido hepático después de 7 días de

infección (Fig. 15). También, durante las primeras etapas de la infección de estos animales se observaron similitudes histológicas con la infección hepática amibiana de la rata; es decir, las amibas se observan bien conservadas hasta las 6 h y están rodeadas por un escaso o nulo infiltrado inflamatorio (Fig. 16). Además, el suero de rata fresco inactivado mediante calor (56 °C durante 30 min) no protege al hámster de la infección hepática amibiana. Estos hallazgos indican que el suero fresco de rata confiere a los hámsters resistencia a la infección hepática amibiana (como ratas) incluso en presencia de células y moléculas del hámster que son permisivas para la infección hepática amibiana. Por el contrario, el suero de hámster fresco inyectado en la vena cava de la rata no modificó su resistencia a la infección hepática amibiana, posiblemente debido a la constante síntesis del complemento y a la presencia de macrófagos activados que producen NO \cdot y ROS.

En resumen, estos resultados muestran que los niveles de complemento (CH50) presentes en los sueros frescos de diferentes especies animales no correlacionan con su actividad amibicida. Además, el complemento presente en el suero, a través de su vía alterna, es responsable de la resistencia natural de la rata a la infección hepática amibiana.

9. CONCLUSIÓN

El complemento sérico, a través de la vía alterna, contribuye a la resistencia natural de la rata a la amibiasis hepática experimental. Por supuesto, la rata puede albergar otros factores de resistencia (como las células PMN y/o los macrófagos) para la resistencia a la infección por *E. histolytica*.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A.K., Lichtman A.H., Pillai, S. (2010). Cellular and Molecular Immunology (6th ed) Elsevier. pp. 272–288. ISBN 978-1-4160-3123-9.
2. Albright, J.F., Albright, J.W. (1984). Natural resistance to animal parasites Contemp Top Immunobiol.12:1-52
3. Alexander, J.J., Quigg, R.J. (2007). The simple design of complement factor H: Looks can be deceiving. Mol Immunol. 44(1-3):123-132
4. Becerril-Marco (2011). Parasitología médica 4° ed. CDMX, México Mc Graw Hill.
5. Biedzka-Sarek, M., Jarva, H., Hyytiäinen, H., Meri, S. and Skurnik, M. (2008). Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O: 3. Infect Immun 76: 4100–4109.
6. Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. J Clin Invest 90, 1131-1137
7. Calderon, J. and Schreiber, R.D. (1985). Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. Infect Immun 50(2):560-5
8. Calderon, J. and Tovar, R. (1986). Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* HM1 by treatment with human serum. Immunology. 58(3):467-71

9. Canales-Treviño, M.L., Tsutsumi, V. and Martínez-Palomo, A. (1990). Role of macrophages and T-lymphocytes: resistance of guinea pigs to amoebic liver infection. *Arch Invest Med (Mex)* 21S:81-84
10. Costabile, M. (2010). Measuring the 50% Haemolytic Complement (CH50) Activity of Serum. *J Vis Exp.* 2010; (37): 1923. Published online Mar 29. doi: 10.3791/1923
11. Cruz-Baquero, A., Cárdenas-Jaramillo, L.M., Gutiérrez-Meza, M., Jarillo-Luna, R.A., Campos-Rodríguez, R., Rivera-Aguilar, V. (2017). Different behavior of myeloperoxidase in two rodent amoebic liver abscess models.
12. Denham, E., Mohn, B., Tucker, L., Lun, A., Cleave, P. and Boswell D.R. (2007). Evaluation of immunoturbidimetric specific protein methods using the Architect ci8200: comparison with immunonephelometry. *Ann Clin Biochem* 44(6):529-53
13. Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 72: 431-432
14. Dobozy, A., Hunyadi, J., Kenderessy, A.S., Krizsa, F., Boda, K. and Simon N. (1983). A comparative study of the inhibitory effect of trypan blue on mouse erythrocyte and C3 binding receptors of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and patients suffering from chronic lymphocytic leukaemia. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*
15. Espinosa-Cantellano, M. and Martinez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical microbiology reviews* 13, 318-331

