

PRESENCIA DE CD 59 EN *Entamoeba histolytica* Y SU PAPEL PATOGENÉTICO EN CULTIVO.

Villalobos, GF¹, Ventura, JJ², Muñoz-Ortega MH², Campos-Rodríguez R³, Quintanar SJL⁴ y Salinas ME⁵.

- 1.- Depto. Biología, Centro de Ciencias Básicas (CCB), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), correo electrónico: faby_rvg@hotmail.com
- 2.- Depto. Morfología, CCB, UAA, correo electrónico: jventur@correo.uaa.mx, tel: 9108425, fax es el mismo.
- 3.- Depto. De Bioquímica, Lab. De Inmunología, Escuela Superior de Medicina, IPN, citli@prodigy.net.mx,
- 4.- Depto. De Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, UAA, jlquinta@correo.uaa.mx
- 5.- Depto. De Microbiología y Parasitología, Centro de Ciencias Básicas, UAA, emsalin@correo.uaa.mx

INTRODUCCION. La amibiasis es causada por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), que es un protozooario parásito de humanos que infecta alrededor de 500 millones de personas anualmente y que de ellos 110 000 mueren por complicaciones intestinales y extraintestinales (Viasus, P. y col. ,2004). Es un parásito de distribución mundial, y un serio problema de salud pública (Pinilla y col. 1999), sin embargo, sólo una minoría de individuos infectados con *E. histolytica* desarrollan invasión del colon con posibles complicaciones extraintestinales como el absceso hepático (Salata y Ravdin 1986), *E. histolytica* posee una gran naturaleza destructiva tisular (Pérez-Tamayo y cols, 1994). El sistema del complemento protege al huésped contra los organismos invasores. El CD59 es un factor regulador que impide la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) de los invasores (Parslow, G y col., 2002) y previene la formación del canal de iones por el complejo C5b-8 (Farkas, 2002). La amibiasis tiene una gran variedad de cuadros clínicos que van desde el portador asintomático hasta formas severas como abscesos hepáticos, colitis amibiana fulminante, ameboma y absceso cerebral (Pinilla y col. 1999; Tsutsumi y Martínez-Palomo 1988; Medina, 2005). Por otra parte, los antiamebianos como el metronidazol en combinación con emetina o dehidroemetina son el tratamiento de elección para erradicación de la enfermedad amibiana (Muñoz, O 1994). Estos medicamentos contienen sustancias que afectan el metabolismo de la amiba por lo tanto pueden inducir a la muerte del parásito.

OBJETIVO. Identificar la presencia de CD59 en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en diferentes condiciones de cultivo y medir su posible efecto en la patogenicidad.

METODOLOGIA. Es un trabajo experimental, analítico y prospectivo el cual consistió en identificar la presencia de CD59 en *E. histolytica* mediante técnicas inmuncitoquímicas a nivel de microscopia de luz y electrónica de transmisión y su papel patogenético en cultivo y en lesiones intestinales amibianas.

RESULTADOS. In Vitro CD59 se expresa en *E. histolytica* crecida en medio Diamond normal (Fig 1B) y disminuye su expresión en amibas crecidas en medios adicionados con Diodoquin y Flagyl (Fig 1C). Los trofozoítos crecidos en medio de cultivo adicionados con Diodoquin y metronidazol no inducen amplias lesiones en hígado de hámster pero manifiestan ligera positividad a CD59 (Figs 1D y E). Las amibas localizadas en las lesiones de colon presentaron reactividad a la proteína CD59, la intensidad fue variable, desde + hasta +++ (Fig 1F) otras zonas de intestino presentaron trofozoítos solitarios con reactividad intermedia en una amplia zona de necrosis con detritus de células inflamatorias y de la mucosa. Microscopia electrónica de transmisión. Los trofozoítos de *E. histolytica* se identificaron adecuadamente a nivel del microscopio electrónico de transmisión

(MET) en las muestras de tejido de intestino grueso fijadas con formaldehído al 10% y se caracterizaron por la conservación de sus componentes ultraestructurales como las vacuolas de diferentes tamaños y conservación moderada de la antigenicidad de sus moléculas, así, se permitió la identificación de la proteína CD59 mediante la técnica de inmuno-oro de 20 nm que estuvo localizada principalmente en las membranas celulares (flechas en Figs 1G y H) y escasamente en las membranas internas (doble flecha Figs 1G y H). Finalmente, por western blot se identificó la protectina CD59 en lisados completos de trofozoítos, para comprobar su presencia (Fig 1I).

