

11261  
7  
20)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIOS SOBRE LA RESISTENCIA DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICA A LA LISIS  
POR COMPLEMENTO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tesis que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biomédicas (rama Bioquímica)

presenta

Biól. Laila Gutiérrez Kobeh

México, D. F., julio de 1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

Resumen

Abreviaturas

Capítulo I. Introducción

- I.1. Características Generales de Entamoeba histolytica
- I.1.1. Morfología del trofozoito
  - I.1.1.1. Citoplasma
  - I.1.1.2. Citoesqueleto
  - I.1.1.3. Organelos
  - I.1.1.4. Núcleo
  - I.1.1.5. Membrana plasmática
  - I.1.1.5.1. Funciones de la membrana plasmática
- I.1.2. Patogenicidad y virulencia
  - I.1.2.1. Proteínas involucradas en mecanismos de patogenicidad
- I.2. Entamoeba histolytica y la respuesta inmune humoral
- I.3. El sistema del complemento
  - I.3.1. La vía clásica
    - I.3.1.1. Características de los fragmentos producidos por la activación de la vía clásica
    - I.3.2. La vía alterna
    - I.3.3. El complejo de ataque a membranas (MAC)
    - I.3.4. Proteínas reguladoras
    - I.3.5. Receptores del complemento
- I.4. Resistencia y recuperación de las células nucleadas al MAC
- I.5. Los parásitos y el sistema del complemento
- I.6. Entamoeba histolytica y el complemento

Capítulo II. Materiales y Métodos

- II.1. Cultivo de amibas
  - II.1.2. Obtención de la cepa resistente a suero humano
- II.2. Decomplementación de suero humano
  - II.2.1. Inmunolectroforesis de sueros decomplementados por varios métodos
- II.3. Determinación de viabilidad de amibas susceptibles o resistentes a lisis por suero humano
- II.4. Purificación del C9 a partir de plasma humano

- II.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS)
- II.4.2. Iodación de C8 y C9
- II.4.3. Ensayo hemolítico
- II.5. Inmunomicroscopía electrónica
- II.6. Cinética de fijación de  $^{125}\text{IC9}$  a Entamoeba histolytica de las cepas (S) y (R)
- II.7. Fraccionamiento subcelular de trofozoitos de Entamoeba histolytica de las cepas (S) y (R)
- II.7.1. Método de Aley
- II.7.2. Método de Rosenberg y Gitler
- II.8. Ensayo de acción de lisados amibianos de las cepas (S) y (R) sobre  $^{125}\text{IC8}$  y  $^{125}\text{IC9}$
- II.9. Obtención de sueros de animales de distintas especies
- II.9.1. Determinación de CH50
- II.9.2. Determinación de anticuerpos
- II.9.3. Ensayos de lisis de E. histolytica con sueros de diferentes especies animales

### Capítulo III. Resultados

- III.1. Destino de los complejos C5b-9 en trofozoitos de E. histolytica analizado por microscopía electrónica
- III.2. Cinética de fijación de  $^{125}\text{IC9}$  a trofozoitos de las cepas (S) y (R)
- III.3. Asociación de  $^{125}\text{IC9}$  con diferentes fracciones subcelulares de E. histolytica (S) y (R) según el método de Aley
- III.4. Asociación de  $^{125}\text{IC9}$  con fracciones subcelulares de E. histolytica (S) y (R) según el método de Rosenberg y Gitler
- III.5. Acción de extractos amibianos de las cepas (S) y (R) sobre  $^{125}\text{IC8}$  y  $^{125}\text{IC9}$
- III.6. Efecto lítico de sueros de distintas especies animales sobre trofozoitos de Entamoeba histolytica
- III.6.1. Determinación de CH50 y correlación con el efecto lítico
- III.6.2. Determinación de anticuerpos

### Capítulo IV. Discusión, conclusiones y perspectivas

### Capítulo V. Bibliografía

## RESUMEN

La amebiasis 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. Uno de estos es la resistencia de las amebas invasivas a las defensas del huésped tales como anticuerpos y complemento.

El sistema del complemento agrupa a más de treinta proteínas plasmáticas y presenta dos vías de activación, la clásica y la alterna, que culminan con el ensamblaje del complejo de ataque a membranas (MAC) que tiene un efecto lítico sobre las células.

Las amebas patogénicas y las no patogénicas activan al complemento por ambas vías; la proteasa de cisteína de 56 kDa de la ameba actúa como una convertasa de C3 rompiendo a este componente en C3a y C3b. Al cultivar amebas en presencia constante de suero humano desarrollan resistencia al complemento, la cual se revierte al quitar el suero del medio de cultivo. Debido a que tanto las amebas patogénicas como las no patogénicas activan al complemento en la misma forma y al mismo grado, pensamos que la resistencia al efecto lítico de este sistema debía estar en el manejo del (MAC).

Preparamos la cepa resistente a suero humano (R) cultivando la cepa HM1:IMSS susceptible (S) en medio adicionado con suero. Obtuvimos una cepa resistente al 40% de suero humano, concentración con la que presentó 20-30% de lisis en presencia de complemento a diferencia del 80-90% de la cepa susceptible.

Purificamos el componente C9 del complemento a partir de plasma humano y lo marcamos con  $^{125}\text{I}$  para emplearlo como un marcador del destino del MAC después de su interacción con las amibas.

La posibilidad de internalización del complejo como forma de resistencia la investigamos por microscopía inmunoelectrónica con anticuerpos de cabra anti C5 humano y anti IgG de cabra marcado con oro coloidal. Encontramos complejos asociados a la membrana plasmática de la amiba en el tiempo 0 min y complejos internalizados en tiempos posteriores de incubación. Fraccionamos amibas de las cepas (S) y (R) después de incubarlas con suero y  $^{125}\text{IC}_9$  y encontramos el mayor número de cpm asociado a membranas no vesiculadas y a residuo en la cepa (S) y a membranas internas en la cepa (R). Al fraccionar amibas por otro método encontramos la mayor asociación de cpm en la membrana plasmática en ambas cepas. Medimos el tiempo de fijación del  $^{125}\text{IC}_9$  a las amibas y encontramos que se lleva a cabo entre los 0 y 15 min de incubación.

La posibilidad de que la resistencia radicara en la degradación de alguno de los componentes del MAC la estudiamos mediante la incubación de los componentes  $^{125}\text{IC}_8$  y  $^{125}\text{IC}_9$  con extractos amibianos de ambas cepas. Utilizando esta metodología no se encontró degradación de estos componentes.

La otra parte de la tesis consistió en estudiar el efecto de sueros de distintas especies animales sobre trofozoítos de E. histolytica. Encontramos diferencias en la capacidad lítica entre los distintos sueros y una correlación entre ésta y la resistencia natural del animal a la amibiasis.

## ABREVIATURAS

CH50	cantidad de suero requerida para lisar el 50% de eritrocitos
cpm	cuentas por minuto
CR1, 2, 3	receptores del complemento
DAF	factor acelerador del decaimiento
DGVB++	amortiguador Veronal-salino adicionado con gelatina y dextrosa
EA	eritrocitos sensibilizados
EBV	virus Epstein-Barr
GalNAC	N-acetil-galactosamina
GVB++	amortiguador Veronal-salino adicionado con gelatina
IgG	inmunoglobulina G
kDa	kilo daltones
LPS	lipopolisacáridos
MAC	complejo de ataque a membranas
MCP	proteína cofactor de membrana
PBS-A	amortiguador de fosfatos de potasio y cloruro de sodio para amibas
PHMB	parahidroximercuribenzoato
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
(R)	<u>Entamoeba histolytica</u> resistente a suero humano
(S)	<u>Entamoeba histolytica</u> susceptible a suero humano
SDS	dodecil sulfato de sodio
VBS-A	amortiguador Veronal-salino para amibas



## CAPITULO I. INTRODUCCION

La amebiasis es la enfermedad provocada por el parásito Entamoeba histolytica. Este padecimiento ocupa la tercera posición en causas de muerte por parásitos en el mundo (Walsh, 1986). Con base en la presencia de anticuerpos anti-amiba se estima que un 90% de los pacientes infectados con E. histolytica son asintomáticos, mientras que el 10% desarrolla disentería, que es la infección limitada a la mucosa intestinal, o amebiasis invasiva, que ocurre cuando el parásito penetra más allá del intestino produciendo abscesos metastásicos, principalmente en el hígado.

### I.1. Características generales de Entamoeba histolytica

La información existente sobre la estructura y función de la ameba no es muy abundante y se ha derivado principalmente de estudios hechos con aislados patogénicos de E. histolytica crecidos en medio axénico (Diamond et al, 1978). Este parásito presenta una forma móvil, el trofozoito, que se caracteriza por ser elongado con lobopodios protusibles y un uroide formado por pliegues irregulares y procesos filiformes. También tiene una forma inmóvil e infectiva que es el quiste.

#### I.1.1. Morfología del trofozoito

##### I.1.1.1. Citoplasma

El citoplasma está claramente diferenciado en ectoplasma y endoplasma. El primero se encuentra en los canales fagocíticos y el segundo es un complejo vacuolar y tubular relacionado con

procesos pinocíticos. Las vacuolas se producen por endocitosis por lo que la estructura de su membrana es asimétrica y su contenido variable, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Las diferentes poblaciones de vacuolas se distinguen por su forma, unas tienen el borde liso y otras el borde crenado. La amiba presenta un sistema tubular que es un retículo membranoso compuesto de túbulos finos (Ludvík y Shipstone, 1970).

#### I.1.1.2. Citoesqueleto

El citoesqueleto de E. histolytica se encuentra formado principalmente por microfilamentos de actina localizados en sitios de adhesión al sustrato y regiones especializadas en la formación de canales fagocíticos o macropinocíticos. Se han descrito filamentos gruesos, pero no se ha demostrado que sean de miosina. Además, existen unos conglomerados de partículas cilíndricas en forma de roseta que rodean un área del citoplasma, se encuentran en asociación con vacuolas y están limitados por una membrana (Feria-Velasco y Treviño, 1972).

#### I.1.1.3. Organelos

E. histolytica no presenta aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, centriolos o microtúbulos. Los ribosomas se encuentran arreglados en formas diferentes en el trofozoito y el quiste. En el quiste se encuentran ordenados en un patrón hexagonal que forma el cuerpo cromatoide y en el trofozoito se encuentran en arreglos helicoidales. Se ha visto que estas hélices pueden estar en asociación con vacuolas

digestivas y cisternas membranosas.

#### I.1.1.4. Núcleo

El trofozoito presenta un solo núcleo y en el quiste el núcleo se divide para dar origen a cuatro núcleos. A diferencia de otras células eucariontes, el núcleo de E. histolytica no se encuentra adherido y puede moverse libremente dentro del citoplasma. La membrana nuclear tiene forma de esfera con poros y la cromatina se presenta en agrupamientos en posición diversa en el nucleoplasma. El ADN se encuentra predominantemente en el centro del núcleo mientras que el ARN ocupa la periferia. Además, no se ha detectado la presencia de un nucléolo, pero existe un endosoma formado por una concentración de ADN en el centro del núcleo. La división nuclear es uno de los aspectos menos comprendidos y se sabe que mientras se lleva a cabo, no existe disolución de la membrana nuclear.

#### I.1.1.5. Membrana plasmática

La membrana de la amiba presenta variaciones cualitativas y cuantitativas en su composición con relación a células de mamíferos. Está formada por un 60-70% de lípidos predominantemente fosfolípidos de etanolamina, en la fracción saponificable, y colesterol, en la no saponificable (Sawyer et al., 1967). Presenta aminoetilfosfonato, el cual probablemente tiene una función en la protección contra hidrolasas (Kittredge y Roberts, 1969). En la membrana plasmática y vesículas intracelulares se ha encontrado un lipofosfopeptidoglucano altamente antigénico (Rivera et al., 1985). También contiene

proteínas en un rango de 12 a 200 kDa de peso molecular (Aley et al., 1980), muchas de las cuales son glicoproteínas (Parkhouse et al., 1978). La fosfatasa ácida se encuentra unida a la membrana lisosomal, mientras que en otras células eucariontes se encuentra como una proteína soluble dentro de lisosomas y vesículas secundarias. La Beta-D-glucosaminidasa lisosomal se encuentra unida tanto a la membrana como en la forma soluble. Gracias a estudios de las proteínas de la membrana llevados a cabo con marcaje con lactoperoxidasa, interacción con la lectina Concanavalina A y marcaje con 5-iodonaftaleno-1-azida, se ha confirmado que la amiba posee un glicocálix extenso hecho de glicoproteínas extrínsecas, probablemente ancladas por su interacción con algunas proteínas transmembranales (Aley et al., 1980; Rosenberg y Gitler, 1985).

#### I.1.1.5.1. Funciones de la membrana plasmática

Los trofozoitos crecidos in vitro se caracterizan por presentar un alto nivel de pinocitosis y pocos sistemas de transporte de solutos. Estas funciones son llevadas a cabo por la membrana que es internalizada y externalizada continuamente; el recambio se lleva a cabo cada 20 min aproximadamente (Gitler et al., 1984). La membrana plasmática se invagina para formar las vesículas pinocíticas que se fusionan con los lisosomas primarios. En un momento dado una fracción de la membrana plasmática del trofozoito se encuentra asociada con vesículas internas. La adición de anticuerpos contra determinantes de superficie de los trofozoitos provoca una inmovilización transitoria en la amiba (Biaqi et al., 1966). Al poner amibas en

presencia de lectinas o anticuerpos se produce una redistribución de la membrana y se forman parches seguidos de casquetes principalmente en la región del uroide. Estos complejos de anticuerpos pueden ser secretados al medio o internalizados. A diferencia de otras células eucariontes, la amiba no pierde por completo los determinantes antigénicos. El encasquetamiento se puede presentar muchas veces sin un cambio significativo en la respuesta. Esta persistencia se puede explicar si los determinantes antigénicos de superficie son lípidos (Aust-Kettis y Sundqvist, 1978; Calderón et al, 1980).

### I.1.2. Patogenicidad y virulencia

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 huésped. Existe evidencia que sugiere que los trofozoítos comensales difieren en los patrones de movilidad electroforética de sus isoenzimas (zimodemos) de aquellos aislados de casos sintomáticos de amibiasis (Reeves y Bischoff, 1968; Sargeaunt y Williams, 1978, 1982; Sargeaunt et al, 1980, 1982). No se han aislado amibas con los dos zimodemos de un solo individuo y no hay evidencia de reacción cruzada entre antígenos de trofozoítos comensales y virulentos. Sin embargo, en un modelo animal se logró producir una respuesta virulenta con amibas de zimodemo no patogénico (Chadee et al, 1985). Hasta la fecha, las amibas comensales sólo pueden ser cultivadas en medios suplementados con bacterias y la axenización sólo ha sido lograda

a partir de aislados con zimodemo patogénico.

Mirelman (Mirelman et al., 1985) ha postulado que las condiciones de cultivo son un factor muy importante en la expresión de un tipo de zimodemo o de otro. Su grupo ha reportado el cambio de comportamiento de un cultivo de amibas, que inicialmente tenían un zimodemo patogénico, a uno no patogénico, por un cambio en las bacterias asociadas al cultivo (Mirelman et al., 1985). Estos cambios en las condiciones del medio pueden modificar el metabolismo asociado a la expresión de las isoenzimas y este grupo de trabajo piensa que no son causa de contaminación por trofozoitos patogénicos en el cultivo, ya que los experimentos se realizaron con una clona no patogénica. El estado patogénico puede ser revertido por la adición de otras bacterias al medio. Según estos autores, esto demuestra que el comportamiento patogénico o no patogénico determinado por los patrones electroforéticos de las isoenzimas no es una propiedad estable e inherente de los trofozoitos aislados, lo que hablaría de una población que se transforma por las condiciones microambientales, más que de dos poblaciones diferentes (Mirelman et al., 1984, 1985, 1986).

La virulencia de los trofozoitos varía considerablemente, lo que complica aún más el problema del por qué unas amibas son comensales y otras virulentas; es por esto que los modelos in vitro requieren hacerse con amibas de virulencia equivalente a la de trofozoitos aislados de pacientes.

La virulencia se ha estudiado principalmente con cultivos de zimodemo patogénico en medio axénico de Diamond (Diamond et al., 1978) y se ha determinado de acuerdo a las características

que presentan estas amibas:

1) Las amibas virulentas son capaces de inducir abscesos en el higado de hamsters y la virulencia se incrementa con el número de veces que las amibas son pasadas por el higado. De acuerdo a esto, la virulencia relativa de las cepas axenizadas estables de E. histolytica es HM-1:IMSS>200:NIH>HK-9 (Mattern y Keister, 1977).

2) Las amibas virulentas inducen muerte por contacto en las células del hospedero (Gitler et al, 1984) y provocan cambios morfológicos en las células blanco. El contacto con estas células, que está mediado por lectinas, produce un influjo de calcio hacia la amiba y se cree que éste provoca la liberación del ameboporo y proteasas (Gitler y Mirelman, 1986).

3) Las amibas virulentas producen proteasas de cisteína que pueden jugar un papel en la invasión de tejidos por la degradación de colágena y laminina (Keene et al, 1986; Reed et al, 1989).

4) Las amibas virulentas y las no virulentas tienen secuencias diferentes de ADN (Garfinkel et al, 1989; Tannich et al, 1989).

5) Las amibas virulentas son resistentes a las defensas del hospedero como anticuerpos humorales y complemento (Reed et al, 1983).

La virulencia en las amibas puede incrementarse con factores como exposición a colesterol (Biagi et al, 1962), esteroides (Stuiver y Gould, 1978), bacterias (Bracha y Mirelman, 1984), disminución de los niveles de complemento del hospedero por el factor del veneno de cobra (Capin et al, 1980a) e inmunosupresión (Ghadirian y Meerovitch, 1981).

La virulencia de un aislado determinado depende de las propiedades intrínsecas de los trofozoitos, las condiciones de crecimiento y las pruebas empleadas para evaluar la patogenicidad in vivo o in vitro.

#### I.1.2.1. Proteínas involucradas en mecanismos de patogenicidad

Los trofozoitos producen una variedad de enzimas proteolíticas que incluyen proteasas de cisteína (Keene et al, 1986; Luaces y Barrett, 1988; Lushbaugh et al, 1985; Pérez-Montfort et al 1987; Scholtze y Werries, 1986), una colagenasa (Gadasi y Kessler, 1983; Muñoz et al, 1982) y una proteasa parecida a la catepsina-D (Mc Laughlin y Faubert, 1977) involucradas en la digestión de proteínas, procesos reguladores y efectos citopáticos. La principal proteasa extracelular, secretada por los trofozoitos, es la proteasa neutra de cisteína capaz de activar al plasminógeno y degradar matriz extracelular, fibronectina, laminina y colágena tipo I (Keene et al, 1986). Por otro lado, se ha demostrado en un modelo de amibiasis aguda en rata, que las proteasas de cisteína están involucradas en la producción de necrosis tisular (Becker et al, 1988).

El ameboporo es una proteína derivada de la amiba que se incorpora espontáneamente a membranas para formar canales iónicos. Se puede encontrar dentro de los trofozoitos o en el medio de cultivo. Dentro del trofozoito se encuentra en forma agregada. El peso molecular del monómero es 14 kDa y existen dos formas con puntos isoeléctricos diferentes. El ameboporo secretado se comporta como un agregado estable con apertura simultánea de 40 canales (Gitler y Mirelman, 1986).



Las lectinas de la superficie celular producidas por la amiba son una hemaglutinina inhibible por quitotriosa y tetraosa, que es la responsable de la eritrofagocitosis y de la adherencia al epitelio intestinal (Kobiler y Mirelman, 1980), y una lectina específica para GalNac, que parece mediar la adherencia bacteriana y la adhesión que lleva a citólisis de células en cultivo (Ravdin *et al*, 1985).

En la relación de la amiba con su hospedero, las lectinas participan en diferentes eventos como:

- 1) Reconocimiento de glicoproteínas del epitelio intestinal
- 2) Adhesión
- 3) Obtención de nutrientes en el tracto intestinal a través de fagocitosis mediada por estas moléculas.
- 4) Eritrofagocitosis
- 5) Muerte mediada por contacto

## I.2. Entamoeba histolytica y la respuesta inmune humoral

El nivel de los anticuerpos humorales dirigidos contra antígenos de superficie de la amiba no parece afectar el curso de la enfermedad en los humanos (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Pittman, 1980). No existe evidencia de que la susceptibilidad a la amibiasis disminuya con la edad o con niveles previos de infección (Trissl, 1982).

