



79
26j

*Universidad Nacional Autónoma
de México*

FACULTAD DE QUIMICA

ANTIGENOS DE Entamoeba histolytica



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Trabajo Monográfico de Actualización

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Rosa María Sánchez Sotres

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1988



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

I. Introducción.

II. Generalidades de *Entamoeba histolytica*.

1. Antecedentes históricos.
2. Clasificación.
3. Ciclo biológico.
4. Amibiasis.

III. Topología y caracterización de los antígenos amibianos.

1. Antígenos de superficie.
 - A. Proteínas.
 - B. Carbohidratos.
 - C. Lípidos.
2. Antígenos citoplasmáticos.
3. Exoantígenos.
4. Material antigénico adquirido pasivamente.

IV. Antígenos amibianos y tipo de respuesta inmune.

1. Clases y subclases de anticuerpos.
2. Respuesta inmune celular.

V. Fuentes de caracterización de los antígenos amibianos empleados en el diagnóstico de la amibiasis.

VI. Antígenos amibianos y fisiopatología de *E. histolytica*.

VII. Antígenos utilizados para inmunoprotección.

VIII. Conclusión.

IX. Bibliografía.

1. INTRODUCCION.

El estudio de los antígenos de *E. histolytica* ha tenido como objetivo comprender las interacciones huésped - parásito, y obtener los conocimientos que lleven a desarrollar métodos de diagnóstico más rápidos y confiables, así como crear una vacuna que proteja a los individuos en riesgo de contraer amibiasis. Sin embargo, esta información es muy amplia y controvertida por lo que una revisión podría dar la pauta para seguir el camino de la investigación.

Para estudiar la participación del sistema inmune en la amibiasis, es necesario definir los antígenos de *E. histolytica*, que son reconocidos durante la infección. Los estudios inmunológicos hechos con antígenos amibianos derivados de cultivos no axénicos eran difíciles de interpretar, debido a los contaminantes provenientes de bacterias o parásitos (8,63,69,99,113,114,128,184). En 1961, Diamond publica la técnica del cultivo axénico de *E. histolytica* (41), y en 1968, comunica la forma de producirlo masivamente (42). Ese mismo año, Thompson et al preparan y estandarizan antígenos amibianos provenientes de este tipo de cultivo (193).

El material antigénico así obtenido es heterogéneo y está formado por varios compuestos de diversa naturaleza química: proteínas, carbohidratos, lípidos, etc. Esta mezcla de antígenos recibió el nombre de histolyticina.

La definición de los antígenos de amiba, se hará a partir de los estudios hechos con trofozoitos de *E. histolytica*, cultivados en medio axénico.

II. GENERALIDADES DE *Entamoeba histolytica*.

1. Antecedentes históricos.

La existencia de la amibiasis podemos situarla, desde la aparición del nombre en la Tierra. Sin embargo, no es sino hasta el siglo XIX cuando empieza a estudiarse el parásito causante de esta enfermedad.

Fedor Lösh, médico ruso publicó la primera descripción de un caso de disentería amibiana recurrente en 1875. Este estudio abarcó el análisis del contenido de la materia fecal del paciente y el material de la autopsia, así como la descripción de la amiba incluyendo su estructura, tamaño, movilidad, núcleos, vacuolas y elementos intracitoplásmicos tales como células rojas. Además, llevó a cabo experimentos en los que administró la materia fecal del paciente a cuatro perros.

Lösh llamó a la amiba *Amoeba coli*, y concluyó que la disentería no era debida a este organismo, pues el curso de la enfermedad se mostró distinto en su paciente y en los animales de experimentación.

En 1883, Koch observó la presencia de amibas en cortes histológicos provenientes de pacientes con disentería y complicaciones de absceso hepático, y pensó que esto pudiese tener algún papel en la patogénesis de la enfermedad.

Councilman y Lafleur, reconocieron la amibiasis como entidad clínica, debida a un agente específico que llamaron *Amoeba dysenteriae*. Además introdujeron los términos de "dysenteria amibiana" y de "absceso hepático amibiano".