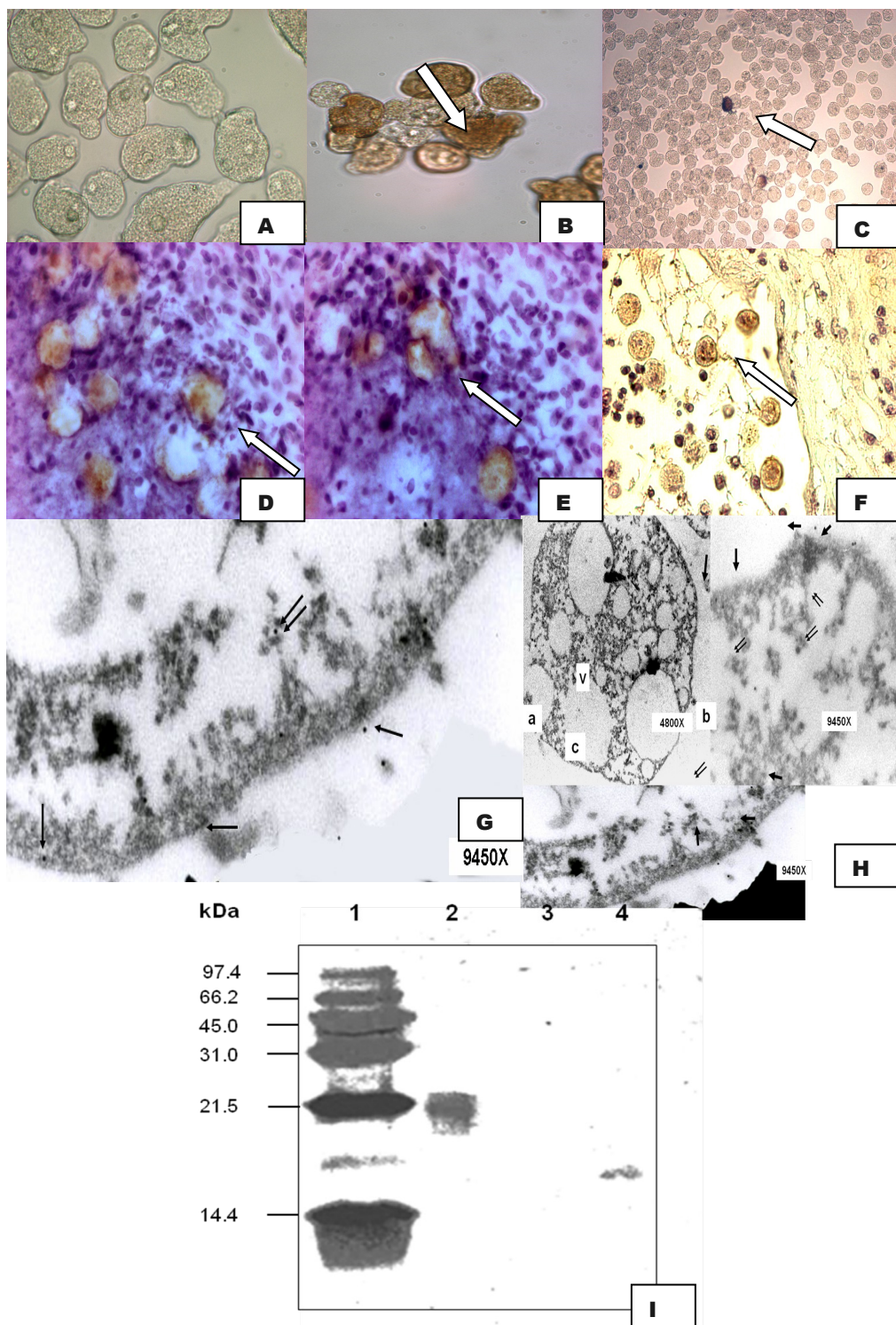


Figura 1: **A)** Amibas en cultivo normal de Diamond (testigo 400X), **B)** alto porcentaje de trofozoítos con positividad a CD59 (flechas) (1:100). **C)** amibas tratadas con antiamebianos (Flagyl y Diodoquin) muestran muy bajo porcentaje de positividad a CD59, 200X; **D)** Lesiones amibianas en hámster con trofozoítos tratados con metronidazol; **E)** lesiones amibianas en hígado de hámster tratados con Diodoquin; **F)** Amibas en lesiones de colon humano con diferente positividad a CD59 (inmunoperoxidas 400X); **G)** Inmuno-oro (20 nm) para detectar CD59 en las membranas de trofozoítos en lesiones colónicas. **H)** Otra imagen de inmuno-oro para identificar CD59 en membrana celular (flechas) y en membranas internas (doble flecha). **I)** inmunoblot para identificar CD59 en lisado total de amibas: carril 1 marcadores de peso molecular; carril 2) extracto amibiano; carril 3 control negativo; y carril 4 control positivo (extracto de membrana de leucocitos humanos).

DISCUSION Y CONCLUSION. El aspecto más destacado de este trabajo fue demostrar que los trofozoítos de *E. histolytica* tanto in vitro en modelo de hámster e in vivo en lesiones de colon humano presentan en su membrana una proteína antigénicamente similar la proteína CD59 ó protectina humana, revelada por técnicas inmunoperoxidas a nivel de microscopia de luz e inmuno-oro en microscopía electrónica de transmisión y por western blot en lisados completos de los trofozoítos. Previamente, in vitro Flores Romo et al., (1994) demostraron mayor presencia de la protectina en trofozoítos de *E histolytica* de