Se han reportado anticuerpos IgA contra E. histolytica en leche materna en áreas con amibiasis endémica (Acosta *et al*, 1985). Se ha mostrado que la inmunización de ratas con amibas resulta en la producción de anticuerpos IgA (Acosta *et al*, 1982). No se sabe si estos anticuerpos inhiben la colonización o

protegen contra la invasión en el intestino. Los anticuerpos humorales dirigidos contra *E. histolytica* no la afectan y las respuestas contra la amiba mediadas por células parecen disminuir durante la fase intestinal de la enfermedad. Algunos estudios apuntan hacia el complemento como una defensa importante contra los trofozoítos (Mogyoros *et al.*, 1986; Reed *et al.*, 1983). Sin embargo, en la amibiasis invasiva los trofozoítos deben estar en contacto con plasma sanguíneo y con altas concentraciones de todos los componentes del complemento una vez que penetran todas las capas del intestino y se trasladan por medio de la sangre hacia el hígado y otros sitios. Los trofozoítos virulentos deben ser resistentes a la acción del complemento para sobrevivir a estas condiciones y poder colonizar diversos órganos del hospedero.

### 1.3. El sistema del complemento

La cascada del complemento es un proceso fisiológico que involucra un grupo complejo de proteínas presentes en plasma o membranas celulares que interactúan en una forma precisa y controlada. Las interacciones moleculares de las 30 o más proteínas del sistema han sido muy bien estudiadas en el humano y el cayo. Este sistema desempeña varias funciones en los organismos:

- 1) Es un contribuyente mayor en la inflamación aguda y crónica.
- 2) Algunos fragmentos, producto de la ruptura proteolítica de algunas proteínas del sistema, participan en la regulación positiva de la respuesta inmune del huésped por la interacción con células inmunes competentes.

3) Aumenta la adherencia de microorganismos a células fagocíticas.

4) Provoca cambios en las membranas que pueden resultar en la muerte de la célula.

El sistema del complemento está organizado en dos vías de activación:

1) La vía clásica que consiste de seis proteínas que son C1q, C1r, C1s, C2, C4, y C3. 2) La vía alterna que involucra los factores B, D, H (BIH), I (inactivador de C4b/C3b), la properdina y el C3.

Ambas culminan en la vía membranólítica formada por el complejo de ataque a membranas (MAC) que consiste de cinco proteínas C5, C6, C7, C8 y C9.

Las características generales de la activación del complemento incluyen tres procesos:

1) Activación por proteólisis limitada de ciertos componentes como C1r, C1s, B, C4 y C3.

2) Transferencia de componentes de la fase fluida a la superficie de partículas biológicas, para funcionar como un sistema enzimático de fase sólida en superficies celulares. Algunos componentes como C4 y C3 contienen un tioéster interno que puede ser activado y formar una unión covalente con la partícula activadora (virus, bacteria, parásito y células). Este paso es el primer evento que dirige la activación del complemento en las superficies celulares.

3) Autoensamblaje de componentes que genera enzimas altamente específicas y complejos de ataque a membranas.

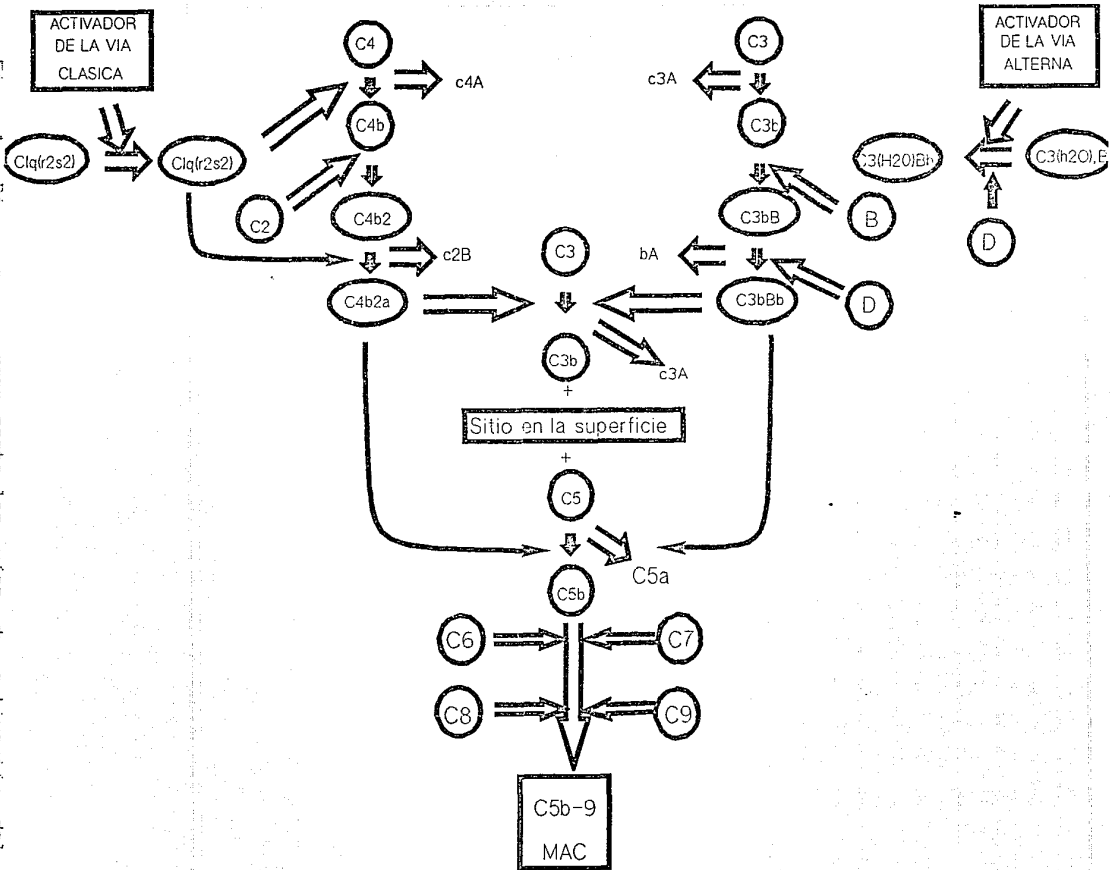
La reacción enzimática central de este sistema es el

rompimiento de C3 en sus dos componentes primarios C3a y C3b. Esta catálisis se lleva a cabo por las convertasas de C3, una de la vía clásica y otra de la vía alterna, que son dos enzimas homólogas generadas como consecuencia de la activación del complemento. Estas enzimas rompen múltiples moléculas de C3 y debido a la corta vida media del enlace tioéster expuesto, las moléculas de C3b se unen como conglomerados alrededor de las convertasas de C3 (Ross y Medof, 1985; Sim *et al.*, 1981). Estos conglomerados de C3b y un producto posterior de la ruptura de C3b, C3bi, son fuertes ligandos de los receptores del complemento 1 y 3 (CR1 y CR3) que se expresan en granulocitos y macrófagos (Ross y Medof, 1985).

### I.3.1. La vía clásica

Esta vía es activada por la agregación de inmunoglobulinas de las clases IgM o IgG unidas a sus respectivos antígenos. En algunos casos muy particulares puede ser activada por medio de partículas que interactúan con el complejo C1 sin la participación de anticuerpos. Estos activadores biológicos son virales, bacterianos, superficies de parásitos y algunos productos solubles (Leid, 1988). La función de reconocimiento de los anticuerpos de la clase IgG o IgM se lleva a cabo por C1q que se une a los dominios C<sub>γ</sub>2 o C<sub>μ</sub>3 del Fc de las inmunoglobulinas en complejos inmunes a través de sus seis cabezas globulares. Esta interacción específica resulta en la unión y activación de C1r, que a su vez activa C1s. C1s es una proteasa de serina dentro del complejo C1 que rompe al C4 en C4a y C4b (Arlaud *et al.*, 1987; Schumaker *et al.*, 1987); esta ruptura puede llevarse a cabo por

Fig. 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 complejos y superficies celulares.



C1s solo o en la forma trimolecular C1qrs. La activación de C1s puede ocurrir también por ruptura proteolítica por plasmina o tripsina. La porción C4b se une covalentemente a la membrana activadora para actuar como un aceptor del componente C2 en presencia de  $Mg^{++}$ . C1s rompe al complejo C2 para formar los polipéptidos C2a y C2b (Arlaud *et al.*, 1987; Schumaker *et al.*, 1987). C2a contiene el sitio activo de la convertasa de C3 de la vía clásica. Este complejo enzimático reconoce al sustrato C3, formado por dos polipéptidos. La cadena  $\alpha$  de C3 se hidroliza en la posición 99 produciendo un fragmento grande C3b y un péptido pequeño C3a. C3b se une covalentemente al sitio de la membrana activadora para servir como el aceptor de C5 en la vecindad de la enzima C4b y C2a (convertasa de C3) (Müller-Eberhard, 1988). La unión de C3b a esta enzima altera su especificidad de tal forma que rompe a C5 en un fragmento mayor C5b y uno menor C5a. C5b se une a la enzima C4b2a (convertasa de C5) y se produce el ensamblaje no covalente y no enzimático de los cinco componentes de la secuencia de ataque a membranas (C5b6789).

#### 1.3.1.1. Características de los fragmentos producidos por la activación de la vía clásica

Los péptidos C3a, C4a y C5a se encuentran muy relacionados en sus estructuras primarias y se conocen como anafilatoxinas. Estas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la inflamación aguda y tienen efectos como incremento en la permeabilidad vascular, contracción de músculo liso y liberación de mediadores de células cebadas y basófilos. C5a, con o sin su arginina C terminal, es probablemente el responsable de gran

parte de la actividad quimiotáctica de neutrófilos en plasma. Puede inducir a células con respuesta quimiotáctica a metabolizar el ácido araquidónico produciendo moléculas con efectos reguladores. El C3 promueve la adherencia y/o fagocitosis de partículas en células con receptores a C1 (C1R) o los fragmentos C3b/C4b. El C3b unido puede ser digerido por el inactivador de C3b/C4b o I y producir C3c, que es un fragmento de fase fluida, y el fragmento unido C3d-g. Este último sufre una ruptura posterior y se libera un péptido a la fase fluida. C3d y C3d-g tienen receptores específicos en las células que son CR2 y CR3. Los productos de la ruptura de C3 (C3a y b) pueden producirse también por la acción de las enzimas tripsina y plasmina, en este caso no se produce una activación secuencial sino la generación de anafilatoxinas a través de la activación de sistemas dependientes del factor de Hageman. Estas anafilatoxinas tienen las mismas propiedades que las producidas por la activación del complemento.

### 1.3.2. La vía alterna

Esta vía de activación del complemento representa un mecanismo de defensa natural contra agentes infecciosos. Se involucran seis proteínas plasmáticas en el reconocimiento y activación, sin el requerimiento de anticuerpos específicos. Existe un equilibrio entre inhibidores y activadores de esta vía que permite la discriminación entre partículas extrañas y del huésped, evitando el daño a sí mismo. Su activación representa un escape de los mecanismos de control del huésped más que activación de zimógenos, como es el caso de la vía clásica.

Los activadores de esta vía incluyen:

- 1) Activadores independientes de anticuerpos como bacterias o productos bacterianos, hongos, virus, células infectadas por virus, parásitos y algunas células tumorales.
- 2) Activación por el factor del veneno de cobra (CVF) y enzimas del tipo de la tripsina.
- 3) Activación por complejos inmunes.

Muchos de estos activadores ofrecen un ambiente protector para C3b, que evita la inactivación proteolítica por el factor I. La iniciación de este proceso se da cuando el C3, modificado en el tioéster por agua C3(H<sub>2</sub>O), sufre un cambio y expresa una conformación y función del tipo C3b (Lachmann y Hughes-Jones, 1984; Pangburn y Müller-Eberhard, 1984). El C3(H<sub>2</sub>O) se une al factor B en presencia de Mg<sup>++</sup> formando un complejo que se hace susceptible al rompimiento por el factor D. El fragmento Ba se libera a la fase fluida y el complejo C3(H<sub>2</sub>O)Bb puede actuar como una convertasa de C3 generando el C3b metaestable. El depósito de C3b en las partículas activadoras permite la unión del C3b al factor B para ser activado por el factor D para formar C3bBb de superficie, que es una convertasa de C3. Esta enzima puede producir muchas moléculas de C3b. Cada nueva molécula de C3b es formadora potencial de convertasas de C3, por lo que se producen muchas enzimas en la superficie celular y en la fase fluida. El C3b en la superficie celular es relativamente resistente a la inactivación por los factores H e I. El factor H restringe la formación de la convertasa de C3 compitiendo con la unión del factor B, acelera la disociación de C3bBb y, cuando se encuentra unido a C3b, facilita su inactivación por el factor I. El factor I rompe la cadena  $\alpha$  de C3b. La properdina se activa después de su



interacción con la convertasa de C3. Su función es la de estabilizar la convertasa de C3/C5, de la vía alterna, deprimiendo el decaimiento de estos complejos enzimáticos y permitiendo el consumo del complemento. La falta de acceso de las proteínas control permite la amplificación del rompimiento de C3 y la generación de sustratos sobre los que se pueden formar complejos de ataque a membranas.

### I.3.3. Complejo de ataque a membranas (MAC)

La iniciación del complejo de ataque a membranas requiere del rompimiento de C5 en el péptido C5a (25 kDa), anafilatoxina y agente quimiotáctico, y el C5b. El C5b forma un complejo con C6 que se une a la membrana celular; a este complejo se unen C7 y C8 que permiten la asociación de C9 y formación de las lesiones. Estas proteínas de fase fluida poseen la habilidad única de auto asociarse después de la activación del complemento para formar un heteropolímero asociado a membranas; sufren un cambio de un estado hidrofílico a un estado anfifílico, durante la formación de la lesión, lo que les permite insertarse en la bicapa lipídica. El mecanismo preciso de la citotoxicidad mediada por el complemento no se conoce del todo y actualmente existen dos modelos. El primero propone que los dominios polares de las proteínas del complemento insertadas causan distorsiones locales en la bicapa lipídica que resultan en "leaky patches" (Esser et al., 1979; Esser, 1991). El modelo del poro propone que las superficies polares de los componentes individuales del complemento se unen para formar un canal hidrofílico a través de la membrana (Bhakdi et al., 1980; Bhakdi y Tranum-Jensen, 1986,

1991) y que las lesiones se forman por el ensamblaje de hasta 16 moléculas de C9 con los otros componentes terminales arreglados en la periferia de la lesión, con la posible excepción de la cadena  $\alpha$  de C8 (Podack, 1978). Sin embargo, diversas líneas de evidencia sugieren que una lesión rígida no es necesaria para la expresión de los efectos de MAC ya que un C9, que ha sido modificado proteolíticamente para prevenir la formación del anillo, es líticamente activo (Dankert y Esser, 1985).

Un MAC con una sola molécula de C9 por complejo causa lisis eficiente en eritrocitos (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1986). Los complejos C5b-9 aislados de membranas de estas células tratadas con C9 a 0 °C no contienen C9 polimerizado y no muestran la estructura de anillo característica de la lesión del complemento. Sin embargo, estos complejos generan canales transmembranales estables y causan hemólisis a 37 °C. Por experimentos de protección osmótica se sabe que los poros miden 1-3 nm de diámetro efectivo y se ha calculado que se une una molécula de C9 por complejo C5b-8. Esto apoya indirectamente la idea de que los componentes terminales del complemento, aparte de C9, contribuyen a los dominios intramembranales de los poros C5b-9 (Kim *et al.*, 1989).

Estudios funcionales en diversas células nucleadas indican que sólo se requieren cuatro moléculas por C5b-8 para formar una lesión a través de la cual puedan pasar moléculas grandes (Ramm *et al.*, 1984) y estudios inmunquímicos muestran que, en células lisadas por complemento, sólo se unen tres o cuatro moléculas de C9 por complejo C5b-8 (Sims, 1983; Stewart *et al.*, 1984). La unión de C8 a células blanco es independiente de temperatura,

mientras que un número mayor de moléculas de C9 se une a C5b-8 a 37 °C que a 0 °C (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1986). Es probable que las diferencias en la fluidez de la membrana a bajas temperaturas influyan en el proceso de inserción de C9 y las diferencias marcadas en la composición lipídica entre células de distintas especies sean responsables en parte de las divergencias observadas con respecto a la formación de C5b-9 a bajas temperaturas. La incorporación de la primera molécula de C9 al complejo terminal parece involucrar dos estadios: primero, una reacción que lleva a la unión firme de C9 al complejo y que puede ocurrir a 0 °C, y segundo, un proceso que resulta en la apertura del canal que puede requerir temperatura elevada. Existe evidencia de que el C9 se une a C5b-8 a 0 °C y que sufre un cambio conformacional a temperatura elevada (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1986). En forma concomitante a la apertura del poro, que puede derivar de la inserción de C9 a la bicapa, los complejos C5b-C8, -C9, permiten la unión posterior y oligomerización de C9. Es probable que este proceso se derive de la unión del C9 nativo a la primera molécula de C9 del complejo y que esta unión sea estable. La heterogeneidad funcional de las lesiones C5b-9 puede derivar de la existencia de complejos que llevan números diferentes de moléculas de C9 (Tschopp *et al.*, 1985).

Se ha encontrado que C9 purificado bajo condiciones específicas *in vitro* polimeriza espontáneamente en estructuras cilíndricas que son muy parecidas ultraestructuralmente a las lesiones anilladas C5b-9. Este poli-C9 se ha caracterizado como un complejo proteico de  $M_r \approx 10^6$  Da, resistente a la solubilización por dodecil sulfato de sodio (SDS) y que contiene 12 a 16

protómeros. Se ha observado que los complejos de poli-C9 presentes en C5b-9 sólo constituyen una pequeña fracción del total de C5b-9 en una membrana. Se piensa que la mayoría de los complejos no pueden contener estructuras anilladas de poli-C9 completamente circularizadas, porque la concentración normal del C9, no alcanzaría para una saturación completa de los complejos terminales y porque el proceso de polimerización es susceptible a la interrupción: una vez detenido, los complejos C5b-9 incompletos no pueden finalizar el proceso de polimerización (Podack y Tschopp, 1982; Podack *et al.*, 1982; Tschopp *et al.*, 1982).

#### I.3.4. Proteínas reguladoras

El sistema del complemento tiene tres tipos de proteínas reguladoras:

- 1) Inhibidores que previenen la activación espontánea en la fase fluida como los factores H e I de la vía alterna que actúan rompiendo a C3b; o la proteína que une C4b (C4bp) de la vía clásica que actúa como cofactor en el rompimiento de C3b (Kinoshita, 1991).
- 2) Reguladores que aumentan o disminuyen la acción normal del complemento contra sustancias blancas como CR1, que además de ser un receptor, inactiva las convertasas de C3/C5. Otros ejemplos son el inhibidor de C1 (C1-INH) que se une a C1r e impide el rompimiento de C4 y C2 por C1s durante la activación de la vía clásica y el factor acelerador del decaimiento (DAF) que bloquea el ensamblaje de la convertasa de C3 de la vía alterna (Kinoshita, 1991).

3) Inhibidores que protegen a las células del hospedero de la acción destructiva del complemento como por ejemplo la proteína cofactor de membrana (MCP) que se une a C3b, C3bi y C4b en la superficie de las células y facilita la degradación dependiente de I de estas moléculas (Hourcade et al., 1989).

### 1.3.5. Receptores del complemento

Los receptores que se unen para romper productos de componentes del complemento están expresados en una gran variedad de células. Sus funciones son de reconocimiento de ligandos, transducción de señales e inducción de respuestas celulares como fagocitosis. El CR1 es el receptor a C3b, el sitio de unión de C3b está en la porción de la molécula que posteriormente se rompe a C3c; CR1 puede unir también moléculas de C4b. CR2 es el receptor para C3dg y además tiene actividad de cofactor en el rompimiento de C3bi mediado por I. CR3 y p150 unen C3bi y pertenecen a la familia de las integrinas. Las células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos expresan los receptores CR1, CR3 y C5a (Ahearn y Fearon, 1989; Hugli, 1984). Los glóbulos rojos de primates expresan CR1 y unen complejos inmunes que llevan fragmentos de C3 o C4. Esta es una ruta muy importante de transporte y eliminación de complejos inmunes de la sangre hacia células fagocíticas en el hígado y bazo. Los linfocitos B expresan al CR2.