16. Fine, D.P., Harper, B.L., Carpenter, E.D., Davis, C.P., Cavallo, T. and Guckian, J.C. (1980). Complement-independent adherence of *Escherichia coli* to complement receptors *in vitro*
17. Guckian, J. C., Christensen, W.D. and Fine D.P. (1978). Trypan blue inhibits complement-mediated phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 120:1580-1586
18. Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sillivan, J.A., Mandell, G.L. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.* 143:83-92
19. Gutierrez-Kobeh, L., Cabrera, N. and Pérez-Montfort, R. (1997). A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol* 83:234-24
20. Hamelmann, C., Foerster, B., Burchard, G.D. and Horstmann, R.D. (1992). Lysis of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by human complement: methodological analysis. *Parasite Immunol* 14(1):23-35
21. Hammer, C.H., Abramovitz, A.S. and Mayer M.M. (1976). A new activity of complement component C3: cell-bound C3b potentiates lysis of erythrocytes by C5b,6 and terminal components. *J Immunol* 117(3):830–834
22. Harper, B.L., Fine, D.P., Guckian, J.C. and Cavallo, T. (1981). Trypan blue inhibition of complement receptor function on various cells. *Immunol* 42(1):61-66
23. Haque, R. Mondal, D., Kirkpatrick. B.D., Akther, S., Farr, B.M., Sack, R.B., Petri, W.A. Jr. (2003). Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool

- children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69 (4):398-405
24. Inal, J.M. (2004). Parasite interaction with host complement: beyond attack regulation. *Trends Parasitol* 20(9):407-12
25. Jack, R.M. and Ward, P.A. (1980). The role *in vivo* of C3 and the C3b receptor in *babesia* infection in the rat. *J Immunol* 124
26. Jarillo-Luna, R.A., Campos-Rodriguez, R. and Tsutsumi, V. (2002). *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp Parasitol.* 101:40-56
27. Joiner, K. A., Brown, E. J., and Frank, M. M. (1984). Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. *Ann Rev. Immunol.* 2:461
28. Lin, J.Y. and Chadee, K. (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 148:3999-4005
29. Łukawska, E., Polcyn-Adamczak, M. and Niemir, Z.I. (2018). The role of the alternative pathway of complement activation in glomerular diseases. *Clin Exp Med* 18(3):297-318
30. Lloyd, J.B., Beck, F. and Griffiths, A. (1967). Lysosomal enzyme inhibition by trypan blue: a theory of teratogenesis. *Science.* Sep 8;157(3793):1180–1182
31. Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., González Canto, A., García de León, M.C., Olivos, A. and Tello, E. (1993). Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *J Parasitol* 79(1):98-105

32. Morrison, D. and Kline, L.L. (1977). Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol* 118: 362-368
33. Noris, M. and Remuzzi, G. (2013). Overview of complement activation and regulation. *Semin. Nephrol.* 33, 479–492.
34. Olivos, A., Ramos, E., Nequiz, M., Barba, C., Tello, E., Castañón, G. (2005). *Entamoeba histolytica*: mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Exp Parasitol* 110(3):309-312
35. Pérez-Tamayo, R., Becker, I., Martínez, R.D., Olivos, A., Montfort, I., Pérez-Montfort, R. (1990). The mechanism of natural resistance in the rat to *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med.* 21 Suppl 1:157-161
36. Pinilla, A. E., López, M. C., Viasus, D. (2008). History of *Entamoeba histolytica* protozoan. *Revista Médica de Chile*; 136: 118-124
37. Reed, S.L. and Gigli, I. (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
38. Sacks, D., and Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3(11):1041-7
39. Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2014). The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011 Jan;343(1):227-35. doi: 10.1007/s00441-010-1034-0. Epub 2010 Sep 14
40. Sharma, S., Jabeen, T., Singh, R.K., Bredhorst, R., Vogel, C.W., Betzel, C. (2001). Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification,

crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 596-598

41. Song, W.C., Sarrias, M.R. and Lambris, J.D. (2000). Complement and innate immunity. *Immunopharmacology* 49(1-2):187-98
42. Tannich, E. (1998). Amoebic disease. *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*: comparasion of molecules considered important for hosttissue destrucción. *Trans, R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92(6):593-6
43. Toche, P. (2012). Panoramic vision of the inmune system. *Clinical medical journal CONDES* 23(4); 446-457.
44. Tsutsumi, V. and Shibayama, M. (2006). Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. *Archives of Medical Research.* 37: 210-220
45. Van den Berg, C.W., Aerts, P.C., Van Dijk, H. (1991). *In vivo* anti-complementary activities of the cobra venom factors from *Naja naja* and *Naja haje*. *Inmmunol Methods* 5;136(2):287-94.
46. WHO: World Health Organization (2002). Amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiologic Record* 72: 97-100.
47. Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadéz, A., Gómez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect. Genet. Evol.* 9 (6):1023-32.
48. Yoon, J.G., Park, B.G., Kwon, S.S., Song, J. and Kim, H.S. (2016). Automated CH50 liposome-based immunoassay: consideration in dilution and validation of reference interval. *Clinical Chemistry Laboratory of Medicine* 54(10):e309-12

APÉNDICE

A. Información sobre las pruebas realizadas

- **Inhibidor del receptor de C3b (Azul tripan)**

El azul tripan es un colorante ácido diazo sulfonado, cuyo mecanismo de acción no ha sido bien caracterizado. Se propone que sus anillos sulfonados poseen la capacidad de unirse a proteínas tales como las enzimas lisosomales, a tiroglobulina (T4) y a sitios específicos en la albúmina sérica (Lloyd *et al.*, 1967).