alta virulencia con respecto a otra cepa de menor virulencia. El hecho de que los trofozoítos se observaron completos y sin aparente daño en las lesiones amibianas, sugiere que las amibas a pesar de estar rodeadas de líquido tisular, que puede contener moléculas del complemento, no son dañadas por éste y avanzan en su proceso de daño a los tejidos del huésped. **Conclusión,** *E. histolytica* que invade el colon humano presenta CD59 en sus membranas el cual puede proceder del exterior, ó ser sintetizado por la amiba. En ambos casos, la presencia de CD59 puede ser un mecanismo importante de protección contra la acción del MAC y por lo tanto un mecanismo de patogenicidad.

REFERENCIAS

- [1] Farkas, I. J. *Physiol* 539 (2002) 537-545.
- [2] [Flores-Romo L, Tsutsumi V, Estrada-Garcia T, Shibayama M, Aubry JP, Bacon KB, Martinez-Palomo A](#) *Trans R Soc Trop Med Hyg*.88(1994)116-7.
- [3] Medina F. Tesis Maestría, ESM, IPN. (2005)12-15.
- [4] Muñoz. O. Espectro clínico de la amibiasis en niños. (1994)110-120
- [5] Parslow G. T., Stites P.D., Terr I.A., Imboden B.J. *Inmunología básica y clínica*. (2002).210
- [6] Pérez-Tamayo R., I. Becker, I. Montfort y R. Pérez Monfort. Amibiasis Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. (1994) 155-187.
- [7] Pinilla R. A., López P. M. y Marín G. E. Programa de Actualización Médica Permanente. 41(1999) 2-10.
- [8] Salata, R. A. y J. I. Ravdin. *The Journal of Infectious Diseases*. 154(1986) 19-26.
- [9] Tsutsumi, V. y A. Martínez-Palomo. *American Journal of Pathology*. 130(1988) 112-119.
- [10] Viasus P.D., Pinilla E.A., López C.M., *Salud pública*, 6 (2004)80-96,