### 1.4. Resistencia y recuperación de las células nucleadas al complejo de ataque a membranas

Las células nucleadas son más difíciles de matar con

anticuerpos y complemento que blancos metabólicamente inertes como eritrocitos viejos o liposomas. El ataque del complemento a células tumorales se distingue del de eritrocitos en que las primeras se hinchan y liberan aminoácidos intracelulares, potasio y RNA, pero mantienen la membrana más o menos intacta aún después de una exposición prolongada al complemento. Esta resistencia de las células nucleadas a la lisis por complemento no está relacionada a factores como densidad y movilidad del antígeno (Boyle *et al.*, 1975) o número de moléculas de los componentes del complemento. Experimentos hechos con células de linfoma murino transformadas por virus en crecimiento continuo y otros tipos celulares han mostrado que la susceptibilidad a la lisis está relacionada con la fase del ciclo celular (Cikes y Friberg, 1971); hay variaciones en la fase donde se presenta la mayor sensibilidad entre un tipo celular y otro. Parece ser que la activación del sistema del complemento y formación de MAC en la superficie de una célula nucleada no conduce inevitablemente a la lisis celular. Esto fue demostrado por la liberación de  $^{86}\text{Rb}$  inducida por MAC en mastocitos de ratón en ausencia de lisis (Burakoff *et al.*, 1975). Esta puede prevenirse en células nucleadas que llevan complejos de ataque por la incubación con AMP cíclico (Kaliner y Austen, 1974; Lo y Boyle, 1979). Los últimos acontecimientos que llevan a la muerte celular están influidos por el estado metabólico de la célula.

## I.5. Los parásitos y el sistema del complemento

Las interacciones de los parásitos con el complemento son muy heterogéneas y pueden ser en beneficio o en detrimento de los mismos. Estudios en diversos parásitos, bacterias y virus han mostrado activación directa del complemento por ambas vías. En el caso de parásitos intracelulares sólo las formas sanguíneas son sensibles al complemento (Leid, 1988). Las células normales de mamífero están protegidas de la destrucción mediada por complemento por proteínas de membrana reguladoras como el receptor a complemento tipo 1 (CR1), la proteína cofactor de membrana (MCF) y el factor acelerador del decaimiento (DAF) que previenen la amplificación del C3b depositado en las superficies celulares. Los microorganismos carecen de estas proteínas, por lo que no pueden restringir el depósito y amplificación del complemento en sus superficies.

La ausencia de moléculas reguladoras del complemento, ocasionalmente acoplada a la presencia de C3b en una superficie protegida e inaccesible a los factores H e I, explica el por qué muchas bacterias, virus, hongos y parásitos activan directamente la vía alterna del complemento (Atkinson y Farries, 1987; Joiner, 1988).

Algunas bacterias y virus evaden la regulación llevada a cabo por el inhibidor de C1 y activan directamente la vía clásica en ausencia de anticuerpos (Cooper, 1985; Peitsch *et al.*, 1987; Tenner *et al.*, 1984). Por ejemplo, la activación de la vía clásica por Schistosoma mansoni requiere la unión de fragmentos Fc de IgG no inmune a C1q (Ouassii *et al.*, 1981) y la activación de la vía

alterna ocurre por el desprendimiento de estructuras asociadas a la membrana como el glicocáliz (Marikovsky et al, 1986; Samuelson et al, 1980).

El mecanismo de activación del complemento por proteasas o productos secretados por otros organismos patogénicos no ha sido bien definido. Recientemente se detectó una actividad de proteasa ácida en la principal proteína de superficie (gp 63) de Leishmania mexicana, que es capaz de degradar C3. Los productos de degradación de C3 son necesarios para que la Leishmania pueda unirse a los receptores de los macrófagos específicos (Chaudhuri y Chang, 1988).

El complemento afecta a bacterias y protozoarios a través de dos mecanismos. Uno de éstos es el proceso de opsonización, en el que se cubren las partículas celulares con fragmentos de C3 o de otros componentes que interactúan con receptores de membrana específicos en células fagocíticas y promueven endocitosis. Se han descrito glicoproteínas de superficie o lipofosfoglicanos como aceptores de C3 en algunos parásitos como Trypanosoma cruzi, Leishmania major y L. mexicana, pero no se han identificado receptores a C3 intactos en protozoarios (Fuhrman y Joiner, 1989). Las interacciones ligando-receptor de C1q, C4b y C3b o sus fragmentos promueven la fagocitosis de microorganismos por leucocitos. Estas interacciones promueven la eliminación de agentes infecciosos, activación de células inmunes e inducción de procesos de inflamación. El segundo mecanismo es la citólisis mediada por complemento. En algunas infecciones el complemento contribuye directamente, o mediante complejos inmunes, a la destrucción celular y tisular del huésped o como resultado de la



activación por componentes del parásito (Leid, 1988).

La activación y amplificación descontroladas que llevan a la acumulación de un gran número de moléculas de C3b y convertasas de C3 y C5 en la superficie de los microorganismos resulta incompatible con la sobrevivencia del parásito. Sin embargo, los microorganismos han desarrollado muchas estrategias para evadir la destrucción mediada por complemento:

1) Formación de cápsulas.- este mecanismo se presenta en bacterias; las cápsulas son antifagocíticas ya que previenen el acceso de macrófagos al C3b depositado en la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Joiner et al, 1984a; Joiner, 1988). Además, las cápsulas son malos activadores del complemento y esto ha sido atribuido, en ciertos casos, a la presencia del ácido siálico (Joiner et al, 1984a; Joiner, 1988). Se ha postulado que la adquisición del ácido siálico en la esquistosomula es la causa de su inhabilidad para activar al complemento (Joiner, 1988). Las cepas de Salmonella exhiben habilidades muy diferentes para activar la vía alterna del complemento en ausencia de anticuerpos, esto es debido a la estructura química de las cadenas laterales antigénicas O de los lipopolisacáridos (LPS) (Jiménez-Lucho et al, 1987).

2) Interferencia con el ensamblaje de las convertasas.- un segundo mecanismo de resistencia al complemento involucra al desarrollo de estructuras de superficie que perturban la formación de las convertasas de C3 como está demostrado en ciertas cepas de Streptococcus y Campylobacter (Joiner et al, 1984a; Blaser et al, 1988) y por I. cruzi (Kipnis et al, 1981). Una variación sobre este tema es el desensamblaje enzimático de

los complejos de convertasas de C3 como se presenta en L. major (Fuentes et al., 1988).

3) Otros mecanismos para resistir la destrucción citolítica mediada por complemento.- aunque las bacterias Gram-positivas activan al complemento hasta el ensamblaje de C5b-9 en su superficie, son resistentes a la destrucción principalmente porque la gruesa capa de peptidoglicanos previene ó restringe el acceso de C5b-9 a la membrana citoplasmática (Joiner et al., 1984a; Joiner, 1988).

Las bacterias Gram-negativas resistentes a suero son más virulentas que las sensibles. En presencia de anticuerpos bactericidas ambas activan al complemento eficientemente hasta la fijación de C9, lo que hace pensar que no es la falta de ensamblaje de C5b-9 el mecanismo de la resistencia al suero. Estudios hechos con Salmonella y Escherichia coli resistentes a suero indican que el C5b-9 no se inserta en los dominios hidrofóbicos de la membrana externa y como consecuencia es desprendido (Joiner et al., 1984a; Joiner, 1988). En estas cepas resistentes a suero la activación del complemento ocurre en los LPS con las cadenas O más largas; el C5b-9 se forma a una distancia considerable de la membrana externa por lo que se propone que se da una inserción débil y hay un impedimento estérico hacia el acceso a la membrana. En contraste, la unión de C3b y el ensamblaje de C5b-9 en cepas sensibles a suero ocurre en moléculas de LPS con cadenas O cortas (Joiner et al., 1982, 1984 a,b; Joiner, 1988).

En Neisseria resistente a suero se ha demostrado un mecanismo diferente. Estos organismos activan al complemento

hasta C9, sin embargo, el C5b-9 parece estar unido a dominios hidrofóbicos de la membrana externa en forma diferente a lo que se ha encontrado en organismos sensibles a suero (Joiner et al., 1983, 1984b). Algo similar se ha encontrado en amastigotes de T. cruzi sensibles a suero (Iida et al., 1989).

4) Inhibición o interferencia con las proteínas de control I y H de la vía alterna, con la proteína que une C4 (C4bp) o con el inhibidor de C1 de la vía clásica (Leid, 1988).

5) Presencia de moléculas con funciones similares a algunas proteínas del complemento de mamíferos.- ciertos organismos patógenos poseen moléculas con propiedades funcionales idénticas a las usadas por células de mamífero para prevenir su destrucción por el complemento como la habilidad de desensamblar convertasas de C3 o actuar como cofactores en el rompimiento de C3b por el factor I. Se han identificado muchas de estas proteínas, algunas con homología con las de células de mamífero. Un ejemplo de esta homología se ha visto entre CR1 y proteínas de algunos virus como herpes simplex (HSV) tipos I y II (Friedman et al., 1984; McNearney et al., 1987). Se encontró que las proteínas que unen C3b son las glicoproteínas C (gC-1 y gC-2). La relación entre estas proteínas y CR1 fue demostrada por la habilidad de un anticuerpo monoclonal dirigido contra CR1 para bloquear la unión de C3b a gC-1 (Kubota et al., 1987). Además, gC-1 acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía alterna (Fries et al., 1984). El virus humano Epstein-Barr (EBV) presenta también actividad reguladora de complemento (Mold et al., 1988), acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía alterna y puede servir como cofactor para el rompimiento de C3b mediado por el

factor I. Además, presenta actividades similares a CR1, pero difiere en que EBV no se une a C3b y no acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la vía clásica.

Se han encontrado moléculas parecidas a DAF en las formas infecciosas resistentes a complemento de T. cruzi. La glicoproteína gp160 purificada de los tripomastigotes une C3b y bloquea la formación de la convertasa de C3 de la vía alterna (Norris, K. A., Bradt, B. M., Cooper, N. R., So, M. Observaciones no publicadas, tomado de Cooper, 1991). Por estudios de hibridización se ha visto que esta proteína está también relacionada genéticamente con DAF y no se encuentra en los epimastigotes que son sensibles a complemento. Los tripomastigotes presentan actividades reguladoras de complemento adicionales que se han atribuido a moléculas de 87-93 kDa (Joiner et al., 1988) y 68 kDa (Fischer et al., 1988). Probablemente, estas moléculas son las responsables de la resistencia al complemento de las formas sanguíneas de este parásito.

Schistosoma mansoni tiene en la membrana externa una molécula con actividad de DAF (Pearce et al., 1990). Esta molécula proviene del huésped y se piensa que es adsorbida e insertada a las membranas del parásito lo que permite a estos organismos evadir la destrucción por la vía alterna.

Existen también ejemplos de la presencia en microorganismos de secuencias relacionadas al complemento que probablemente facilitan la infección por procesos diferentes a la regulación del complemento. Por ejemplo, Candida albicans no sólo une fragmentos de C3 sino que expresa una proteína con homología estructural, funcional y antigénica con miembros de la familia de

las integrinas B<sub>2</sub> (Edwards et al., 1986). El significado funcional de la homología con CR3 no está claro, sin embargo, las cepas patogénicas de Candida unen a C3bi en forma más fuerte que las menos patogénicas. Se postula un papel en la adherencia del microorganismo a las células del huésped, ya que los miembros de la superfamilia de las integrinas median reacciones de unión y adherencia que están relacionadas con la infección.

Las TRAF (proteínas anónimas relacionadas a la trombospondina) y las proteínas del circumsporozoito de Plasmodium falciparum contienen repeticiones de trombospondina que son muy similares a las de la properdina, C6, C7, C8 y C9. Se piensa que estas repeticiones intervienen en las interacciones proteína-proteína y que pueden unir C3b como lo hace la properdina y permitir que los organismos con partículas de complemento en su superficie puedan entrar a las células vía CR1 (Goundis y Reid, 1989).

En I. cruzi se ha encontrado una proteína que cruza con anticuerpos anti C9 y parece tener actividad citotóxica de formación de poros. Se postula que este homólogo de C9 interviene en el paso del parásito de las vacuolas al citosol (Andrews et al., 1990).

b) Uso de receptores del complemento para iniciar la infección.- muchos microorganismos no sólo evitan la inactivación y destrucción por el complemento, sino que usan los receptores del sistema para comenzar la invasión. Se ha visto que esto se debe a epítopes similares a moléculas del complemento que median la unión del parásito con los receptores del huésped. La unión más común a receptores de complemento es a través de fragmentos de C3

unidos covalentemente a microorganismos como consecuencia de sus propiedades activadoras del complemento. Por ejemplo, el EBV infecta a su célula blanco, la célula B, a través de CR2. Se ha sugerido que los sitios de unión para el virus y el ligando natural del complemento, C3dg, son estructuralmente idénticos o están localizados muy cerca uno del otro, ya que varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra CR2 tienen efectos idénticos en el virus y C3dg en la superficie de las células (Cooper et al, 1988). Además, se ha observado que la unión de EBV a CR2 está mediada por un epítipo de nueve amino ácidos parecido a C3dg localizado en el extremo amino terminal de la principal glicoproteína externa del virus (Nemerow et al, 1989).

Otro ejemplo de esta expropiación de receptores de complemento por microorganismos se presenta en la fase infecciosa de Leishmania, el promastigote metacíclico. Este organismo es fagocitado por los macrófagos de su huésped, la unión a éstos se da en ausencia de complemento y está mediada por CR3, el receptor para iC3b, por p150,95 y LFA-1 (Russell y Talamas-Rohana, 1989). Además, la unión está mediada por la principal glicoproteína de superficie del parásito, la gp63. Histoplasma capsulatum infecta a los macrófagos en forma muy similar a como lo hace Leishmania (Bullock y Wright, 1987).

Los organismos envueltos con fragmentos de C3, unidos covalentemente, adquieren la habilidad de unirse con gran especificidad y ávidez a los receptores de C3. Muchos organismos inician la infección mediante este proceso in vitro. Una adaptación exitosa de este proceso requiere cierta regulación del procesamiento enzimático de C3, por ejemplo, un organismo que usa

CR1 para penetrar a una célula debe impedir el rompimiento del C3b depositado a C3bi y C3dg. Entre los organismos que penetran a las células vía CR1 se encuentran Babesia rodhaini, merozoitos de Plasmodium, Legionella pneumophila, Mycobacterium leprae y Mycobacterium tuberculosis (Schlesinger et al, 1990). Todas las bacterias que se replican en los fagocitos mononucleares activan al complemento e inician la infección de las células vía CR1 y CR3 (Joiner et al, 1982, 1983). Algunos virus como los flavivirus y el HIV infectan macrófagos y monocitos vía CR3 después de la activación del complemento (Soelder et al, 1981).

Estas interacciones altamente específicas pueden considerarse como procesos especializados de reconocimiento molecular. La presencia de moléculas relacionadas genética y funcionalmente con actividades de regulación del complemento pueden representar la conservación del reconocimiento molecular ancestral importante para el crecimiento, desarrollo y otros procesos básicos.

#### 1.6. Entamoeba histolytica y el complemento

El complemento puede participar en el daño a los trofozoítos 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 (Calderón, 1989).

En los primeros estudios sobre la interacción de E. histolytica y el complemento se observó que trofozoítos de las cepas HK-9 y NIH-200 eran lisados por suero humano normal a una concentración mayor de 10% v/v. Se demostró que la activación del complemento era por la vía alterna ya que la inhibición de la vía

clásica, o el uso de suero de cobayo deficiente en C4, causaron lisis a los trofozoítos. La actividad citolítica fue eliminada por inactivación de la vía alterna por tratamiento del suero con EDTA o por calentamiento a 50 °C por 20 min (Ortiz-Ortiz et al, 1974).

El papel de la activación del complemento por la vía alterna en el rechazo de la infección amibiana in vivo fue estudiado en hamsters tratados con el factor del veneno de cobra (CVF) que se retaron posteriormente con E. histolytica. Hubo una disminución en el tiempo de sobrevivencia, pérdida de peso y mayor incidencia y severidad en las lesiones hepáticas, inducidas por las amibas inoculadas directamente, en la condición libre de complemento (Capin et al, 1980; Ghadirian y Meerovitch, 1982).

En otros experimentos se demostró que la amiba activa también al complemento por la vía clásica. La activación de esta vía puede llevarse a cabo por dos mecanismos, uno a través de la activación directa de C1 por un componente amibiano y el otro puede involucrar adsorción de inmunoglobulinas no específicas a la superficie del parásito y formación subsecuente de parches o encasquetamiento de manera similar a lo que ocurre con anticuerpos específicos (Aust-Kettis y Sundqvist, 1978; Calderón et al, 1980).

Las contribuciones individuales de las vías clásica y alterna para la activación del complemento por la amiba fueron determinadas en suero agotado inmunoquímicamente de componentes requeridos para la acción de la vía clásica (C1q) y alterna (factor D). Al restaurar las vías por la reconstitución independiente de sus componentes, se observó que la adición de



C1q produjo 39% de lisis y unión del 0.26% de  $^{125}\text{I}C3$  a las amibas; la adición del factor D dió 11% de lisis y 0.10% de unión, mientras que la reconstitución completa mostró un efecto aproximadamente aditivo. 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 (Calderón y Schreiber, 1985; Reed et al., 1986).

La incubación de amibas con suero humano normal produce el consumo de C3, C4 y factor B. El tratamiento del suero con EDTA bloquea el consumo de los tres componentes, mientras que el tratamiento con Mg-EGTA sólo bloquea el consumo de C4 (Meri et al., 1985).

Para elucidar algunos de los procesos patobiológicos de E. histolytica se ha estudiado la activación por los trofozoítos de las proteínas del complemento involucradas en el inicio de las vías. La deposición específica de C3b en la membrana de la amiba está correlacionada con la lisis y ha sido usada como un indicador de la interacción directa entre el parásito y el complemento. Trofozoítos incubados con suero humano normal en presencia de  $^{125}\text{I}C3$  unieron moléculas de C3b a sus membranas en ausencia de anticuerpos específicos. El número de moléculas de C3b unido por trofozoito fue de más de  $35 \times 10^6$ , 15 min después del contacto con el suero. La cinética de unión de C3b fue muy rápida con un aplanamiento a los 10 min. La lisis causada con suero tratado con EGTA fue más lenta y correspondió al 60% del valor del suero no tratado. El suero inactivado por calor no produjo lisis y la unión de C3b fue sólo del 20% (Calderón y

Schreiber, 1985).

La acción de las proteasas de la ameba liberadas por el rompimiento de la membrana sobre el C3b unido a los trofozoitos fue demostrada por la comparación entre la unión a células viables y células fijadas con glutaraldehído. La unión específica fue tres veces mayor en los trofozoitos fijados. Una de estas proteasas, la proteasa neutra de cisteína de 56 kDa, activa el sistema del complemento por el rompimiento de C3 en la fase fluida (Reed *et al*, 1989). La incubación de C3 con 50 U de proteasa altamente pura produjo un 100% de rompimiento de la cadena  $\alpha$  de C3 en 60 min a 37 °C. La ruptura de la cadena  $\alpha$  fue entre los residuos de amino ácidos en las posiciones 78 y 79 (Ser-Asn), produciéndose un fragmento de 105 kDa. La cadena  $\beta$  permaneció intacta. Esta degradación del C3 nativo resultó similar a la producida por las convertasas de C3 que rompen entre los residuos Arg-Ser en la posición 77 y 78 de la cadena  $\alpha$ . La proteasa puede ser inhibida completamente por 5% de suero humano o de bovino (Keene *et al*, 1986), mientras que el rompimiento en fase fluida de C3 puede ser detectado en amebas intactas aún en presencia de suero humano normal al 50%. El rompimiento en fase fluida fue inhibido pre-incubando a las amebas con E-64, un inhibidor irreversible de proteasas de cisteína, lo que elimina la participación de otras proteasas. Estos hallazgos pueden reflejar una mayor actividad de la proteasa en el ambiente inmediatamente adyacente a los trofozoitos. C3 es extremadamente sensible al rompimiento por la proteasa, por lo que aún niveles muy bajos de ésta, liberados por cepas no patogénicas fueron suficientes para romper el C3 en la fase fluida. No se

encontraron complejos de mayor peso molecular que sugieran una unión covalente del C3b o C3bi a moléculasceptoras del parásito como es el caso de *L. major* y *Toxoplasma gondii* (Fuhrman y Joiner, 1989; Fuentes et al., 1988).

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. Pacientes con amibiasis invasiva presentan niveles bajos de C3 y normales de C1q (Capin et al., 1980). Esto sugiere que la vía alterna es activada o que el daño hepático puede disminuir la producción de C3. Pacientes con abscesos hepáticos amibianos presentan niveles de complemento variables. En algunos casos se ha observado que la actividad CH50 en suero aumenta en un 31% en pacientes con abscesos amibianos tempranos y con abscesos amibianos tardíos disminuye en un 8%. En otros casos de pacientes con abscesos amibianos se observó una reducción del 28% en CH50 y del 31% en los niveles de C3; sin embargo, los niveles de C1q permanecieron inalterados (Capin et al., 1978).