El azul tripan ha sido ampliamente utilizado como agente inhibidor de la fagocitosis mediada por complemento ya que se une a los receptores de C3b impidiendo su interacción con la célula receptora. Además, este colorante ha sido utilizado *in vivo* e *in vitro* para estudiar la función del receptor de C3b en diversos aspectos de la respuesta inmune (Guckian *et al.*, 1978).

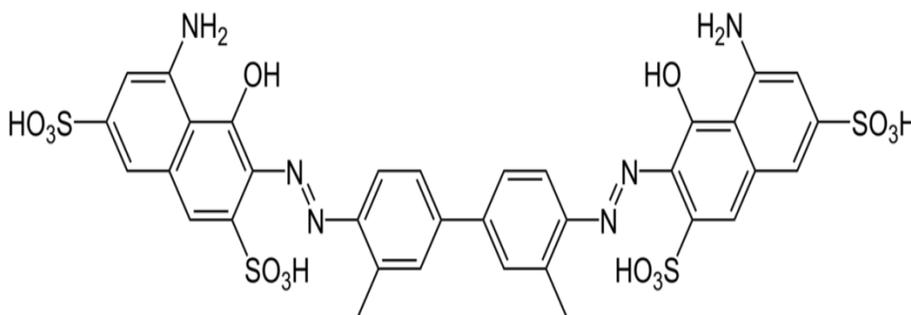


Figura 18. Estructura química del azul de tripan

- **Prueba de CH50 (complement hemolytic 50)**

La actividad total de complemento CH50 es una prueba realizada para evaluar el nivel de funcionamiento del sistema del complemento, debido a que ésta evalúa la actividad lítica total y no los niveles de sus factores o componentes.

Este ensayo es un análisis lítico que determina la cantidad de complejos de complemento terminales, es decir complejos de ataque a la membrana, requeridos para producir una lisis del 50% de eritrocitos de oveja sensibilizados o liposomas, según sea el reactivo utilizado (Costabile, 2010).

- **Factor hipocomplementémico del veneno de (cobra CVF).**

A principios del siglo XX se descubrió que el veneno de cobra poseía una fuerte actividad inhibitoria del complemento. Desde entonces el CVF ha sido utilizado para consumir de manera eficaz y selectiva al sistema de complemento (Sharma *et al.*, 2001).

El CVF es una proteína presente en el veneno de cobra y tiene un peso molecular de ~149 KDa. Con el fin de explorar las funciones del sistema de complemento, éste es utilizado en investigación para descomplementar selectivamente el complemento presente en el suero de diferentes especies de mamíferos, especialmente la multifuncionalidad de la molécula de C3, debido a que tiene una similitud estructural y funcional con el CVF. Además, debido a que el CVF posee actividad tipo C3b, en presencia de Mg^{2+} se le une el factor B de la vía alterna, que son consecutivamente activados por el factor D formando la convertasa de C3 dependiente de CVF (CVFBb). Esta convertasa de C3 dependiente de CVF es extremadamente estable comparada con la convertasa C3 normal de la vía alterna

(C3bBb), ya que no es reconocida por los inhibidores (factores H e I) de la vía alterna. Eventualmente, del mismo modo como sucede en la cascada de la vía alterna, la convertasa CVFBb posee la capacidad de activar a la molécula de C5. El tiempo de vida media del CVF es variable entre especies, (conejo 32 h y ratón 24 h). La eliminación del CVF *in vivo* es acelerada por la generación de anticuerpos anti-CVF (~ 5 días). Debido a la formación de estos anticuerpos anti-CVF no es posible generar el efecto inhibitorio por segunda vez en el mismo animal, aún si se le administrara una dosis mayor (Van den Berg *et al.*, 1991).