En 1893, Quinck y Roos demostraron los quistes de la amiba y observaron que estas formas vegetativas eran capaces de producir disenteria en animales de experimentación, y notaron la gran resistencia de los quistes comparada con la fragilidad de los trofozoitos, lo que abrió el camino a la elucidación del modo de transmisión de la disenteria amibiana.

En 1903, Huber detalló el número de núcleos de los quistes de la amiba. En ese mismo año Schaudinn, brillante protozoólogo asignó los términos de *Entamoeba histolytica*, para la especie patógena, debido a su capacidad para destruir los tejidos; y *Entamoeba coli* para la especie no patógena, la cual es un comensal inocuo del intestino grueso.

En 1913, Walker y Bellars demostraron en voluntarios de la prisión de Manila, que *E. histolytica* no siempre producía sintomatología y confirmaron que el hombre también podía ser infectado por los quistes.

fueron desarrollados numerosos medios de cultivo para *E. histolytica* *in vitro* entre los que podemos mencionar el de Musgrave y Clegg (1904), el de Boeck y Urboniav, llamado "Loeche's egg-serum" (1925), el de Shafer y colaboradores (1948) y el de Pan (1960). Finalmente Diamond en 1961, elaboró un cultivo libre de otros asociados, el cual ha facilitado las investigaciones bioquímicas e inmunológicas de este protozoo. (60, 77, 88, 117, 151).

2. Clasificación.

E. histolytica pertenece al sub-reino Protozoa (es un organismo unicelular), phylum Sarcodistigophora, subphylum Sarcodina (se mueve por pseudópodos y tiene reproducción asexual por fisión binaria), clase Rhizopoda (forma quistes) y al género *Entamoeba* (el trofozoito tiene un núcleo con un pequeño cariosoma central y una membrana nuclear con gránulos de cromatina adyacente) (105, 151).

3. Ciclo biológico.

El ciclo de vida de este parásito es relativamente sencillo. No existen estadios sexuales ni huéspedes intermediarios. El quiste o forma infectiva (5 - 20 μ m), es ingerido y posteriormente lleva a cabo el proceso de exquistación tanto en el intestino grueso como en el delgado. El núcleo se divide en ocho (metaquistes) y por división citoplásmica se originan ocho trofozoitos o formas vegetativas (10 - 60 μ m).

Los trofozoitos residen en el intestino grueso, barrera que puede ser destruida y ocurrir la invasión de diversos tejidos (amibiasis extraintestinal); o bien, en condiciones no propicias el organismo se enquista y es excretado (amibiasis intestinal) (151, 196).

4. Amibiasis.

La amibiasis es decir, la condición de hospedar a *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas, es clasificada por la Organización Mundial de la Salud de la siguiente manera (206):

1.- Asintomática:

2.- Sintomática

A).- Amibiasis intestinal.

- **Disentería amibiana aguda.**
- **Colitis no disentérica.**
- **Ameboma.**
- **Apendicitis amibiana.**

B).- Amibiasis Extra-intestinal.

- **Hepática.**
- **Cutánea.**
- **En otros órganos: pulmones,**
cerebro,
bazo.

III. TOPOLOGIA Y CARACTERIZACION DE LOS ANTIGENOS AMIBIANOS.

1. Antígenos de superficie.

Los antígenos de superficie de trofozoitos de *E. histolytica* deben ser los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune. La existencia e importancia de estos antígenos ha sido demostrada por la inmovilización de los trofozoitos por suero inmune (15,16,21,207), por la reacción específica de anticuerpos anti-amiba total y anti-lipopeptidofosfoglicana (LPFG) con trofozoitos intactos, revelada por inmunofluorescencia, (15,17,23,63,61,137), y por la lisis de los mismos a través de la vía clásica y alterna del complemento (24,76,134,180).

Para estudiar los antígenos de la cubierta externa, se marcaron las proteínas de superficie de amibas intactas con 125I. En algunas experiencias se trabajó con homogenizados totales o con la membrana citoplasmática proveniente de estas preparaciones marcadas.