Los trofozoitos que infectan tejidos parecen ser refractarios al daño por complemento, particularmente en aquellos pacientes que tienen niveles normales o elevados de complemento. Para demostrar las diferencias en sensibilidad al complemento se han empleado aislados clínicos crecidos en condiciones de cultivo que imitan las del intestino humano por la adición de bacterias y almidón. Los aislados sensibles y resistentes al complemento, así como las cepas axénicas, activan al complemento en la fase fluida

lo que ha sido demostrado por el consumo y producción de fragmentos del complemento. La resistencia o susceptibilidad al complemento está correlacionada con los zimodemos de los trofozoitos aislados. Amibas mantenidas en medio de Robinson con zimodemos I y III no patogénicos fueron susceptibles a la lisis por la activación de la vía alterna del complemento. Por el contrario, 9 de 11 cepas patogénicas (zimodemos II, IX y XIV), crecidas bajo condiciones idénticas fueron resistentes a la muerte por complemento. Las otras dos cepas patogénicas fueron igualmente susceptibles que las comensales (Reed et al, 1983).

En un intento por comprender el establecimiento de la amibiasis en presencia de la actividad lítica del complemento se cultivaron trofozoitos en presencia de suero humano normal y se les probó su sensibilidad a la lisis. Amibas tratadas repetidamente en suero humano normal mostraron una susceptibilidad reducida a la lisis por complemento (Calderón y Tovar, 1986). Se observó que E. histolytica tratada hasta 45 veces con suero humano normal (comenzando con 5% v/v de suero e incrementos semanales de 5% hasta 40%) perdió parcialmente su susceptibilidad al daño dependiente de complemento. La lisis en las amibas adaptadas al suero disminuyó en un 61% en presencia de suero al 25% y en un 37% con suero al 40% en comparación al control. Esta tolerancia al daño por suero fue obtenida con la cepa HM1 y la clona 5C1 derivada de esta cepa después de cinco clonaciones consecutivas. La clona 5C1 tratada repetidamente con suero humano normal desarrolló una reducción significativa en la susceptibilidad a la lisis por complemento en comparación a la tolerancia observada en la cepa HM1 original.

Cultivos axénicos de E. histolytica derivados de una cepa aislada de un paciente con amebiasis representan poblaciones heterogéneas con respecto a algunas propiedades celulares. También se han aislado clonas a partir de la cepa HM1 que difieren en características como adherencia, fagocitosis y virulencia (Orozco et al. 1983). De acuerdo a esto, la exposición a complemento puede llevar al crecimiento preferencial de una población resistente a suero. La resistencia al complemento se obtuvo también en una clona de E. histolytica HM1, lo que sugiere que es una capacidad adquirida y no el resultado de un proceso de selección de una subclona genéticamente resistente.

Esta resistencia fue revertida cuando el tratamiento con suero humano normal fue suspendido (Calderón y Tovar, 1986). Después de dos semanas de cultivo sin la exposición a complemento, la susceptibilidad a la lisis por suero fue recuperada progresivamente en amibas adaptadas a complemento hasta alcanzar el nivel de los controles en un periodo de un mes. Esta resistencia parcial depende de la presencia consistente de suero, lo que sugiere que el estado resistente en los trofozoitos es inducido por el complemento. De acuerdo a estos resultados, los trofozoitos patogénicos en los tejidos del huésped pueden ser resistentes a la lisis por complemento porque están expuestos continuamente a los componentes del complemento (Calderón, 1988).

Una disminución en los niveles de C3, sin lisis de trofozoitos, fue observada cuando amibas pasadas por hígado y resistentes a complemento fueron incubadas con suero humano o de hamster no inmune (Mogyoros, 1986). La inducción de la resistencia al complemento por anticuerpos o por presencia de

complemento durante el cultivo puede ser relevante en relación a la ineficiencia de los anticuerpos humorales contra los trofozoitos invasivos.

Cuando amibas susceptibles o resistentes a la lisis por complemento se incuban con  $^{125}$ IC3, se rompe la cadena  $\alpha$  de C3 y sólo se observa el C3 intacto en la superficie celular independientemente de que las amibas sean lisadas o no. Es por esto que las diferencias en la sensibilidad a la lisis mediada por el complemento no se deben a distintos productos de rompimiento de C3 en la superficie del parásito (Reed et al., 1989). La unión del C3 a la amiba presenta las siguientes características:

- 1) No se lleva a cabo a través del tioéster, ya que las amibas unen cantidades equivalentes de C3 nativo y C3 con el tioéster inactivado por metilamina.
- 2) No se realiza a través de la porción amino terminal de la molécula, ya que C3a des Arg frío no inhibe la unión de  $^{125}$ IC3.
- 3) La unión no es saturable, lo que niega la presencia de un receptor específico.
- 4) El tioéster del C3 unido es inactivo, ya que no hay rompimiento posterior por las convertasas de C3 ni por proteínas control de la fase fluida (Reed et al., 1989).

Se ha sugerido que las cepas sensibles al complemento se lisan por una reacción que involucra el ensamblaje del complejo de ataque a membranas (C3b, C5b-9) iniciado por el rompimiento de C3 en la fase fluida (Reed et al., 1989). Además, la generación directa de C3a y la producción subsecuente de C5a por C3bBb, puede promover invasión vascular por amibas o generar

quimioatrayentes para células inflamatorias. Esta posibilidad está apoyada por la observación de que un gran número de leucocitos polimorfonucleares en los estadios tempranos de la invasión amibiana pueden contribuir al daño tisular (Reed et al, 1989).

Otros experimentos demostraron que E. histolytica con zimodemo patogénico crecida en forma axénica fue susceptible a la lisis por la activación de la vía alterna del complemento (Ortiz-Ortiz et al, 1978). Amibas de la cepa HM-1:IMSS crecidas en medio axénico fueron muy susceptibles al complemento y presentaron virulencia baja en un modelo de absceso hepático en el hamster. Los trofozoitos fueron muy resistentes al efecto lítico del complemento después de pasarlos por el hígado. De acuerdo a esto se observa que la susceptibilidad o resistencia a la lisis están determinadas por las condiciones de crecimiento y no del zimodemo. Se sugirió que las amibas crecidas en medio xénico conservan su virulencia original, debido en alguna forma a la presencia de bacterias. Se piensa que las bacterias proveen a la amiba sistemas enzimáticos requeridos para su metabolismo como por ejemplo protección contra los efectos tóxicos de radicales libres. Las cepas axénicas que han sido adaptadas al crecimiento sin bacterias fueron aisladas inicialmente de pacientes con amibiasis invasiva, pero han perdido su virulencia en grados variables y se han hecho sensibles a la lisis mediada por complemento (Diamond et al, 1974; Reed et al, 1987). Existe un reporte de que un cultivo axénico de trofozoitos recuperados de abscesos hepáticos en hamsters mantuvo la virulencia por 300 días posteriores al paso por el hígado (Lushbaugh et al, 1978).

La exposición previa de los trofozoitos a suero inactivado por calor con anticuerpos inductores de encasquetamiento de determinantes de superficie hace a los trofozoitos menos susceptibles a la lisis por complemento mediada por anticuerpos (Calderón y Tovar-Gallegos, 1980; Aust-Kettis y Utter, 1984).

Además de las actividades de adaptación que el parásito requiere para resistir el daño mediado por complemento durante la invasión tisular, los trofozoitos pueden usar al complemento para su beneficio. La clona 5C1 de E. histolytica HM1 que fue tratada repetidas veces con complemento mostró un incremento en las actividades fagocíticas y citotóxicas (Arias-Negrete y Calderón, observaciones no publicadas, tomado de Calderón, 1988). El índice eritrofagocítico en amibas tratadas repetidamente con suero humano normal al 40% fue dos veces mayor que en los trofozoitos no tratados, mientras que en condiciones de suero inactivado la fagocitosis sólo se incrementó 1.36 veces. También, la actividad citotóxica de las amibas hacia células de bazo marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  como blanco fue 1.55 veces mayor en parásitos tratados con complemento que en amibas control y, aquellas tratadas con suero inactivado por calor, mostraron un ligero incremento de 1.17 veces. Estos resultados indican que la interacción del complemento con las amibas puede producir o seleccionar algunas propiedades funcionales y bioquímicas que activan al parásito a expresar una mayor virulencia. En relación a la activación moderada producida por suero inactivado por calor es posible que otros factores séricos no definidos puedan aumentar las funciones fagocíticas de la amiba (Calderón, 1988). El mecanismo por el cual las amibas patógenas evaden la lisis



mediada por complemento aún no ha sido bien delineado. Puede involucrar la formación de complejos de ataque a membrana no funcionales en forma similar a lo que ha sido observado en Neisseria gonorrhoeae (Harriman et al., 1982; Joiner et al., 1983) o una reparación rápida de la membrana como ha sido demostrado en muchas células nucleadas (Kim et al., 1987; Martin et al., 1987; Morgan et al., 1987). Alternativamente, cepas patogenicas pueden sintetizar proteínas de membrana similares a los inhibidores de lisis reactiva, descritos recientemente, (Holguin et al., 1989) o un factor de restricción homólogo (Zalman et al., 1986). Estas moléculas previenen el ensamblaje del complejo de ataque a membranas a nivel de C7 y C8 o la unión y polimerización de C9, previniendo por lo tanto la formación del canal lítico.

## 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 y posee una proteasa capaz de romper al C3. Diversas cepas de amibas pueden desarrollar resistencia al complemento y se sabe que las diferencias en la sensibilidad a la lisis no se deben a distintos productos de rompimiento del C3 en la superficie del trofozoito. Se ha propuesto que las cepas sensibles se lisan por una reacción que involucra la formación del complejo de ataque a membranas del complemento (Reed et al, 1989). Hasta la fecha se desconocen las formas como la amiba maneja al MAC para resistir su ataque.

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) Purificar al componente C9 del complemento para emplearlo como marcador del destino del MAC después de la interacción de amibas con suero humano.
- 2) Preparar la cepa de E. histolytica resistente a suero humano (R) a partir de la sensible (S) para estudiar sus diferencias en el manejo del MAC.
- 3) Localizar al MAC en el trofozoito mediante microscopía inmunoelectrónica y técnicas de fraccionamiento subcelular de amibas.
- 4) Investigar el curso temporal de la unión del MAC a las amibas.
- 5) Conocer si los extractos amibianos tienen la capacidad de degradar a los componentes C8 y C9 del complemento.

## II.1. Cultivo de amibas

Entamoeba histolytica de la cepa HM1: IMSS fue cultivada axénicamente en medio TYI-S33 (Diamond et al, 1978). En todos los experimentos se emplearon trofozoítos cosechados al final de la fase logarítmica de crecimiento y lavados dos veces con amortiguador de fosfatos-salino para amibas (PBS-A): una parte de amortiguador de fosfatos 0.15M, pH 7.2 y nueve partes de NaCl 0.19 M.

## II.1.1. Obtención de la cepa resistente al suero humano

Entamoeba histolytica cepa HM1: IMSS resistente a suero humano (R) fue preparada de acuerdo a la técnica descrita por Calderón y Tovar (Calderón y Tovar, 1986). Un millón de trofozoítos de E. histolytica HM1: IMSS sensible a suero humano (S) se incubaron en medio TYI-S33 modificado por la adición de  $MgCl_2$  0.5 mM y  $CaCl_2$  0.15 mM y adicionado con suero humano fresco. El suero se obtuvo de dos donadores a partir de sangre que se dejó coagular por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se desprendió el coágulo del tubo y se dejó a 4 °C por 1 h. Se centrifugó a 164 x g durante 10 min. El suero se dividió en alícuotas y se guardó a -70 °C. Las amibas se incubaron con el suero fresco por 2 h a 37 °C, terminada la incubación, se les quitó el medio con suero por centrifugación a 164 x g y se sustituyó por medio normal. Después de 24 h se contó el número de células, se ajustó a la cantidad inicial y se reinició el tratamiento con suero humano. La concentración

inicial de suero fue de 10% y se aumentó hasta 40% en intervalos de 5%.

## II.2. Decomplementación del suero humano

Se sabe que el calentamiento del suero a 56 °C por 30 min inactiva al sistema del complemento. En nuestro caso este tratamiento no fue suficiente, por lo que se hicieron diferentes ensayos de decomplementación de suero:

1) Tratamiento con calor.— Se incubó suero humano fresco a 56 °C por 6 h.

2) Tratamiento con Zymosan.— El polisacárido Zymosan proporciona grupos hidroxilos para la activación del tioéster interno del C3 lo que provoca el rompimiento de este componente. Se preparó una solución de Zymosan a una concentración de 10mg/ml en amortiguador veronal-salina para amibas (VBS-A) frío, que contenía dietilbarbiturato 5mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM y NaCl 193 mM, pH 7.2. Se agregaron 100 µl de esta solución a 1 ml de suero humano fresco y se incubó a 37 °C por 1 h. Se centrifugó a 164 x g para separar el suero del Zymosan. Se sabe que la eliminación del C3 en suero humano tratado con Zymosan es incompleta por lo que el tratamiento se hizo una, dos y cinco veces. También, se hizo un tratamiento aumentando cinco veces la concentración del Zymosan.

La decomplementación del suero se evaluó por el rompimiento del componente C3 revelado por inmunolectroforesis.

### II.2.1 Inmunolectroforesis de sueros decomplementados por varios métodos

Se realizó de acuerdo al método de Grabar y Williams (Grabar y Williams, 1953). La agarosa se preparó al 1% en amortiguador Tris-barbiturato pH 8.6 (LKB 2207-101). La solución se calentó a 90 °C en un baño con agitación constante. Una vez fundida, se enfrió a 50 °C y se vertieron 12 ml sobre una placa de vidrio de 84 x 94 mm. Ya solidificada se hicieron 5 pozos de 2.5 mm del lado de la placa más cercano al cátodo y se cortó un canal de 8.5 cm debajo de cada pozo con un bisturí. El gel de los canales se quitó después de la electroforesis. Se colocaron 5 µl de muestra por pozo y la electroforesis se corrió a 10 V/cm a 10 °C por 1 h. Posteriormente, se quitó el gel de los pozos y éstos se llenaron con 100 µl de suero de conejo anti C3 humano. La placa se colocó en una cámara húmeda a temperatura ambiente y el tiempo de difusión fue de 15 h. En la figura 2 se muestra la inmunolectroforesis de suero humano de complementado por varias formas. Se observa que el mayor rompimiento de C3, demostrado por una mayor separación de la banda de precipitación del pozo, se encuentra en la muestra que corresponde al suero de complementado con un tratamiento con Zymosan por cinco veces (fig. 2h).

### II.3. Determinación de viabilidad de amibas susceptibles o resistentes a lisis por suero humano

Una vez preparada la cepa (R), se hicieron ensayos para demostrar su viabilidad en suero humano. Se mezclaron alícuotas de 0.2 ml con  $3 \times 10^5$  trofozoítos con 0.2 ml de suero humano fresco activo o inactivado por un tratamiento con Zymosan. Las concentraciones de suero empleadas fueron 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50%, y se prepararon en VBS-A. Las mezclas se incubaron a

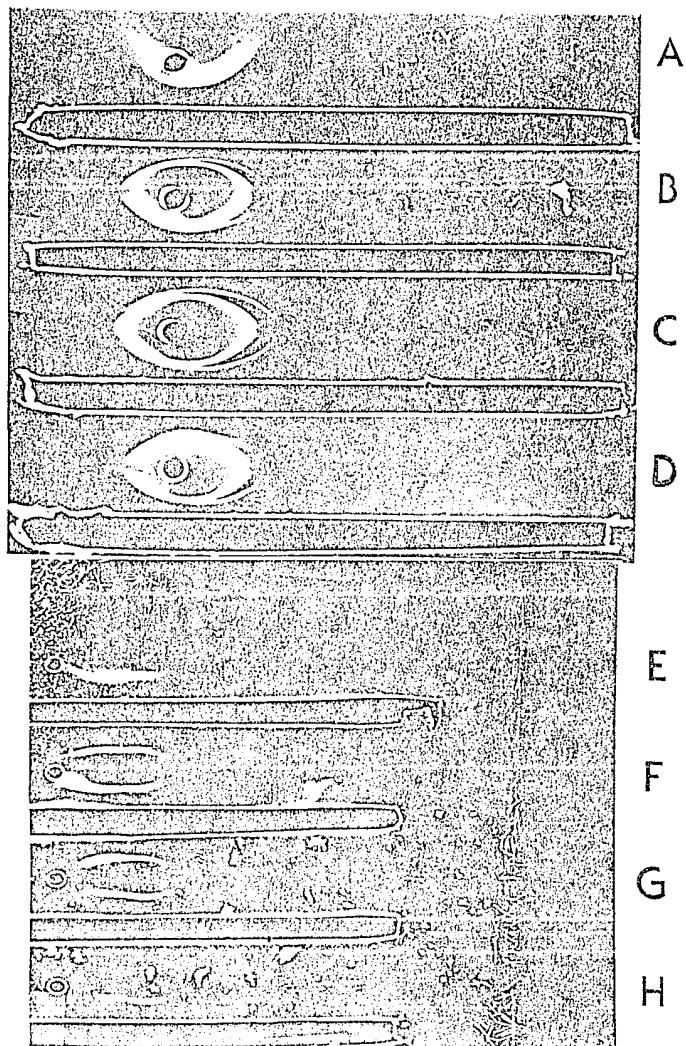


Fig. 2. Inmunoelectroforesis de suero humano de complementado por diferentes tratamientos. De arriba a abajo: a) Suero completo b) Suero de complementado a 56 °C 30 min c) Suero de complementado con 1 tratamiento con Zymosan d) Suero de complementado a 56 °C 30 min y con un tratamiento con Zymosan e) Suero de complementado a 56 °C 6 h f) Suero de complementado con Zymosan 5 veces concentrado g) Suero de complementado con 2 tratamientos con Zymosan h) suero de complementado con 5 tratamientos con Zymosan.

37 °C por 30 min, resuspendiendo las células cada 8 min y se centrifugaron por 10 seg a 164 x g para eliminar el suero. Los trofozoitos residuales se resuspendieron en 0.25 ml de medio de cultivo para contar las células viables por contraste de fases en una cámara mejorada de Neubauer. El porcentaje de lisis se definió como la disminución en las amibas viables en suero humano normal comparadas con el control hecho con suero inactivado por cinco tratamientos con Zymosan de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{viables en control} - \text{viables en suero normal})}{\text{viables en control}} \times 100$$

La viabilidad se definió como el porcentaje de amibas vivas presentes después de la incubación con las diferentes concentraciones de suero en relación al 100% representado por las amibas viables en el control sin suero. En la figura 3 se muestran las curvas de lisis de la cepas (S) y (R) con concentraciones de suero de 0 a 50%. Se observa que con la cepa susceptible se alcanza una lisis del 90% con la máxima concentración de suero empleada, mientras que con la cepa resistente el porcentaje de lisis obtenido con esa concentración de suero fue del 20%.

Pensamos que había varias cosas que la amiba podía hacer para resistir la acción del complejo de ataque a membranas:

- a) Internalizar el complejo
- b) Desprender rápidamente los segmentos de membrana a los que se pegaran los complejos.
- c) Degradar sus componentes
- d) Producir otras moléculas que bloquearan su acción

Para seguir el destino del complejo de ataque a membranas,

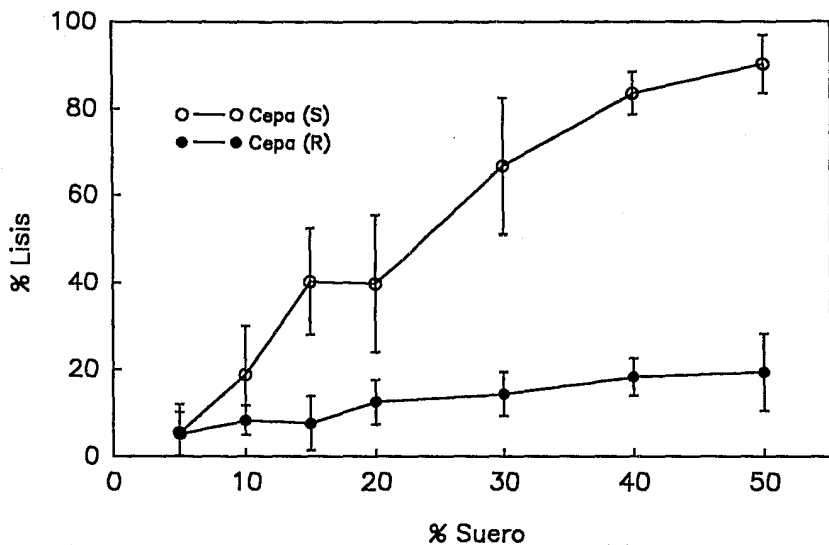


Fig. 3. Efecto lítico de suero humano fresco en concentraciones de 0 a 50% sobre trofozoitos de *E. histolytica* de las cepas (S) y (R). La incubación se hizo a 37 °C por 30 min y cada punto representa el promedio de doce experimentos.



lo primero que hicimos fue purificar el componente final del complejo de ataque, el C9, y marcarlo con  $^{125}\text{I}$ .