B. Preparación de reactivos

Stock de fosfatos pH 7.2

NaH₂PO₄·H₂O.....0.15 M

NaH₂PO₄.....0.15 M

Adicionar monobásico al dibásico hasta llegar a un pH final de 7.2

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Stock de fosfatos.....100 mL

NaCl.....14.4 g

Disolver el NaCl y aforar a un volumen de 1 L con agua desionizada

Preparación de azul de tripan

Azul de tripan..... 400 mg

PBS.....100 mL

Disolver el azul de tripan en 100 mL de PBS

Medio de cultivo TYI-S-33

Biosate peptona..... 120 g

Dextrosa..... 40 g

K₂HPO₄..... 4 g

KH₂PO₄.....2.4 g

NaCl..... 8 g

Cisteína..... 4 g

Ácido Ascórbico..... 0.8 g

Citrato férrico de amonio (FAC)... 90mg

Disolver secuencialmente los compuestos en 3480 mL de agua bidestilada.

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1N

Filtrar con papel filtro

Esterilizar a 121 °C por 15 min

Suplementar el medio con vitaminas 3% (tween 80 Mixtone) y suero bovino adulto 10%

Persulfato de amonio (APS)

Persulfato de amonio..... 50.0 mg

Disolver en 500 µL de agua desionizada. Preparar al momento

Amortiguador pH 8.8 (Tris/HCl)

Tris 1.5 M 18.15 mg
Aforar a un volumen de 100 mL con agua desionizada y ajustar el pH con HCl

Amortiguador pH 6.8, 0.5 M (Tris/HCl)

Tris 6.0 mg
Ajustar el pH con HCl y aforar a un volumen de 100 mL con agua desionizada.

Gel separador (para 4 geles al 12%)

H₂O..... 4.8 mL
Glicerol 3.2 mL
Amortiguador pH 8.8 (Tris/HCl) 6.0 mL
SDS 10%240 µL
Acrilamida9.6 mL
APS 100 µL
TEMED 20 µL (adicionar al final)

Gel concentrador (para 4 geles)

H₂O 6.0 mL
Glicerol 0.8 mL
Amortiguador pH 6.8 (Tris/HCl) 1.0 mL
SDS 10% 1.6 mL
TEMED 15 µL
Aforar a 1L con agua desionizada

Amortiguador de corrida con SDS

Tris 25 mM 3.03 g
Glicina 192 mM 14.41 g
SDS 10% 10 mL
Aforar a 1L con agua desionizada

C. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (BIORAD)

- Curva estándar

En tubos Eppendorf se añaden las cantidades señaladas en la siguiente tabla:

# Tubo	H ₂ O (μL)	Albumina (mg/mL)
1 (Blanco)	1000	0
2	800	200
3	600	400
4	400	600
5	100	900

Tabla 1. Curva estándar

Se coloca en otra serie de tubos Eppendorf 1 mL del reactivo de Bradford y se adicionan 20 μL del tubo correspondiente a la Tabla 1, se homogeniza perfectamente y la absorbancia de cada tubo se determina a $\lambda = 595\text{nm}$

Se traza una curva de calibración Abs vs Conc de albúmina y se interpola el resultado de la muestra problema.

Nota: El reactivo de Bradford (BIORAD) se diluye 1:5 en H₂O

D. Tinción de PASS

1. Los cortes se Desparafinan y deshidratan como a continuación se indica:
 - a. Xilol 1, 30min
 - b. Xilol 2, 30min
 - c. Xilol-alcohol absoluto, 45min
 - d. Alcohol absoluto, 20min
 - e. Alcohol 96%, 20min
 - f. Agua de la llave
 - g. Agua destilada
2. Colocar las laminillas en ácido peryódico (0.5%) por 10 min
3. Realizar 3 lavados con agua destilada
4. Incubar con reactivo de Schiff 10 min
5. Lavar con agua destilada
6. Colocar las laminillas en disulfito de sodio (0.5%) por 6 min
7. Lavar con agua de la llave por 10 min
8. Colocar las laminillas en hematoxilina de Harris 5 min
9. Pasar las laminillas en alcohol ácido (1 baño rápido)
10. Lavar las laminillas con agua de la llave
11. Pasar las laminillas en solución de carbonato de Litio 1% (3 veces)
12. Lavar las laminillas con agua de la llave
13. Regresar las laminillas por el tren de deshidratación en el orden inverso con los mismos tiempos.
14. Montar las laminillas en resina hidrofóbica.

ANEXO

A. Absceso hepático amibiano en hámster: virulencia de *E. histolytica*.

Se inyecta 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* virulentos resuspendidos en 0.2 mL de PBS en la vena porta de un hámster y siete días después el animal se eutanasia y su hígado se compara con el de un hámster normal.