Actualmente la identificación y purificación de los antígenos de superficie, se ha facilitado por el uso de anticuerpos monoclonales específicos (107,126,136,161,194).

a) Proteínas.

Los antígenos de superficie de naturaleza proteica de *E. histolytica*, son difíciles de determinar, ya que la mayoría de los reportes están dados en proteínas provenientes de

extractos totales acuosos. Estos extractos se obtienen por sonicación (34,103,104,170,176,193), o por un proceso de homogeneización (7,13). Los resultados de estas experiencias, señalan que la composición antigénica de la amiba es muy variada. La causa de esto, es el empleo de diferentes cepas de amibas, con o sin adición de inhibidores de proteasas y el uso de diversas técnicas inmunológicas. En estas condiciones, Krupp hipotetiza que la anatomía básica de las cepas amibianas HK-9, y NIH:200, está constituida por 14 proteínas (104). Chang et al, encuentran por su parte un mínimo de 20 antígenos para la cepa HK-9 y un máximo de 32 antígenos para la cepa Hf-31 (34).

Con el fin de obtener material antigénico más homogéneo, los extractos acuosos de amiba fueron sometidos a fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular (7,13,34,103,104,170,176,193). Los perfiles de elución de estas muestras antigénicas, variaron de acuerdo a la longitud y diámetro de las columnas, al tipo de Sephadex empleado, a la concentración de las muestras aplicadas y a las condiciones de flujo establecidas. Los resultados del fraccionamiento mostraron de 3 a 5 fracciones; éstas tenían pesos moleculares que iban de 14.5 Kd a 850 Kd. En la mayoría de los casos las fracciones estaban constituidas por glucoproteínas. Las fracciones I, II y III fueron las más antigénicas, mientras que las IV y V no reaccionaban con los sueros inmunes específicos (103).

Los primeros en emplear inhibidores de la actividad proteolítica en los trofozoitos lisados, fueron Parkhouse et al. Ellos mismos marcaron con ^{125}I , las proteínas de superficie de las cepas HK-9 y HM-2 de *E. histolytica* y aislaron de ambas cepas una glucoproteína mayor de superficie de 81 kD. El extracto total de *E. histolytica* de la cepa HK-9 marcada con ^{125}I , fue pasado por una columna de Sepharose Con-A. La inmunoprecipitación con un suero de paciente con AHA del material lavgado de la columna, demostró tres bandas proteicas de 20 kD, 30 kD y 150 kD (140). Empleando la misma técnica de Sepharose Con-A y el marcaje por ^{125}I se aislaron 6 glucoproteínas de *E. histolytica* de la cepa HM1:IM88 y 4 de la cepa HK-9. De estas glucoproteínas 3 estuvieron presentes en ambas cepas: las de 35 kD, 56 kD y 67 kD. (127).

El marcaje selectivo de las proteínas de superficie externa con ^{125}I , seguido del aislamiento por Concanavalina A (Con-A) de fragmentos de membrana plasmática, permitió a Aley et al, la identificación por autorradiografía de 12 glucoproteínas, cuyos pesos moleculares iban de 12 kD a 200 kD (5).

Aust-Kettis et al, sin separar la membrana citoplasmática y marcando *E. histolytica* de las cepas HK-9 y NIH:200 con ^{125}I , pudieron identificar 12 polipéptidos por autorradiografía del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida -dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) del homogeneizado amibiano. El peso molecular de las 9 bandas principales se encontraron entre 9 kD y superior a los 150 kD (13).