#### II.4. Purificación del C9 a partir de plasma humano

Esto se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Biesecker y Müller-Eberhard (Biesecker y Müller-Eberhard, 1980) de la manera siguiente:

Todos los pasos de esta purificación se llevaron a cabo a 4 °C, los amortiguadores se adicionaron con fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0.5 mM y azida de sodio 0.02% y la conductividad de éstos se midió a temperatura ambiente con un conductímetro (Radiometer, Copenhague) con la celda CDC 104. Se desfibrinaron 120 ml de plasma humano por agitación constante con perlas de vidrio durante una noche a 4 °C. Posteriormente se precipitó el C9 mediante la adición lenta y con agitación de 600 ml de polietilenglicol 4000 al 21% (p/v) preparado en amortiguador de Veronal-salina hecho con Veronal 25 mM, NaCl 90 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4. Después de 15 min adicionales de agitación, la muestra se centrifugó a 16000 g por 30 min y se desechó el precipitado. Se agregaron 2.19 g de polietilenglicol 4000 sólido y después de agitación adicional, se centrifugó a 2500 g por 15 min. El precipitado se disolvió en amortiguador de solubilización, NaCl 90 mM, Veronal 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7.0, 11 mmho, a un volumen final de 41.5 ml. Se eliminó el plasminógeno de la muestra pasándola por una columna de lisina-Sepharosa que se preparó de acuerdo al método de Deutsch y Mertz (Deutsch y Mertz, 1970). Brevemente, la Sepharosa 4B (Pharmacia) se activó con bromuro de cianógeno (CNBr) mezclando 25 ml de resina

decantada con un volumen igual de agua más CNBr a una concentración de 100 mg/ml de Sepharosa asentada. El pH se ajustó y se mantuvo en 11 titulando con NaOH 4 N. La reacción se dejó proseguir por 8 min después de los cuales se lavó la Sepharosa con 20 volúmenes de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M frío en un embudo Buchner bajo succión por 2 min. La Sepharosa lavada se suspendió en  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M frío pH 9 en un volumen igual al de la Sepharosa original. A los 150 ml de Sepharosa se añadieron 30 g de lisina titulada a pH 8.9 en 50 ml de agua. Se dejó incubar por 24 h a 5 °C en agitación y terminada la incubación se lavó con varios volúmenes de glicina 0.1 M pH 9 a 4 °C para eliminar la lisina no unida. Se realizó un espectro de absorción de la lisina para conocer la cantidad del amino ácido acoplado a la Sepharosa. La resina se empacó en una jeringa de 20 ml y se equilibró con el amortiguador de solubilización.

Se colectaron fracciones de 15 ml y se juntaron las que presentaron mayor concentración de proteína determinada por absorbancia a 280 nm. El plasminógeno unido a la resina lisina-Sepharosa se desprendió por la elución con ácido  $\epsilon$ -amino-*n*-caproico 0.2 M pH 7.4. Las fracciones sin plasminógeno se pasaron por una columna de DEAE Sepharosa (Pharmacia LKB) empacada en una jeringa de 20 ml, equilibrada y lavada con NaCl 100 mM, Veronal 25 mM, pH 7.0, 11 mmho. La columna se eluyó con un gradiente lineal de concentración de NaCl formado por 100 ml del amortiguador inicial y 100 ml de amortiguador ajustado a 30 mmho con NaCl. Se colectaron fracciones de 10 ml y se juntaron las que presentaron mayor concentración de proteína por absorbancia a 280 nm. Estas muestras se adsorbieron en hidroxilapatita (Bio-Gel

HTP, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) empacada en una jeringa de 20 ml equilibrada con NaCl 100 mM, Veronal 25 mM, pH 7.0. Después de aplicar la muestra, se agregaron 15 ml del mismo amortiguador. Posteriormente, la columna se lavó con 40 ml de amortiguador de fosfatos 80 mM, pH 7.7, 11 mmho, hecho con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y se eluyó con un gradiente lineal de concentración de fosfatos formado con 50 ml del amortiguador inicial y 50 ml de amortiguador de fosfatos 400 mM. Se juntaron las muestras con mayor concentración de proteína por absorbancia a 280 nm. Se determinó la presencia de C9 por electroforesis en SDS, la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) y la actividad de este componente del complemento por un ensayo hemolítico.

En la figura 4 se muestran los perfiles de elución del plasma humano desfibrinado pasado por las columnas de lisina-Sepharosa, DEAE-Sepharosa e hidroxilapatita. La eliminación del plasminógeno por la columna de lisina-Sepharosa se verificó eluyendo el plasminógeno con ácido  $\epsilon$ -amino-n-caproico e identificándolo por electroforesis. El C9 se encuentra en la fracción proteica que se une al DEAE-Sephadex y que se eluyó con un gradiente de conductividad de 11 a 30 mmho. Se juntaron las fracciones de mayor concentración de proteína y se pasaron por hidroxilapatita. El C9 eluye de esta última cromatografía a una conductividad de 14.5 mmho.

#### II.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS)

Se empleó el método de Ames (Ames, 1974) usando geles de

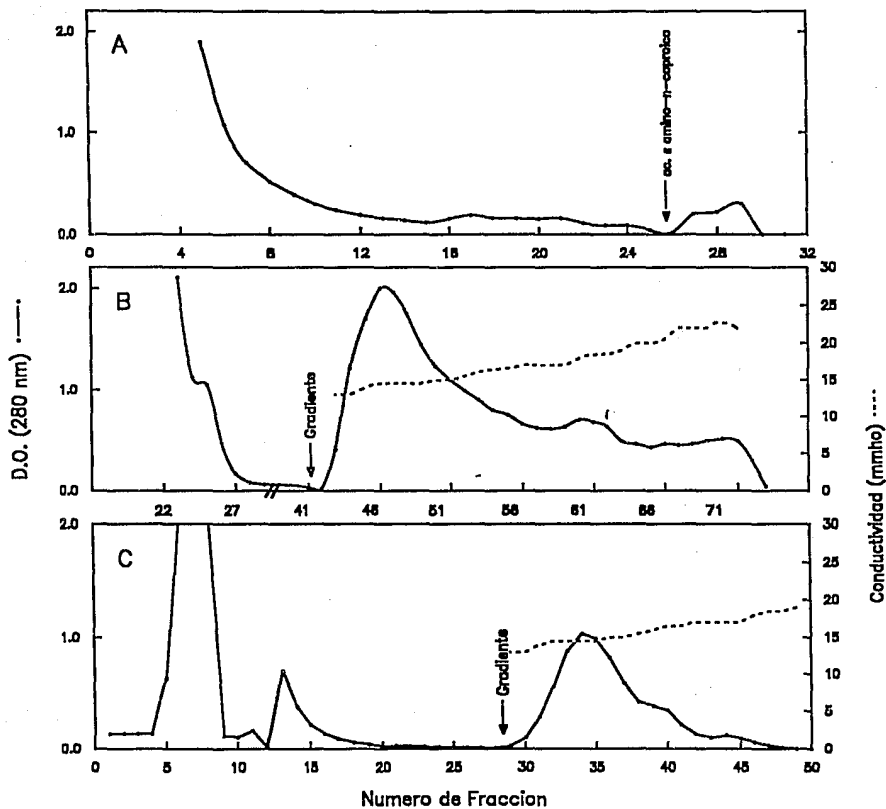


Fig. 4. Purificación de C9. Perfiles de elución de las cromatografías de plasma humano defibrinado en lisina-Sepharosa (A), DEAE-Sephadex (B) e hidroxilapatita (C).

poliacrilamida al 12.5%. Las muestras se desnaturalizaron con SDS al 2% y calentamiento en agua en ebullición por 5 min y se redujeron con mercaptoetanol al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA por gel y se terminó cuando el colorante marcador azul de bromofenol alcanzó el borde terminal del gel. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie para la detección de proteínas o por el método de la base de Schiff del ácido periódico para la detección de glicoproteínas (Kapitany y Zebrowski, 1973). Las fracciones eluidas de la columna de hidroxilapatita entre los valores de conductividad 12 y 15 mmho se corrieron en electroforesis en SDS y en la figura 5 se muestra la fracción eluida con una conductividad de 14.5 mmho que corresponde al C9. Como se observa, no se logró obtener la proteína completamente pura ya que junto a la banda de aproximadamente 70 kDa se observan otras de 92 y 66 kDa. En varios experimentos se utilizó C9 purificado, siguiendo el mismo método, por la Sra. Ingrid Kleber del Instituto de Microbiología Clínica de la Universidad de Erlangen-Nürnberg, Alemania, el cual muestra sólo la banda de 70 kDa en electroforesis.

#### II.4.2. Iodación de C8 y C9

Se colocaron 50 µg de C8 (Sigma) o C9 (purificado en el laboratorio o en Alemania) en 50 µl amortiguador para C9 preparado con fosfatos de potasio 0.1 M, pH 7.5, NaCl 0.15 M, ácido ε-amino-n-caproico 0.05 M, EDTA 0.005 M, en un tubo cónico de polipropileno que contenía un Iodobead (Pierce, Rockford, Illinois), previamente lavado dos veces con 1 ml del mismo amortiguador, suspendido en 50 µl del amortiguador e incubado con

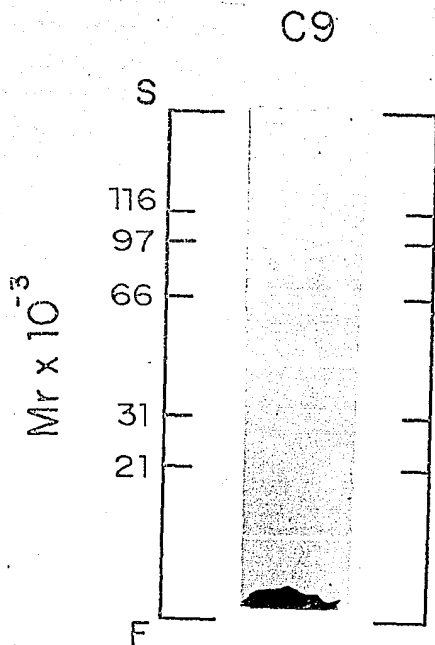


Fig. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12.5% de la fracción de plasma humano eluida de hidroxilapatita con conductividad de 14.5 mmho. El gel se corrió en condiciones reductoras y se tiñó con azul de Coomassie. La banda de 71 kDa corresponde al C9.

2.5  $\mu$ l (250  $\mu$ Ci) de  $^{125}$ I (ICN o Amersham) en hielo por 5 min. El C9 se dejó en esta mezcla por 5 min en hielo. El yodo libre se separó del yodo unido al C9 mediante una columna de Sephadex G-25 coarse (Pharmacia LKB) (Tuszynski et al., 1980). Esta resina se empacó en un tubo cónico de polipropileno y se equilibró con el amortiguador para C9 adicionado con albúmina sérica bovina 1%. Previamente a la adición del C9 marcado, el tubo con resina se centrifugó a 164 x g por 1 min después de lo cual se adicionó el  $^{125}$ IC8 o  $^{125}$ IC9 y se centrifugó a 164 x g por 1 min.

El porcentaje de yodo asociado a la proteína se obtuvo de la siguiente manera:

En un tubo se colocaron 5 ml de amortiguador para C9, 200  $\mu$ l de suero bovino y 2  $\mu$ l de la proteína yodada. De esta solución se tomaron 500  $\mu$ l y se agregaron a dos tubos, uno que contenía 500  $\mu$ l de amortiguador para C9 y el otro 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Esto se realizó por duplicado y se dejaron en hielo por 30 min. Se centrifugaron a 1000 x g por 20 min en frío y se tomaron 300  $\mu$ l del sobrenadante para determinar el número de cuentas por minuto (cpm) de cada muestra en un contador para emisiones gamma (Beckman Gamma 5500).

El porcentaje de cpm presente en la proteína yodada ( $^{125}$ IP) se definió como:

$$\% \text{cpm en } ^{125}\text{IP} = \frac{\text{cpm } ^{125}\text{IP en amortiguador C9} - \text{cpm } ^{125}\text{IP en TCA}}{\text{cpm } ^{125}\text{IP}} \times 100$$

Los porcentajes de precipitabilidad con TCA fueron los siguientes:

$^{125}$ IC8	77.66 +/- 4.67
$^{125}$ IC9	92.54 +/- 7.08

El C8 o C9 marcados se corrieron en electroforesis en geles de poliacrilamida en la forma descrita anteriormente. Finalizado el proceso de tinción y destinción, los geles se secaron sobre papel filtro con calor y vacío en un secador de geles (Drygel Sr. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) y se expusieron a placas Kodak (X-OMAT). Las placas se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 h y posteriormente se revelaron con el fin de observar las características de las proteínas marcadas.

En la figura 6 se muestran las autorradiografías de los geles de electroforesis de estos componentes radiomarcados. Se observa una sola banda de aproximadamente 71 kDa en el caso del C9 y tres bandas: una de aproximadamente 64 kDa que corresponde a las dos subunidades del C8  $\alpha$  y  $\beta$  con un PM cada una de 64 kDa, otra banda de aproximadamente 44 kDa que puede deberse a asociación de subunidades  $\tau$  que tiene un PM de 22 kDa y la última banda de 22 kDa corresponde a la subunidad  $\tau$ .

#### II.4.2. Ensayo hemolítico

##### a) Obtención de suero

Se obtuvo suero fresco, en la forma descrita anteriormente, de un donador con tipo de sangre "O" positivo.

##### b) Obtención de eritrocitos.

Se colocaron 5 ml de sangre tipo "A" positivo en un volumen igual de solución de Alsever's estéril preparada de la siguiente manera: 4.1 g de D-glucosa, 1.6 g de citrato de sodio, 0.84 g de cloruro de sodio, 0.08 g de ácido cítrico anhidro en 100 ml de agua destilada desionizada, pH 6.5. Esta suspensión se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  por una semana con el fin de permitir la lisis espontánea.



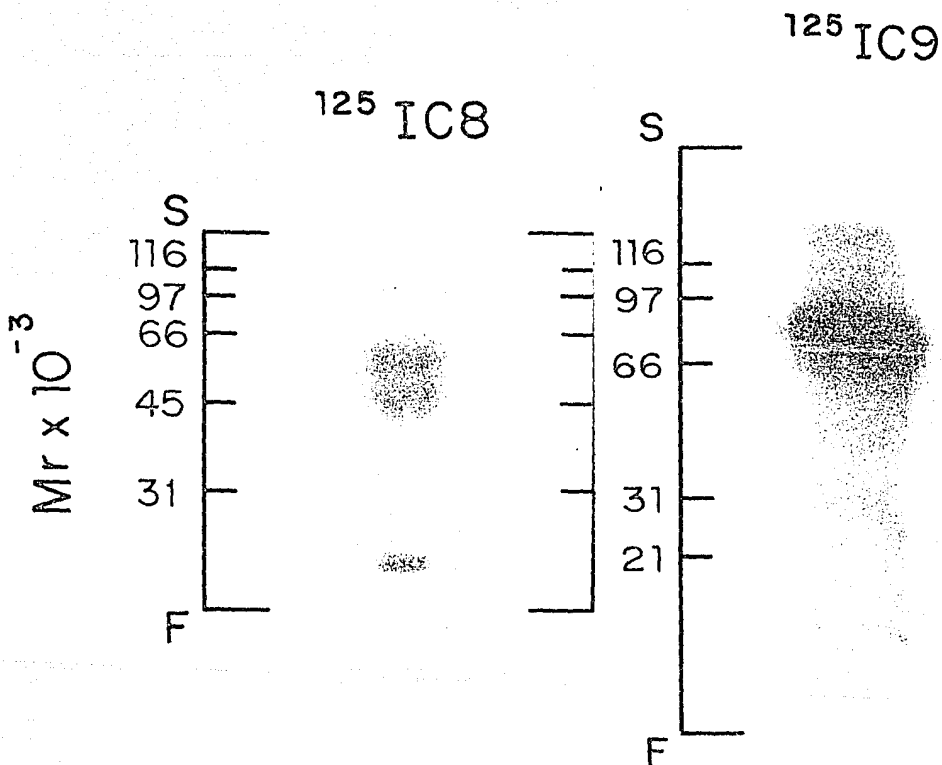


Fig. 6. Autorradiografías de los componentes  $^{125}IC8$  (A) y  $^{125}IC9$  (B). Ambos componentes se corrieron por separado en geles de poliacrilamida-SDS al 12.5% bajo condiciones reductoras, se tificaron con azul de Coomasie y se expusieron a placas para autorradiografía. En (A) la banda de 64 kDa corresponde a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del C8, la de 44 kDa es probablemente un agregado de la subunidad  $\tau$  y la de 22 kDa corresponde a la subunidad  $\tau$  del C8. En (B) la banda de 71 kDa corresponde al C9.

Las células se quitaron de la solución de Alsever's por centrifugación a  $1000 \times g$  por 10 min a  $4^\circ C$ . Se aspiró el plasma y las células se lavaron con amortiguador Veronal-salina adicionado con gelatina (GVB<sup>2+</sup>), Veronal 5 mM, NaCl 145 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, CaCl<sub>2</sub> 30 mM, gelatina 10%, pH 7.4-7.6.

c) Sensibilización de los eritrocitos

Los eritrocitos se prepararon a una concentración de  $1.5 \times 10^9$ /ml. 200  $\mu$ l de esta suspensión se llevaron a 1 ml con GVB<sup>2+</sup> y se mezclaron con 1 ml de antisuero anti grupo sanguíneo "A" diluido 1/100. Esta solución se incubó en hielo con agitación suave por 30 min, después de los cuales se lavaron los eritrocitos exhaustivamente con GVB<sup>2+</sup> y se resuspendieron a la concentración antes mencionada.

Se prepararon ocho tubos pre-enfriados y dos tubos control para lisis espontánea y 100% de lisis. Las fracciones de C9 a probar se diluyeron a una concentración final de 100 ng/ml en GVB<sup>2+</sup>. Se adicionaron cantidades crecientes de C9 de 0 a 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ l de suero deficiente en C9, 200  $\mu$ l de eritrocitos sensibilizados (EA) y GVB<sup>2+</sup> hasta un volumen de 500  $\mu$ l por tubo. El 100% de lisis se preparó por la adición de 300  $\mu$ l de agua destilada a los 200  $\mu$ l de EA y la lisis espontánea se preparó por la adición de 300  $\mu$ l de GVB<sup>2+</sup> a 200  $\mu$ l de EA.

Los tubos se incubaron en un baño con agitación a  $37^\circ C$  por 30 min. La reacción se detuvo por la adición de 1 ml de GVB<sup>2+</sup> frío y las muestras se centrifugaron a  $164 \times g$  por 10 min a  $4^\circ C$ . La absorbancia del sobrenadante de cada tubo se leyó a 415 nm.

La actividad hemolítica del C9 se calculó como sigue:

Los valores de D.O.<sub>415</sub> de la solución de lisis espontánea se

restaron de los valores de D.O.<sub>415</sub> de cada tubo problema y del valor de D.O.<sub>415</sub> del 100% de lisis.

El porcentaje de lisis (y) para cada solución se calculó como:

$$\frac{\text{D.O.}_{415} \text{ del ensayo}}{\text{D.O.}_{415} \text{ del 100\% lisis}}$$

Se calculó el valor de  $y/1-y$  para cada tubo. Estos valores se graficaron contra el volumen de C9 de cada tubo en papel log-log de 2 x 3 ciclos y se determinó la cantidad de C9 con la que se obtuvo el 50% de lisis (i.e.  $y/1-y = 1$ ). Este valor corresponde a una unidad C9CH50. El título hemolítico se calcula como el recíproco de la dilución que da el 50% de lisis (i.e. la cantidad de C9CH50/ml de muestra). El C9CH50 del C9 purificado dio un valor de 99.3 unidades. Este valor está dentro del rango de títulos hemolíticos para C9.

## II. 5. Inmunomicroscopía electrónica

Lo primero que hicimos para explorar el destino del complejo de ataque a membranas después de su interacción con Entamoeba histolytica fue ver la posibilidad de internalización mediante microscopía inmunoelectrónica con anticuerpos marcados con oro coloidal.