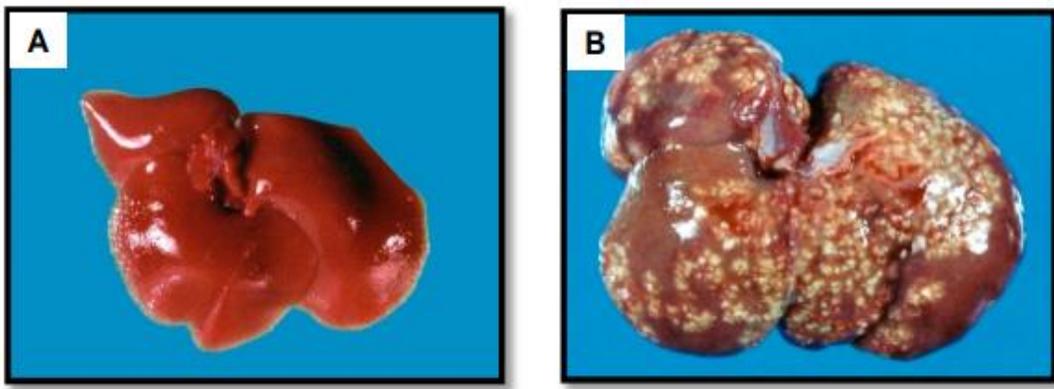


Figura 19. Aspecto macroscópico del hígado de hámster **A.** Control, hígado normal.
B. Hígado de hámster con siete días de infección. Se observan lesiones amebianas distribuidas en todos los lóbulos y hepatomegalia.

B. Actividad del factor hipocomplementémico del veneno de cobra.

El CVF purificado (25 μg) se inyectó en la cavidad peritoneal de una rata Wistar de aproximadamente 300 g de peso y después cada 24 h se obtuvo sangre de la cola y se determinó la actividad amibicida de su suero fresco.

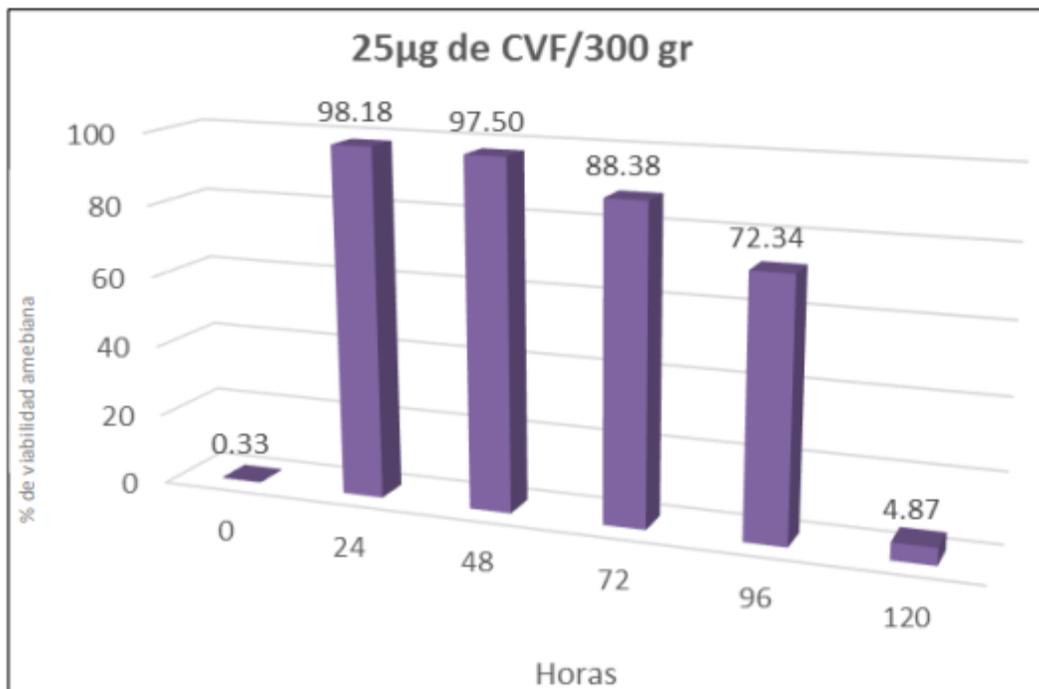


Figura 20. Actividad hipocomplementémica del CVF. Se incubaron 1×10^6 amibas / mL de suero fresco de rata y después de 2 h de incubación a 37°C se determinó su actividad amibicida. La hipocomplementemia es total después de 24 y 48 h de la inyección del CVF y después los niveles de complemento gradualmente se restablecen a los cinco días.