Joyce et al, trabajaron con la cepa HM1:IM85 de *E. histolytica*. Las amibas fueron cosechadas en presencia de inhibidores de proteasas. El SDS-PAGE del extracto acuoso total, reveló por lo menos 30 bandas proteicas. Gracias a la iodina-ción competitiva de lactoperoxidasa se encontró que 6 de las bandas proteicas eran de superficie. Los pesos moleculares de estas proteínas, fueron de 19.5 kD, 23 kD, 24.5 kD, 37 kD, 90 kD y 170 kD. Por unión específica a Con-A, se demostró que las proteínas de 37 kD, 90 kD y 170 kD eran glucoproteínas. La inmunotransferencia del extracto soluble, reveló que al menos 3 proteínas eran reconocidas con mayor frecuencia por el suero proveniente de 11 pacientes con diagnóstico AHA. De estas 3 proteínas, las de 37 kD y 90 kD eran glucoproteínas de superficie (83). Aust-Kettis et al, usando una mezcla de 8 sueros humanos anti-amiba, lograron que estos reconocieran por inmunotransferencia 7 polipéptidos antigénicos (13). De estos antígenos los de 37 kD y 88 kD son parecidos a las proteínas de superficie de 37 kD y 90 kD, reconocidos por los sueros de los pacientes estudiados por Joyce et al.

Los anticuerpos monoclonales han permitido definir antígenos de superficie de naturaleza proteica de *E. histolytica*. Ortiz-Ortiz et al, reportaron que por anticuerpos monoclonales, fue posible reconocer un determinante antigénico de superficie de la membrana de *E. histolytica* (136).

Torian et al, usando anticuerpos monoclonales identificaron, caracterizaron y purificaron una glucoproteína de superficie de 96 Kd, la cual reaccionó con un suero proveniente de pacientes con AHA (194).

Por otra parte han sido reconocidas proteínas de superficie que participan en la adhesión *in vitro* de los trofozoitos a eritrocitos humanos, células epiteliales, y células ováricas de hamster (10,33,131,152,161,165). Este grupo de proteínas han sido identificadas por diferentes métodos y su pesos moleculares han sido de 112 Kd (10,131), 170 Kd (144) y 220 Kd (126,161). A la proteína de 112 Kd se le ha llamado adhemiba.

b) Carbohidratos.

Hasta la fecha se ha estudiado poco la composición de moléculas polisacarídicas en los protozoarios. Se han descrito polímeros de galactosa tanto en *Trypanosoma cruzi* (203), como en *Crithidia fasciculata* (30,61,62).

Korn et al, aislaron y caracterizaron una molécula polisacarídica que denominaron lipofosfoglicana. Esta molécula constituye el 31% de la membrana plasmática de *Acanthamoeba castellanii* (14,39,93).

La membrana plasmática de los trofozoitos de *E. histolytica*, tiene un grosor aproximado de 10 nm. Esta membrana se encuentra cubierta en su parte externa por el glucocálix, el cual está constituido por carbohidratos (109,147). Martínez-Palomo et al, demostraron que la cubierta de los trofozoitos contenía residuos de manosa o glucosa, ya que se aglutinaban en presencia de Con-A (119).

Por otro lado Ortiz-Ortiz et al, encontraron que las amibas vivas activaban la vía alterna del complemento, lo que supone la existencia de carbohidratos sobre la superficie de los trofozoitos (134).

Por medio de hidrólisis acética y precipitaciones alcohólicas (48,187), se obtuvieron polisacáridos totales de amiba. La mezcla de antígenos, reaccionó con el suero de conejo inmunizado con trofozoitos de amiba, pero fue incapaz de reaccionar con el suero de pacientes con AHA (78,10).

Usando la técnica de fenol-agua, se extrajo de *E. histolytica* de la cepa HK-9, un complejo polisacárido antigénico heterogéneo (80), de superficie (81). El análisis químico de esta molécula, demostró estar constituida por carbohidratos en un 85%, por péptidos en un 8% y el resto por lípidos y fosfolípidos. Este compuesto recibió el nombre de lipopeptidoglicana (LPG). Por la localización y composición de la LPG, recuerda a la lipopolisacárida de superficie de *A. castellanii* (38,39). La LPG reacciona con los sueros provenientes

de pacientes con AHA y presenta reacción cruzada con un amino-
glicofosfolípido extraído de *E. histolytica* por el grupo de
Gitler et al (59).