Para esto se tomaron  $113.5 \times 10^4$  amibas de 72 h que se centrifugaron a  $164 \times g$  por 5 min y se lavaron tres veces con 50 ml de GVB<sup>2+</sup> frío. Posteriormente se resuspendieron en 20 ml de este amortiguador, se adicionaron 10  $\mu$ l de suero humano deficiente en C9 (0.05%) y se incubaron con agitación leve a 37 °C durante 15 min. La reacción se detuvo por enfriamiento y tres lavados con 50 ml de GVB<sup>2+</sup>. La muestra se separó en dos partes

desiguales, una de 15 ml con  $75 \times 10^6$  células y otra de 5 ml con  $25 \times 10^6$  células. Se agregaron 150  $\mu$ l de anticuerpo de cabra anti C5 humano y 50  $\mu$ l de suero de cabra respectivamente y se incubaron durante 10 min en agua con hielo. Ambos tubos se lavaron dos veces con 50 ml de GVB<sup>2+</sup>. El tubo con suero de cabra se llevó a un volumen final de 2.5 ml y el tubo con anti C5 a un volumen de 5 ml. Se les agregó anticuerpo anti  $\gamma$  globulinas de cabra conjugado con oro, 10 nm, desarrollado en conejo y aislado por afinidad (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) a una dilución 1:100 y se incubaron en agua con hielo por 10 min. Se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0. Las células con suero de cabra se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de fosfatos y se fijaron con glutaraldehído al 2% para lo cual se agregaron 30  $\mu$ l. Las células con anti C5 se resuspendieron en 3 ml de amortiguador de fosfatos y se separaron en tres alícuotas de 1 ml cada una. La primera se fijó inmediatamente con glutaraldehído al 2% (tiempo 0). La segunda y tercera se incubaron a 37 °C por 5 y 30 min respectivamente, después de lo cual se fijaron en la misma forma (tiempos 5 y 30 min). Todas las muestras se procesaron para microscopía electrónica en la forma siguiente:

Las muestras fijadas en glutaraldehído al 2% se lavaron exhaustivamente en amortiguador de fosfatos 0.1 M y se colocaron en tetróxido de osmio al 2%, preparado en el mismo amortiguador, por 2 h. Posteriormente se hicieron las deshidrataciones con alcohol desde 30% hasta 100%. Las muestras se pusieron en óxido de propileno, óxido de propileno y EPON 812 1:1 y finalmente se incluyeron en EPON para realizar los cortes.

## II.6. Cinética de fijación de $^{125}\text{IC9}$ a Entamoeba histolytica de las cepas (S) y (R).

Se incubaron 100  $\mu\text{l}$  de trofozoitos de las cepas (S) y (R) a una concentración de  $10 \times 10^6/\text{ml}$  con 100  $\mu\text{l}$  de suero humano fresco al 40% preparado en VBS-A y  $^{125}\text{IC9}$ . La incubación se hizo a 37 °C por tiempos de 0, 15, 30 y 60 min. Después de cada tiempo la reacción se detuvo colocando los 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión sobre 800  $\mu\text{l}$  de sacarosa al 20%. Se centrifugó a 12,000 x g por 5 min a 4 °C y se determinó el número de cpm presente en el precipitado y sobrenadante de cada muestra.

## II.6. Fraccionamiento subcelular de trofozoitos de Entamoeba histolytica

Para investigar el destino del MAC al interactuar con las amibas se realizaron separaciones de fracciones subcelulares por dos métodos diferentes después de incubar trofozoitos de las cepas (S) y (R) con suero humano que contenía  $^{125}\text{IC9}$ .

### II.6.1. Método de Aley (Aley *et al*, 1980)

Se colocaron por separado 10 ml de trofozoitos de E. histolytica de las cepas (S) y (R) a una concentración de  $2 \times 10^6/\text{ml}$  en dos tubos cónicos de 50 ml y se adicionaron 9.7 ml de suero humano fresco diluido al 40% en VBS-A frío y  $^{125}\text{IC9}$ . Esta suspensión se incubó a 37 °C por 30 min, después de los cuales se detuvo la reacción añadiendo VBS-A helado y centrifugando a 164 x g por 5 min para eliminar el suero. Los precipitados se lavaron exhaustivamente con PBS-A para eliminar el  $^{125}\text{IC9}$  que no se unió a las amibas y se colocaron en dos homogenizadores de vidrio de 5

ml. Cada paquete de células se llevó a un volumen de 2 ml con PBS-A adicionado con  $Mg^{++}$  y se mezclaron rápidamente con un volumen igual de Concanavalina A a una concentración de 1 mg/ml en el mismo amortiguador. Después de 5 min las células se centrifugaron a  $164 \times g$ , 1 min en frío. Los precipitados se resuspendieron en 2 ml de amortiguador Tris HCl 10 mM pH 7.5,  $MgCl_2$  1 mM y parahidroximercuribenzoato (PHMB) 1 mM (Tris-Mg) y se dejaron 10 min en este amortiguador hipotónico. Posteriormente, las células se homogenizaron por 18-20 golpes en un homogenizador tipo Dounce (Teflon Pestle Tissue Homogenizer, Thomas Company, Philadelphia, Pa) y cada homogenado se colocó en un gradiente formado por 8 ml de manitol 0.5 M sobre 4 ml de sacarosa 0.58 M, ambos preparados en el amortiguador Tris-Mg. Los gradientes se centrifugaron a  $365 \times g$  por 30 min en frío. Se quitaron los sobrenadantes del gradiente (S/N I) y se centrifugaron a  $40,000 \times g$  por 1 h para separar moléculas solubles de fragmentos pequeños de membrana y vesículas (S/N II) y (PPDO. II). Los precipitados de los gradientes (PPDO. I) se resuspendieron en 1 ml de Tris-Mg con  $\alpha$ -metil-D-manósido 1 M y se dejaron en hielo por 40 min con agitación ocasional. Estos precipitados, ricos en membrana plasmática y libres de Concanavalina A, se diluyeron en tres volúmenes de Tris-Mg y se homogenizaron con 80 golpes. Estos homogenados se colocaron sobre un gradiente de sacarosa al 20% en Tris-Mg y se centrifugaron a  $365 \times g$  por 30 min en frío. Los sobrenadantes (S/N III) se centrifugaron a  $40,000 \times g$  por 1 h y los precipitados (PPDO. IV), enriquecidos en membranas plasmáticas, se resuspendieron en amortiguador Tris-Mg.

Se determinó el número de cpm presente en cada fracción para

conocer el destino del  $^{125}\text{IC9}$  después de su incubación con E. histolytica de la cepa (S) o (R).

#### II.6.2. Método de Rosenberg y Gitler (Rosenberg y Gitler, 1985)

Se incubaron por separado trofozoitos de E. histolytica de las cepas (S) y (R) a una concentración de  $10 \times 10^4/\text{ml}$  con suero humano fresco al 40% en VBS-A y  $^{125}\text{IC9}$  por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . El medio de incubación se eliminó por centrifugación a  $500 \times g$  por 5 min en frío y las células se lavaron dos veces con 50 ml de PBS-A frío. Cada botón de amibas se resuspendió en 2 ml de amortiguador de homogenización (HB), Tris 10 mM, sacarosa 0.25 M, pH 7.4, se colocó en un homogenizador de vidrio de 5 ml y se homogenizó con 20 golpes. Los núcleos y detritus se eliminaron por centrifugación a  $500 \times g$  por 5 min. Los homogenados post-nucleares se colocaron en gradientes de Percoll al 25% preparados de la siguiente manera: Se adicionaron 9 ml de Percoll Isotónico (Pharmacia Fine Chemicals) a 1 ml de sacarosa 2.5 M preparada en Tris 100 mM, pH 7.4 y esta solución se diluyó al 25% con HB. En un tubo de policarbonato para el rotor Beckman Ti-50 se colocaron 7 ml de la solución de Percoll al 25% sobre 2 ml de sacarosa al 50% preparada en agua destilada. Las muestras puestas en los gradientes se centrifugaron a  $62,000 \times g$  por 30 min a  $4^\circ\text{C}$  y se colectaron fracciones de 500  $\mu\text{l}$ , comenzando con la parte superior del tubo. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) y número de cpm a cada una de las fracciones.

#### II.8. Ensayo de acción de lisados amibianos sobre $^{125}\text{IC8}$ y $^{125}\text{IC9}$

Para explorar la acción de proteasas en lisados amibianos sobre los componentes terminales del complemento se lisaron 10 x 10<sup>6</sup> trofozoítos de E. histolytica de ambas cepas con 1 ml de Triton x100 0.5% v/v en PBS-A por 1 h en hielo. Se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes.

Se incubó un número igual de cpm de <sup>125</sup>IC8 o <sup>125</sup>IC9 con 40 µl de extracto amibiano de ambas cepas y 10 µl de azocaseína preparada a una concentración de 1 mg/ml en amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5 por tiempos de 0 a 64 min a 37 °C. Después de cada tiempo la reacción se detuvo por la adición de TCA al 20% frío. Los tubos se colocaron en hielo y se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min. La degradación de la azocaseína se determinó por la absorbancia de los sobrenadantes a 366 nm. La degradación de C8 o C9 se determinó por el número de cpm presente en el precipitado y sobrenadante de cada muestra.

## II.9. Obtención de sueros de animales de distintas especies

Además de trabajar con algunos aspectos de la interacción de E. histolytica con los componentes C8 y C9 del complemento, estudiamos el efecto lítico de sueros de diferentes especies de mamíferos sobre trofozoítos de E. histolytica. Esto lo hicimos con el fin de conocer si existe una correlación entre la resistencia de estas especies a la amibiasis y el efecto de su suero sobre las amibas.

Se obtuvieron sueros, en la forma descrita anteriormente para suero humano, de las siguientes especies:

a) Carnero.- de cinco animales



- b) Cobayo.- de veinte animales
- c) Conejo.- de veinte animales
- d) Chivo.- de cinco animales
- e) Hamster.- de veinte animales
- f) Humano.- de veinte individuos
- g) Rata.- de veinte animales
- h) Ratón.- de veinte animales

#### II.9.1. Ensayos de lisis de E. histolytica con diferentes sueros

Los ensayos y cálculos de porcentajes de lisis y viabilidad se hicieron en la forma descrita anteriormente para probar la viabilidad de E. histolytica a suero humano.

#### II.9.2. Determinación de anticuerpos

Se determinó la presencia de anticuerpos anti amiba en los diferentes sueros por doble inmunodifusión. La agarosa de las placas se preparó en la forma descrita anteriormente para inmunolectroforesis. La agarosa se vertió sobre portaobjetos de vidrio y se hicieron seis pozos en círculo y uno central. En el pozo central se colocaron 20  $\mu$ l de extracto amibiano preparado a partir de  $20 \times 10^6$  trofozoitos/ml. En uno de los pozos alrededor de éste se pusieron 20  $\mu$ l de suero de conejo anti amiba como control positivo y en los demás se agregaron 20  $\mu$ l de cada uno de los diferentes sueros. Las placas se colocaron en una cámara húmeda, la difusión se dejó por 48 h y las bandas de precipitación se observaron con ayuda de una caja negra.

#### II.9.3. Determinación de CH50

A todos los sueros empleados en estos ensayos se les determinó el nivel de complemento. Esto lo realizó el Dr. Rubén Darío Martínez de la Subdivisión de Medicina Experimental, Fac. de Medicina, UNAM de acuerdo a la siguiente metodología:

a) Sensibilización de los eritrocitos

Se preparó una suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRC) al 2% en amortiguador Veronal-salina adicionado con gelatina y dextrosa (DGVB<sup>++</sup>), este amortiguador se prepara en la forma ya descrita para el GVB<sup>++</sup> y se le agrega 5% de glucosa. Por otro lado, se preparó una solución de hemolisina en DGVB<sup>++</sup> (1:64). Se mezclaron volúmenes iguales de GRC y hemolisina, se incubaron a 37 °C por 30 min y posteriormente se enfriaron a 4 °C en un baño con hielo.

Se prepararon catorce tubos pre-enfriados, doce para las diluciones de los sueros problema y dos para los controles que fueron lisis espontánea y 100% de lisis. Se adicionaron cantidades crecientes de los sueros problema, 600 µl de eritrocitos sensibilizados (EA) y DGVB<sup>++</sup> hasta un volumen de 900 µl. El 100% de lisis se preparó por la adición de 300 µl de agua destilada a los 600 µl de EA y para la lisis espontánea se adicionaron 300 µl de DGVB<sup>++</sup> a los 600 µl de EA.

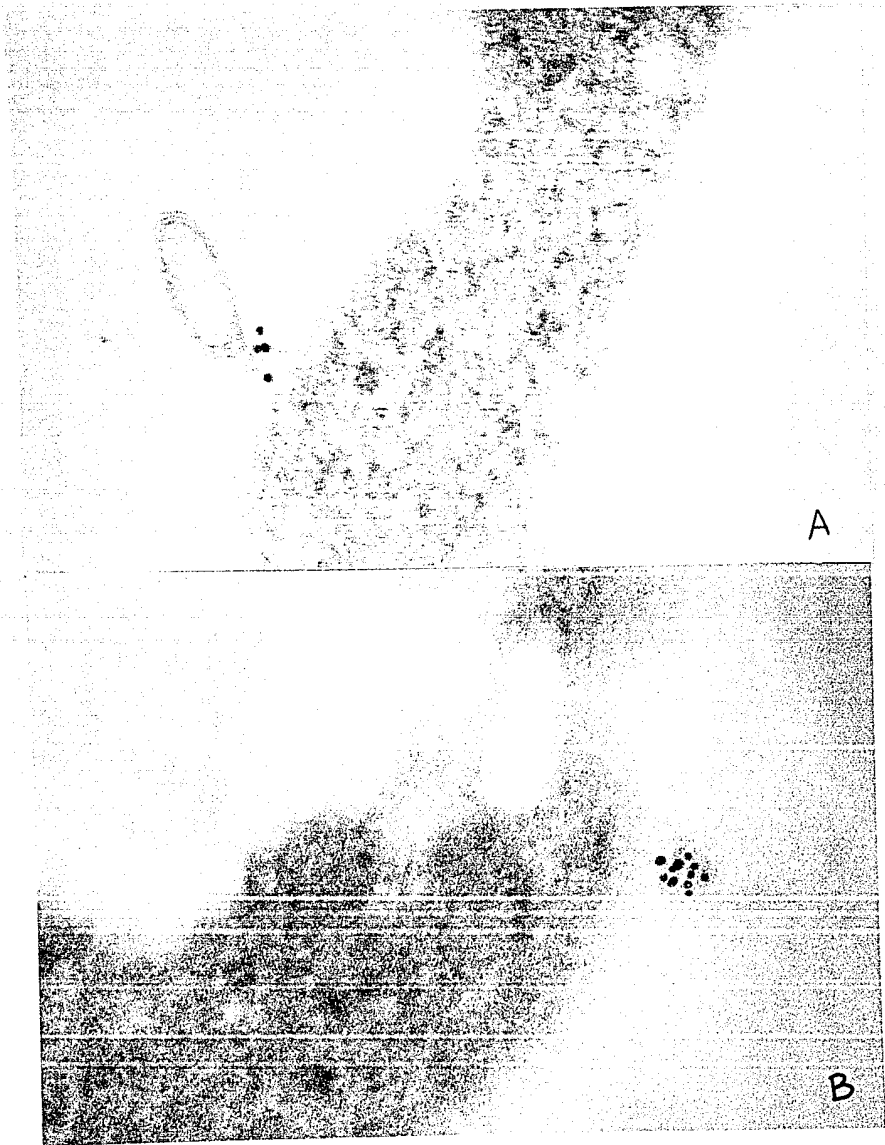
Los tubos se incubaron en un baño con agitación a 37 °C por 30 min. La reacción se detuvo por la adición de 500 µl de DGVB<sup>++</sup> frío, las muestras se centrifugaron a 164 x g por 10 min a 4 °C y la absorbancia del sobrenadante de cada tubo se leyó a 550 nm. La actividad hemolítica (CH50) de los diferentes sueros se calculó en la forma descrita anteriormente para C9CH50.

### CAPITULO III. RESULTADOS

#### III.1 Destino de los complejos CSb-9 en trofozoitos de Entamoeba histolytica analizado por microscopía electrónica.

Lo primero que analizamos como mecanismo probable de resistencia de E. histolytica al complemento fue la localización de los complejos CSb-9 en trofozoitos posteriormente a su interacción con suero. Esto se hizo mediante microscopía inmunoeléctronica usando suero de cabra no inmune (control positivo) o anticuerpos de cabra anti C5 humano y oro coloidal conjugado a anticuerpos de conejo anti IgG de cabra. Se escogió el anti-C5 para este experimento porque los determinantes C5 en los complejos CSb-9 están accesibles para la unión de componentes como anticuerpos (Bhakdi, et al., 1980).

Las incubaciones con el suero de cabra y los anticuerpos se hicieron por tiempos de 0 y 5 min. En la fig. 7A se muestra una amiba incubada con suero de cabra y anti IgG de cabra con oro por 0 min donde la marca se encuentra en la superficie de la célula. En la figura 7B también se observa la marca en la superficie de las células incubadas con anticuerpo anti C5 y anti IgG de cabra con oro en el tiempo 0 min, aunque con mayor intensidad. En la fig. 7C se observan las partículas de oro dentro de vesículas en las amibas incubadas por 5 min con el anticuerpo anti C5. El hecho de que en el control positivo con suero de cabra se observe marca en la superficie complica la interpretación de los resultados y probablemente se debe a que las amibas unen con cierta especificidad diversas moléculas. Sin embargo, al incubar las amibas con el suero de cabra no se observó la marca en el



A

B



Fig. 7. Destino de los complejos C5b-9 en la superficie de trofozoitos de *E. histolytica* estudiado por microscopía inmunoelectrónica. Las amibas tratadas con suero de cabra no inmune o IgG de cabra anti-C5 a 0°C fueron incubadas con partículas de oro coloidal conjugadas a anticuerpos de conejo anti-IgG de cabra. Las células fueron fijadas inmediatamente o después de la incubación a 37°C por 0 o 5 min. Las partículas de oro coloidal se encontraron en la superficie de las células incubadas a 0°C con suero de cabra no inmune (A) y con anti-C5 (B). Después de la incubación a 37°C por 5 min, las partículas de oro coloidal se encontraron en vesículas intracelulares. (C)

interior de la célula, hecho que si ocurrió en el caso de los trofozoitos incubados con el anticuerpo anti C9 por 5 min y que se interpreta como internalización de los complejos C5b-9.

### III.2. Cinética de fijación de $^{125}\text{I}$ C9 a E. histolytica de las cepas (S) y (R).

Pensamos que un aspecto importante para conocer el destino del complejo de ataque a membranas después de su interacción con los trofozoitos (S) y (R) era estudiar el curso temporal de la unión del  $^{125}\text{I}$ C9 a las amibas para lo cual incubamos amibas de las cepas (R) y (S) con suero humano fresco y  $^{125}\text{I}$ C9 a 37 °C por tiempos de 0, 15, 30 y 60 min. Después de cada tiempo separamos a las células por centrifugación y determinamos el número de cpm asociado a las amibas. En la figura 8 se encuentran los promedios de siete experimentos con las dos cepas. Se observa que la mayor fijación se da entre los 0 y 15 min con una ligera tendencia a una mayor fijación de C9 en la cepa (R), pero con una cinética similar.

Quisimos saber si la mayor asociación de cpm en la cepa (R) se debía a un mayor número de amibas presente después de la incubación con el suero, ya que la viabilidad de esta cepa es mayor a la de la cepa (S). Contamos el número de amibas presente después de la incubación con suero por 30 min a 37 °C y determinamos el número de moléculas de C9/amiba:

cepa (R)	$6.31 \times 10^6$ moléculas de C9/amiba
cepa (S)	$5.86 \times 10^6$ moléculas de C9/amiba

De acuerdo a esto, la mayor fijación de cpm que se observa en la cepa (R) se debe a que sobreviven más amibas resistentes a

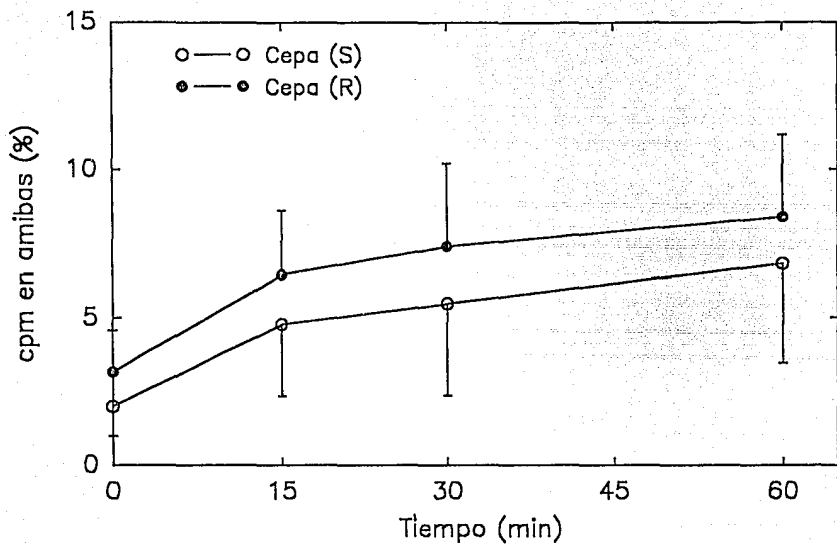


Fig. 8. Cinéticas de fijación de C9 a trofozoitos (S) y (R) incubados con suero humano fresco y  $^{125}\text{I}$ C9 a 37 °C por tiempos de 0, 15, 30 y 60 min. Cada punto de las curvas representa el promedio de los porcentajes de cpm unidos a las amibas en siete experimentos.

### III.2. Asociación de $^{125}\text{I}C9$ con diferentes fracciones subcelulares según el método de Aley.

Con la técnica de microscopía inmunoelectrónica observamos complejos de ataque a membranas dentro de los trofozoitos por lo que decidimos fraccionar amibas de las cepas resistente (R) y susceptible (S) a suero humano para conocer la ubicación de los complejos en las células y ver si existen diferencias entre las dos cepas. Primero empleamos el método de Aley con el que se obtienen cuatro fracciones diferentes de E. histolytica que son: a) Fracción soluble, b) membranas internas, c) membranas no vesiculadas y residuo y d) membrana plasmática. Se incubaron trofozoitos de ambas cepas con suero humano y  $^{125}\text{I}C9$  por 30 min a 37 °C, se realizó el fraccionamiento y se determinó el porcentaje de cpm asociado a las diferentes fracciones. Estos resultados se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Porcientos de cpm asociados a las fracciones, de acuerdo a Aley, de E. histolytica cepas (R) y (S) incubadas con suero humano y  $C9^{125}\text{I}$  a 37°C por 30 min.

cpm totales	Fracción	Cepa	% cpm
9,623	Soluble	(R)	19.2
	M. internas	(R)	35.9
	M. no vesic. y residuo	(R)	24.43
	M. plasmática	(R)	20.4
5,188	Soluble	(S)	19.78
	M. internas	(S)	19.06
	M. no vesic. y residuo	(S)	34.66
	M. plasmática	(S)	26.5

En la cepa (R) la asociación de cpm fue similar entre las fracciones soluble, membrana plasmática y membranas no



vesiculadas y residuo. La mayor asociación de cpm se encontró en la fracción que corresponde a membranas internas. En la cepa (S) las cpm se asociaron principalmente a membranas no vesiculadas y residuo, en segundo término a membranas plasmáticas y el porcentaje de cpm entre fracción soluble y membranas internas fue muy similar.

#### III.4. Asociación de $^{125}\text{IC9}$ con fracciones subcelulares de E. histolytica según el método de Rosenberg y Gitler en cepas (S) y (R).

Empleamos un segundo método de fraccionamiento de ambas para la localización del MAC en los trofozoitos (R) y (S) después de su interacción con el complemento. Con este método se obtienen veinte fracciones subcelulares muy bien caracterizadas. Las primeras siete fracciones corresponden a los componentes solubles, las fracciones 8 a 12 a vesículas intracelulares, las fracciones 13 a 18 a membrana plasmática y las fracciones 19 y 20 a material particulado. La figura 9A muestra un experimento representativo con la cepa (R). La línea continua representa el número de cuentas asociado a cada fracción. Como control la discontinua muestra los valores de concentración de proteína de las fracciones; esto se hizo para asegurarnos que estábamos fraccionando adecuadamente. El mayor número de cuentas se encuentra alrededor de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática, en particular en la fracción 14.

La figura 9B muestra un experimento representativo con la cepa (S). Se observa que la distribución de las cpm entre las dos cepas fue similar.

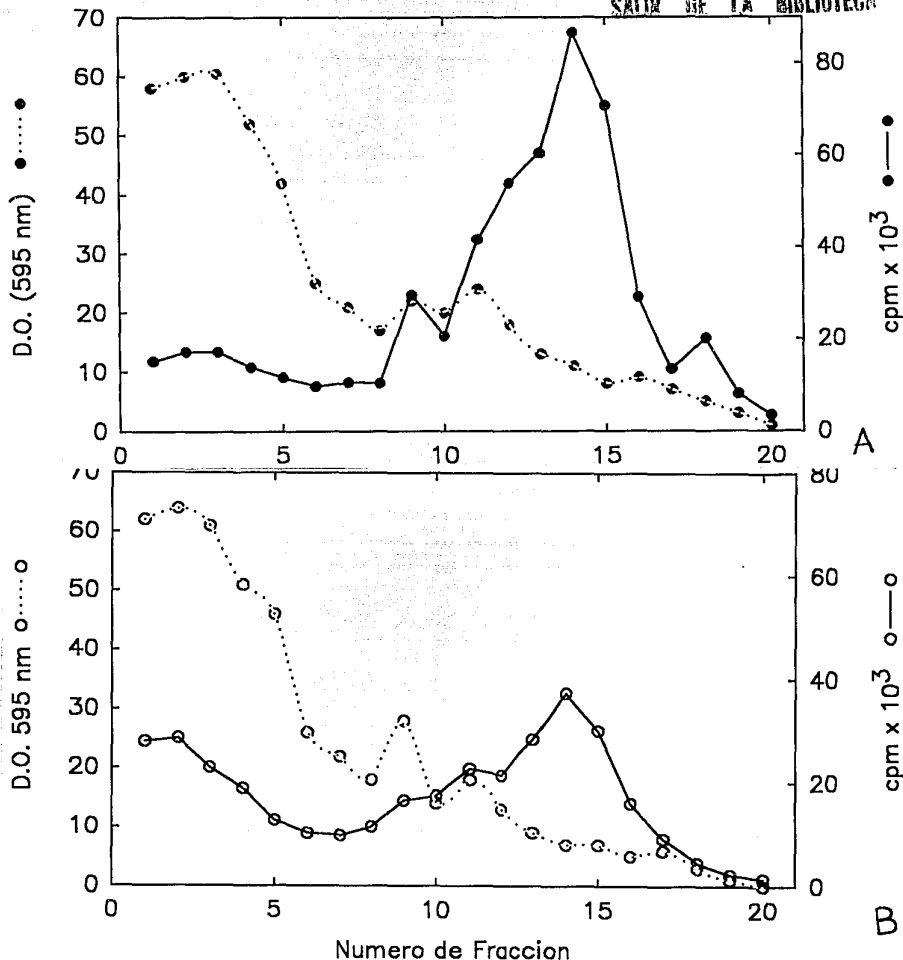


Fig.9. Fraccionamiento subcelular de acuerdo al método de Rosenberg y Gitler de *E. histolytica* (R) y (S) preincubadas con suero humano que contenía <sup>125</sup>I C9 por 15 min a 37 °C. Las líneas continuas muestran las cpm asociadas a las diferentes fracciones y las discontinuas muestran los valores de concentración de proteína determinados por el método de Bradford. (A) Cepa R y (B) Cepa S.

### III.5. Acción de extractos amibianos de las cepas (S) y (R) sobre <sup>125</sup>IC8 y <sup>125</sup>IC9.

La posibilidad de que una de las formas de manejo del MAC por *E. histolytica* para resistir su ataque fuera la degradación de los componentes terminales C8 y C9 la exploramos incubando <sup>125</sup>IC8 y <sup>125</sup>IC9 con extractos amibianos de ambas cepas por tiempos de 0 a 64 min. Después de cada tiempo la reacción se detuvo precipitando con TCA al 20%, se centrifugó y se determinó el número de cpm y absorbancia de los sobrenadantes.

En la figura 10A se muestran los resultados obtenidos con los extractos de las dos cepas y C8. Los círculos llenos representan los resultados obtenidos con la cepa (R) y los círculos vacíos representan los obtenidos con la cepa (S). Las líneas continuas muestran los porcentos de cpm en los sobrenadantes y las líneas discontinuas muestran la absorbancia dada por la degradación de la azocaseína. En la figura 10B se encuentra el resultado obtenido al incubar C9 con los extractos de ambas cepas. En este caso los porcentos de cpm en los sobrenadantes de las cepas (R) y (S) fueron muy similares por lo que solo se ve una línea. Se observa que los resultados obtenidos con las dos cepas fueron muy similares. Los valores de absorbancia a 366 nm aumentaron conforme al tiempo de incubación lo que nos indica que los extractos amibianos sí tenían actividad proteolítica. En cambio, los porcentos de cpm en los sobrenadantes se mantuvieron constantes a lo largo de la incubación lo que nos muestra que no hubo degradación de <sup>125</sup>IC8 o <sup>125</sup>IC9 por los extractos amibianos.

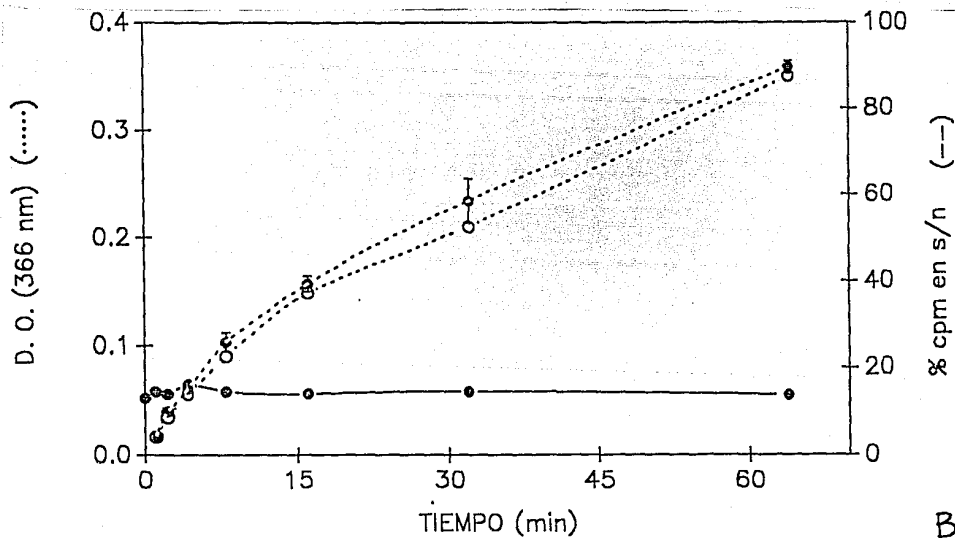
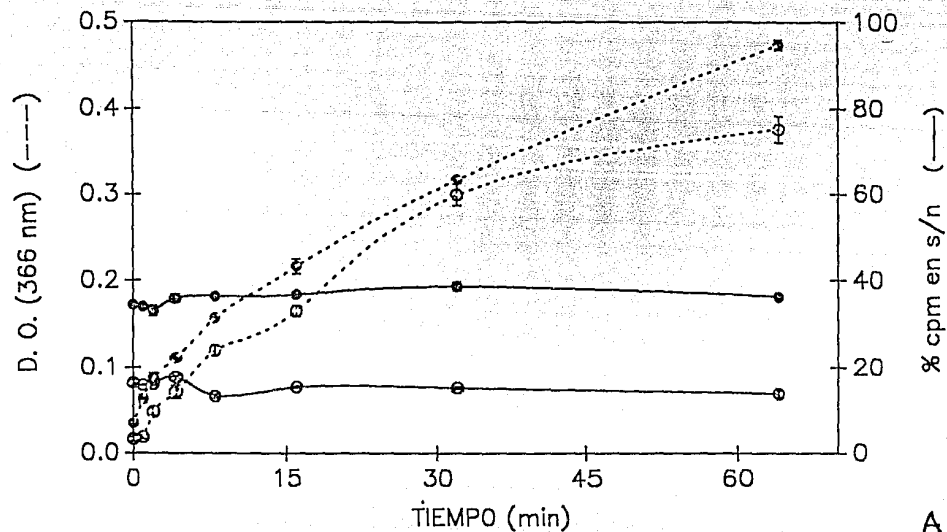


Fig. 10. Efecto de la actividad proteolítica de extractos amibianos de las cepas (S) y (R) sobre azocaseína y  $^{125}\text{I}$ C8 (A) y  $^{125}\text{I}$ C9 (B). La incubación se hizo a 37 °C por tiempos de 0 a 64 min.

### III.6. Efecto lítico de sueros de diferentes especies sobre Entamoeba histolytica.

Como otra parte de este trabajo estudiamos el efecto lítico de sueros de diferentes especies animales con el objeto de conocer si este efecto está relacionado con la susceptibilidad de las especies probadas a la amibiasis.

En las figuras 11-14 se muestran los porcentajes de lisis de los trofozoítos con los sueros de diferentes especies. Se observa que el mayor efecto lítico sobre los trofozoítos lo presentaron el suero de humano, de rata y de chivo (fig. 11 y 12); el cobayo, carnero y hamster ocuparon una posición intermedia (fig. 12 y 13) los de menor capacidad lítica fueron los sueros de conejo y ratón (fig. 14).

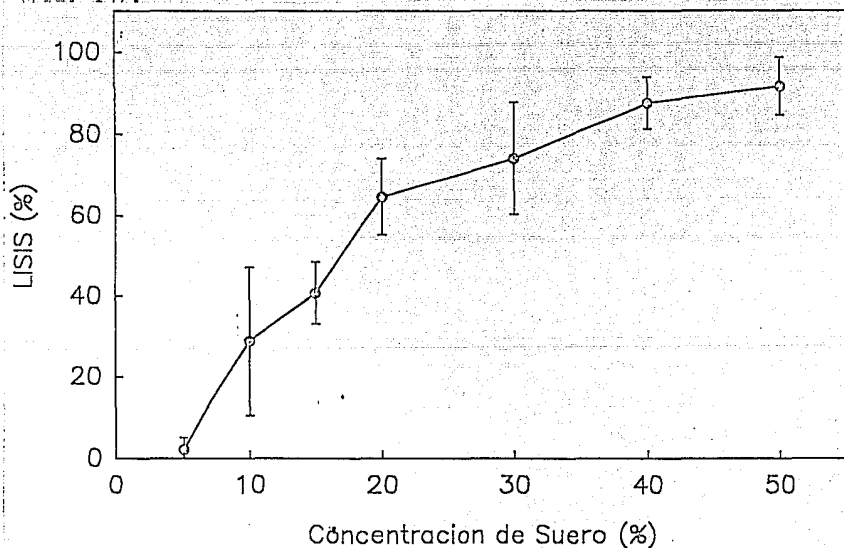


Fig. 11. Efecto lítico de suero de rata a diferentes concentraciones sobre trofozoítos de E. histolytica incubados a 37 °C por 30 min. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos con veinte sueros.

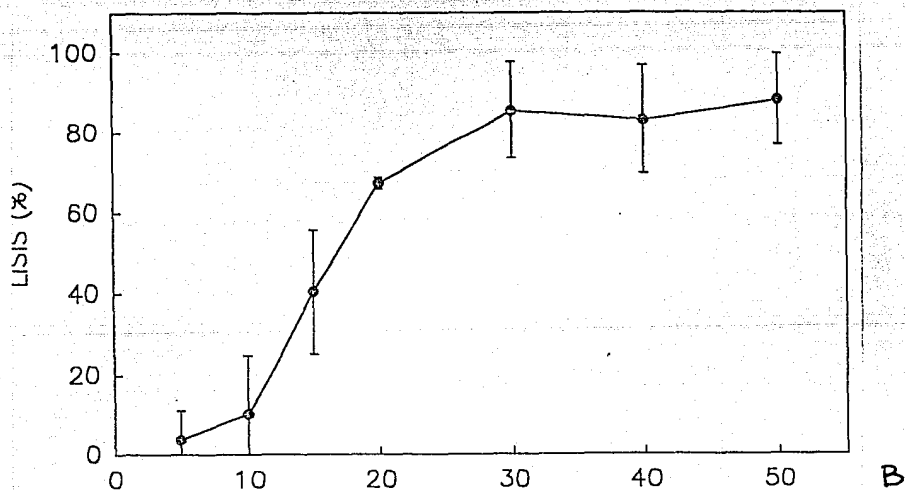
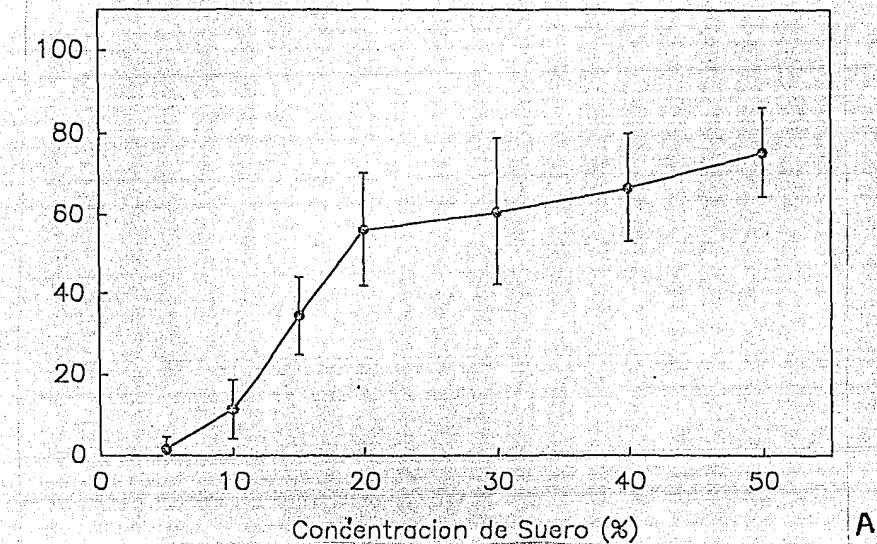


Fig. 11. Efecto lítico de suero humano (A) y suero de chivo (B) a diferentes concentraciones sobre trofozoítos de *E. histolytica* incubados a 37 °C por 30 min. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos con veinte sueros humanos y cinco sueros de chivo.

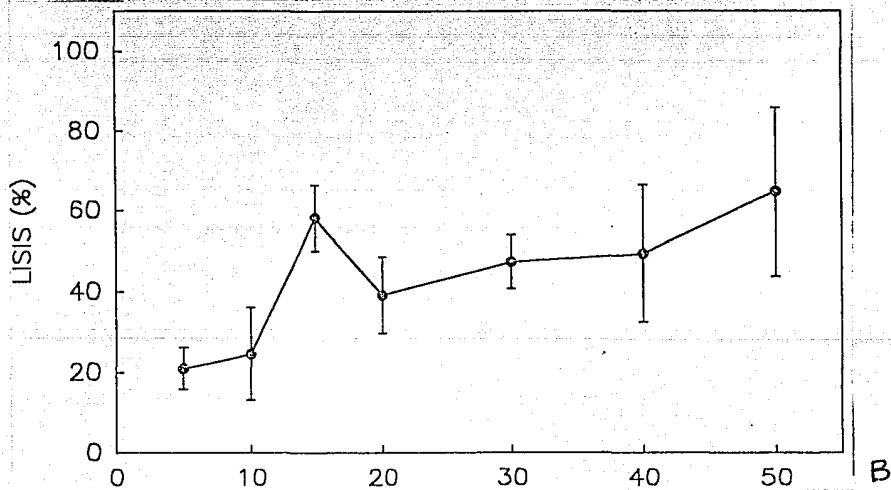
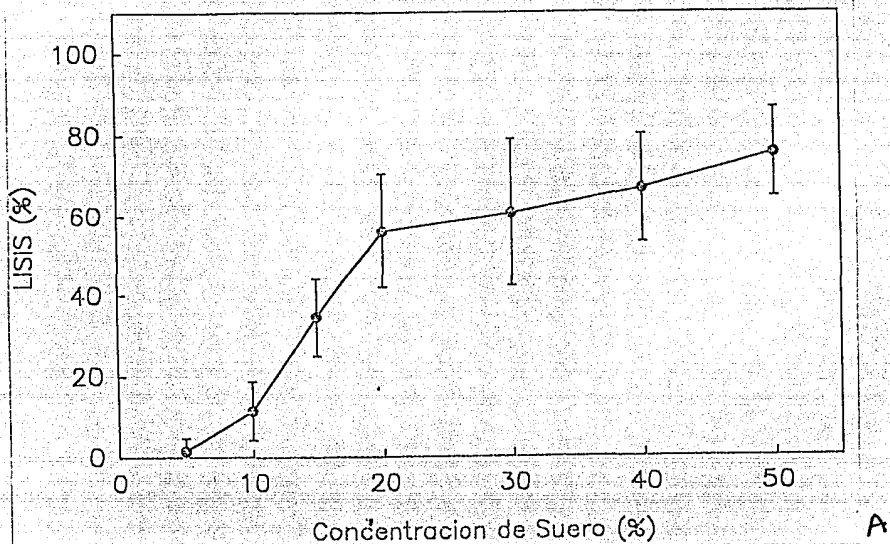
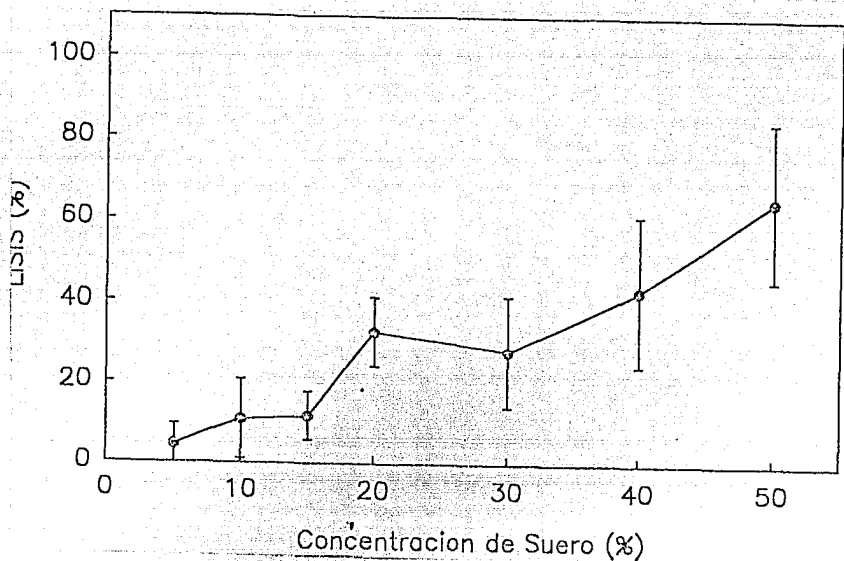
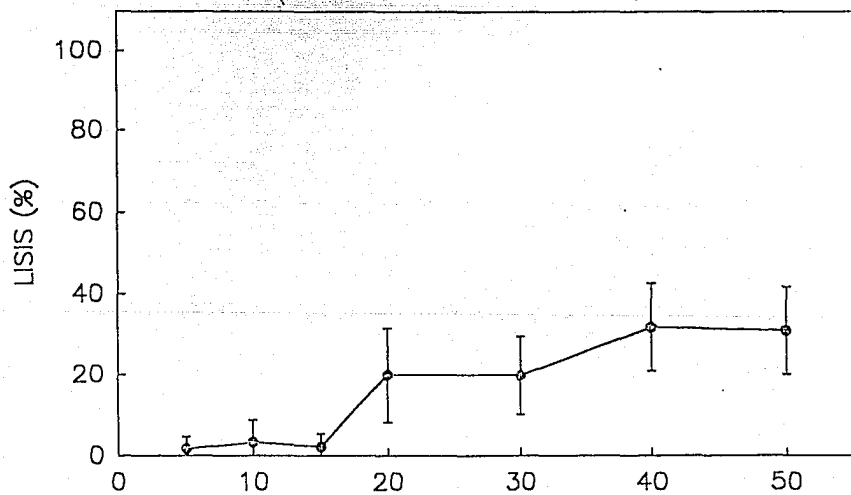


Fig. 12. Efecto lítico de suero de cobayo (A) y carnero (B) a diferentes concentraciones sobre trofozoitos de *E. histolytica* incubados a 37 °C por 30 min. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos con 20 sueros de cobayo y cinco sueros de carnero.



A



B

Fig. 13. Efecto lítico de suero de hamster (A) y suero de conejo (B) a diferentes concentraciones sobre trofozoitos de *E. histolytica* incubados a 37 °C por 30 min. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos con veinte sueros.



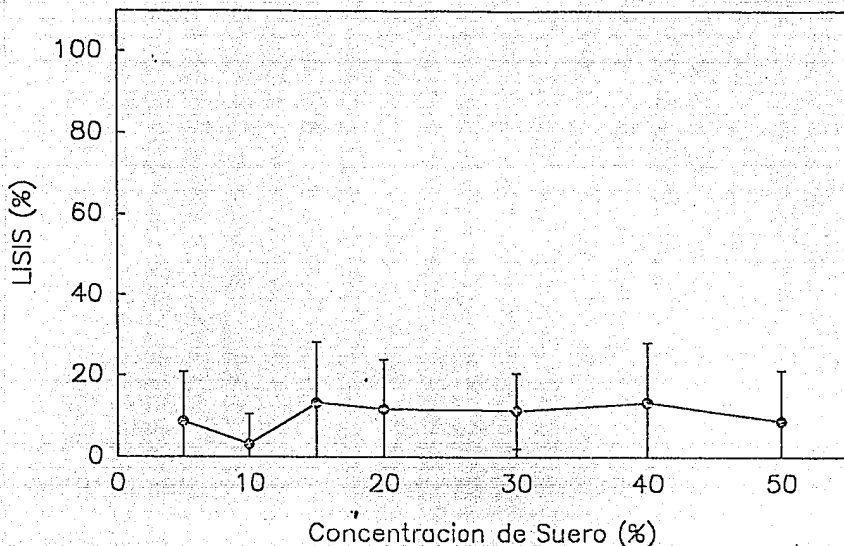


Fig. 14. Efecto lítico de suero de ratón a diferentes concentraciones sobre trofozoitos de *E. histolytica* incubados a 37 °C por 30 min. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos con veinte sueros.

### III.6.1. Determinación de anticuerpos anti amiba en los sueros probados

Esto se hizo mediante la técnica de doble inmunodifusión y ninguno de los sueros utilizados en los ensayos de lisis de trofozoitos de *E. histolytica* dio banda de precipitación contra un extracto amibiano preparado a partir de  $20 \times 10^6$  trofozoitos /ml. En la figura 15 se muestra una doble inmunodifusión en donde se observan las dos bandas de precipitación en los pozos del control positivo (a y b) y los demás sin banda. Esta doble inmunodifusión se hizo con suero de rata y sólo se muestra ésta ya que todos los demás sueros dieron un resultado igual.

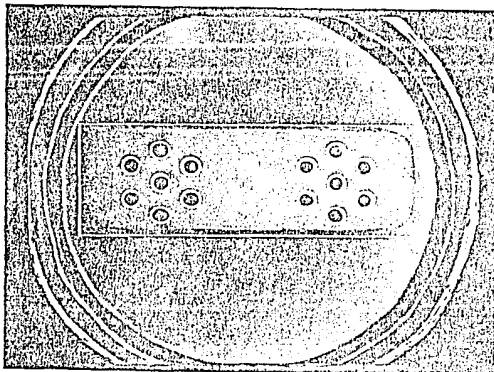


Fig. 15. Doble inmuno difusión de extracto amibiano (pozo central) y los siguientes sueros a), b), g) y h) suero de conejo anti amiba y c), d), e), f), i), j), k) y l) diferentes sueros de rata.

Al relacionar los niveles de complemento (CH50) de los diferentes sueros con su efecto lítico no encontramos relación entre estos dos parámetros, es decir, la capacidad lítica de los sueros probados sobre los trofozoitos de E. histolytica no depende únicamente del nivel de complemento del suero. En la figura 15 se muestra la correlación entre el CH50 de diferentes sueros y su efecto lítico sobre las amibas.

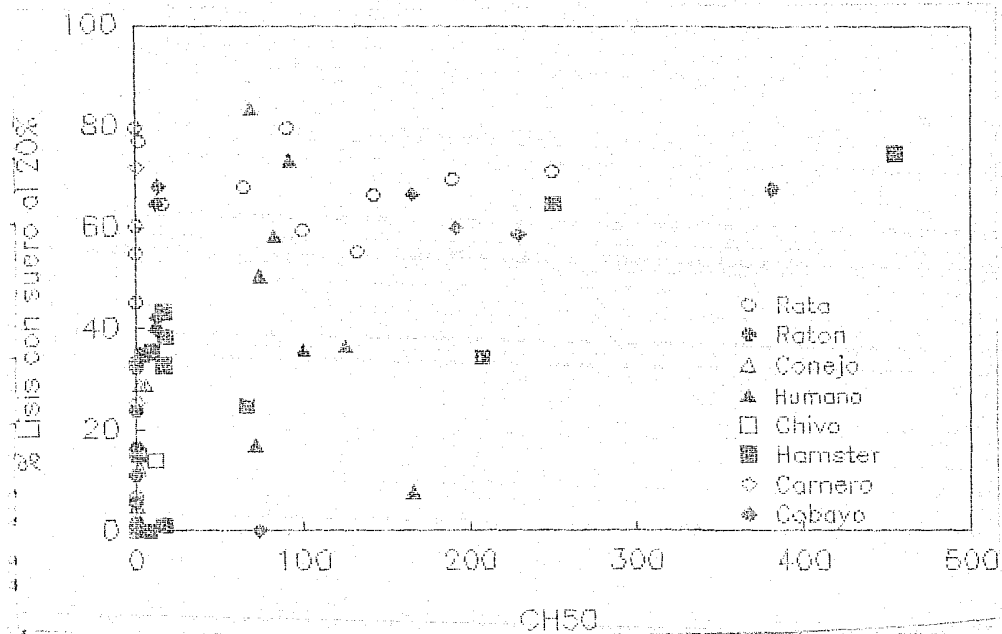


Fig. 16. Correlación entre el CH50 de sueros al 20% de diferentes animales y el porcentaje de lisis de trofozoitos de *E. histolytica*.

#### CAPITULO IV. DISCUSION

En el comportamiento invasivo de Entamoeba histolytica la resistencia a las defensas naturales del hospedero juega un papel muy importante. Este parásito activa al sistema del complemento por las dos vías. Uno de los mecanismos de activación es por medio de una de las proteasas de la amiba, la de cisteína de 56 kDa, que actúa como una convertasa de C3 (Reed et al., 1989). Una vez que los trofozoitos activan al sistema del complemento, deben resistir su efecto amebicida para lograr invadir los tejidos. Diversas cepas de amibas pueden desarrollar resistencia al efecto lítico del complemento y esto está correlacionado con el grado de patogenicidad. Tanto las cepas susceptibles como las resistentes presentan mecanismos y niveles de activación similares, por lo que probablemente la diferencia en la susceptibilidad al efecto lítico esté en el manejo de la vía membranolítica del sistema. En esta vía participan cinco componentes, el 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 glicoproteína para la formación de la lesión por la que se da una entrada masiva de diferentes moléculas que culmina con la lisis de la célula. Por esta razón y otras como su estructura de una sola cadena la elegimos como marcador del destino del complejo de ataque a membranas después de la interacción de las amibas con el complemento.

Para poder conocer si existen diferencias en el manejo del MAC entre la cepa susceptible a suero humano y la resistente, adaptamos amibas a suero humano. Al probar la viabilidad de la

cepa resistente (R) en comparación con la susceptible (S) con concentraciones crecientes de suero hasta 50% observamos una viabilidad entre 5 y 8 veces mayor en la cepa (R). Esta viabilidad es similar a la reportada en la literatura (Calderón y Tovar, 1986). Está descrito también que una vez que las amibas alcanzan la resistencia al 40% de suero, ésta se mantiene durante un mes aproximadamente sin requerir la presencia del 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.

Para la realización de los diferentes ensayos en este trabajo fue necesario tener suero humano con el complemento inactivado totalmente. Al deplementar el suero por el método comúnmente usado de calentamiento a 56 °C por 30 min, no encontramos una inactivación completa. Al emplear este suero como control negativo en ensayos de viabilidad mantenía su efecto amebicida y al correrlo en inmunoelectroforesis no se observaba un rompimiento completo del C3. Está reportado que el tratamiento con Zymosan no rompe completamente al C3 humano, por lo que decidimos tratar el suero humano repetidas veces con este polisacárido y de esta forma logramos un rompimiento completo del C3 y obtuvimos un suero sin efecto lítico sobre los trofozoítos.

En células nucleadas como los neutrófilos uno de los mecanismos de resistencia al MAC es la endocitosis y exocitosis del complejo (Morgan *et al.*, 1984). La posibilidad de que la amiba empleara un mecanismo similar para resistir el ataque del complemento la investigamos por microscopía inmunoelectrónica con

anticuerpos de cabra anti C5 humano y anti IgG de cabra con oro coloidal. Por esta metodología se observó al complejo C5b-9 asociado a la superficie de la amiba en el tiempo 0 min e internalizado en vesículas en el tiempo 5 min. La interpretación de estos resultados tiene el problema de que no se pudo demostrar que la unión de los anticuerpos es específica ya que también se observaron partículas de oro coloidal asociadas a la superficie celular en el caso del control donde se empleó suero de cabra no inmune. Esto se pudo deber a que la amiba fija inespecíficamente diversas moléculas. Para evitar esto lo que se tendría que hacer es seguir el destino del MAC con alguno de sus componentes marcado directamente con oro y no a través de anticuerpos. La presencia de los complejos dentro de vesículas en los trofozoitos sólo se observó en los incubados con el anti C5 y no en el control con suero de cabra, lo que puede indicar que aunque la amiba haya fijado en forma inespecífica inmunoglobulinas G presentes en el suero de cabra, éstas no fueron internalizadas.

Posteriormente estudiamos el curso temporal de la unión del  $^{125}\text{I}$ C9 a las amibas de las cepas (R) y (S) incubadas con suero y este componente. Al comparar la fijación del componente C9 $^{125}\text{I}$  a amibas de ambas cepas se observó un tiempo y cinética de fijación similares en ambos casos. Hubo una ligera tendencia a una mayor fijación de cpm en el caso de la cepa (R). Esto se debe a que sobreviven más amibas de la cepa (R) después de la incubación con el suero ya que el número de moléculas de C9 que se une por amiba es muy similar en los dos casos.

La localización de los complejos C5b-9 en los trofozoitos la investigamos también mediante técnicas de fraccionamiento

subcelular de E. histolytica. Por el método de Aléy encontramos  $^{125}\text{IC9}$  asociado a las cuatro fracciones subcelulares de trofozoitos de ambas cepas. En la cepa (R) el mayor porcentaje de cpm se encontró en membranas internas y en la cepa (S) en membranas no vesiculadas y residuo.

El fraccionamiento de acuerdo a Rosenberg y Gitler mostró un resultado diferente al anterior. En este caso encontramos una distribución igual de cpm en las dos cepas: las fracciones que presentaron el mayor número de C9 asociado fueron las enriquecidas con membrana plasmática, principalmente la 14.

La diferente asociación del  $^{125}\text{IC9}$  a las fracciones de E. histolytica obtenidas por el método de Aléy puede interpretarse como que en la cepa (R) el complejo se asocia a vesículas para ser exocitado y así resistir su ataque, mientras que en la cepa (S) no se forman estas vesículas con los complejos al interior y el C9 queda en las membranas no vesiculadas y residuo. Sin embargo, en las fracciones obtenidas por el método de Rosenberg y Gitler la localización del C9 fue la misma en las dos cepas en la membrana plasmática.

La posibilidad de que la ameba internalice rápidamente los complejos de ataque a membranas y regresen a la superficie celular podría implicar una inactivación de los complejos después de internalizados y salida de la célula. Una forma probable de inactivación es la degradación de alguno de los componentes del complejo. Al probar el efecto de extractos amebianos de las dos cepas sobre los componentes C8 y C9 encontramos que no son susceptibles a la degradación por las proteasas de amebas (S) y (R). Para el caso del C8 podría esperarse este resultado ya que

está reportado en la literatura (Steckel et al, 1980) que esta proteína es muy resistente a la proteólisis y desnaturalización. El C9, en cambio, es susceptible a la ruptura por proteasas como la  $\alpha$  trombina que lo rompe en dos fragmentos, C9a y C9b (Biesecker et al, 1981).

La resistencia de Entamoeba histolytica a una de las defensas del hospedero como lo es el complemento representa un factor importante en la invasividad de este parásito. Se conoce una de las formas como la amiba activa al sistema del complemento, pero no se conoce la forma como resiste su ataque.

En este trabajo exploramos algunos aspectos de la interacción de E. histolytica con el complejo de ataque a membranas del complemento (MAC), en particular, con los dos últimos componentes C8 y C9.

No encontramos claras diferencias entre la cepa resistente y la susceptible en el manejo del MAC. Por microscopía inmunoelectrónica se vió internalización del componente C9 y por la técnica de fraccionamiento subcelular de E. histolytica de acuerdo a Aley asociación a membranas no vesiculadas y a membrana plasmática en el caso de la cepa (S) y a membranas internas y plasmáticas en la cepa (R). Los extractos amibianos de las dos cepas no degradaron a los componentes C8 y C9.

#### **Efecto lítico de sueros de diferentes especies sobre trofozoitos de Entamoeba histolytica**

La amibiasis experimental se inició en forma simultánea al descubrimiento de E. histolytica cuando Lösch en 1875 encontró amibas en el colon de un paciente con disentería. El principal



objetivo de la amibiasis experimental es la comprensión de los mecanismos involucrados en esta enfermedad. Las primeras investigaciones sobre amibiasis fueron hechas en perros y gatos. Debido a la dificultad en el manejo, falta de uniformidad y número insuficiente de animales, se sustituyeron por roedores. Sin embargo, no existe ningún modelo animal que imite el ciclo completo de la enfermedad tal como se observa en los humanos. En general, los animales apropiados para la amibiasis intestinal experimental son diferentes de los usados para la amibiasis hepática. Como se observa a continuación existen diferencia en la susceptibilidad de diferentes animales a la amibiasis.

La rata se considera un animal naturalmente muy resistente a la amibiasis. Se han utilizado como modelos de amibiasis intestinal empleando ratas destetadas que aún no tienen bien desarrollado el sistema inmune o inóculos de amibas asociadas a bacterias, lo que puede enmascarar el fenómeno real. El suero de rata tiene un efecto lítico muy elevado sobre los trofozoitos de E. histolytica (90% de lisis a una concentración del 50%, fig. 11A) lo que nos habla de que este efecto es un factor importante en la resistencia de la rata a la amibiasis.

El cobayo ha sido usado como modelo de amibiasis intestinal y el desarrollo de abscesos hepáticos ha resultado difícil. Observando el efecto lítico del suero de cobayo sobre las amibas encontramos un 70% de lisis con una concentración de suero del 50% (fig. 12B) lo que correlaciona con el hecho de que el cobayo es susceptible a la amibiasis intestinal en donde los trofozoitos no se enfrentan directamente al suero, mientras que es resistente a la amibiasis hepática en donde las amibas para invadir órganos

como el hígado deben pasar por torrente sanguíneo y resistir el ataque de anticuerpos y complemento. La imposibilidad del establecimiento de la amibiasis en el hígado del cobayo correlaciona con el efecto lítico del suero de este animal.

El hamster se considera susceptible a la amibiasis y es uno de los animales más empleados como modelo experimental de amibiasis hepática. El efecto lítico del suero de hamster sobre E. histolytica presenta valores por debajo del suero de cobayo y esto se relaciona con el hecho del establecimiento de la amibiasis hepática. Otros animales como el conejo y el ratón que presentan los menores efectos líticos no han podido ser empleados como modelos de amibiasis ya que su alta susceptibilidad a la amibiasis provoca la muerte del animal.

Probamos también el suero del chivo y el carnero, pero sobre éstos no han sido empleados como modelos de amibiasis.

La única excepción a la correlación entre resistencia a la amibiasis y efecto lítico del suero es el hombre cuyo suero presenta un efecto lítico muy alto y sin embargo el ser humano es susceptible a la amibiasis.

La amibiasis representa un gran problema de salud a nivel mundial y en particular para nuestro país. El conocimiento de todos los mecanismos desplegados por Entamoeba histolytica durante el desarrollo de la enfermedad son la base para la obtención de medios preventivos o curativos. La definición de los mecanismos que permiten a la amiba la invasión de tejidos es tema de estudio en muchos laboratorios del mundo y uno de estos mecanismos es la resistencia a uno de los sistemas de defensa del

huésped como lo es el complemento. En este trabajo se buscaron mecanismos probables de la resistencia de la amiba al ataque del complejo de ataque a membranas. Con las metodologías empleadas se pudieron conocer algunas de las formas de interacción de E. histolytica con el MAC, sin embargo, no se pudo plantear ningún mecanismo preciso. Queda por averiguar otros caminos probables donde se involucran mecanismos ya demostrados para bacterias y diferentes células nucleadas.