Posteriormente, se purificó de la LPS proveniente de *E. histolytica* de las cepas Hk-9 y HM1:IMSS, un antígeno rico en polisacárido (ARP) libre de glucógeno. Este antígeno demostró ser igual en las dos cepas y estar constituido por glucosa, galactosa y xilosa (82). El ARP reaccionó con los sueros de pacientes con AHA y su corrimiento en SDS-PAGE fue similar al de los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram-negativas. Esto demuestra, que probablemente el ARP al igual que los LPS son moléculas heterogeneas en cuanto a su peso molecular, ya que están constituidas por unidades oligosacarídicas de repetición con diferentes grados de longitud. Los estudios por microscopía electrónica, demostraron que el ARP, era un complejo polisacarídico de superficie (82).

c) lípidos.

Los lípidos en general son pobres inmunógenos y hasta la fecha, sólo Gitler et al, han identificado en *E. histolytica* un lípido altamente inmunogénico. Los estudios preliminares indican que se trata de un aminoglicofosfolípido, el cual representa aproximadamente el 3.8% de los lípidos totales ambientales (59). Al purificar los anticuerpos específicos, demostraron que no reaccionaban con los lípidos totales del medio de

cultivo; sin embargo estos anticuerpos presentaban reacción cruzada con la LPFG. Esto hace suponer, que además de la fracción glucosídica, la fracción lipídica de la LPFG constituye un epítopo propio.

2. Antígenos citoplasmáticos.

Los antígenos citoplasmáticos corresponden en general a todos aquellos obtenidos de las diferentes fracciones proteicas que no fueron reveladas por el marcaje de superficie de las membranas externas. Por otro lado, hay una serie de antígenos citoplasmáticos bien definidos, cuyo origen está en los organelos del citoplasma, tales como las fracciones lisosomal y ribosomal.

La presencia de lisosomas, se puso en evidencia mediante técnicas citoquímicas de alta resolución. Por estos métodos se sabe que tales organelos son vesículas de naturaleza membranosa que contienen fosfatasa ácida (169,195).

Las fracciones lisosomal y ribosomal se obtuvieron a partir de un homogeneizado de trofozoitos *E. histolytica*. Este fue sometido a ultracentrifugación diferencial y ambos organelos se encontraron en las llamadas primera y segunda fracciones particuladas respectivamente (9).

La fracción lisosomal fue caracterizada por un lado, midiendo la actividad de fosfatasa ácida y por otro observándola por microscopía electrónica (169). Esta fracción se probó con sueros provenientes de pacientes con AHA y resultó la más anatógena, ya que demostró varias bandas de precipitación en inmunodifusión en agarosa. Estos dos complejos antígenicos se han empleado sobre todo como antígenos inductores de protección (135).

La obtención de proteínas ribosomales de *E. histolytica*, demostró la presencia de proteínas básicas y ácidas cuyos pesos moleculares iban de 14 Kd a 112 Kd. A través de este estudio se encontró que la amiba carecía de una proteína de peso molecular de 54 Kd; ésta normalmente se encuentra en todos los sistemas procarióticos y eucarióticos estudiados hasta la fecha y se desconoce el significado de su ausencia en *E. histolytica* (201).

3. Exoantígenos.

Los antígenos liberados al medio (productos metabólicos) por *E. histolytica*, trataron de ser demostrados por medio de anticuerpos específicos producidos en conejos, sin embargo esto no fue posible ya que las pruebas inmunológicas empleadas fueron negativas (190).

Bos et al, demostraron que la citotoxicidad producida por una toxina presente en la membrana citoplasmática, que puede ser excretada al medio, es capaz de ser inhibida por el suero inmune y un factor no inmune del suero (18,19). En este caso se demostró en forma indirecta que la exotoxina era capaz de inducir una respuesta inmune de tipo humoral; sin embargo no se demostraron estos anticuerpos específicos. La exotoxina en realidad es un complejo proteico con un punto isoelectrico entre 4.5 y 5 y está relacionada con otra serie de proteínas citoplasmáticas con actividad de toxinas cuyos pesos moleculares van de 25 a 35 Kd (45). Una de las toxinas, con peso molecular de 30 Kd, aparentemente está relacionada con una lectina; e induce la protección de anticuerpos específicos y probablemente sea la misma enterotoxina descrita por Lushbaugh (110,120).

Por otro lado hay evidencias de que se eliminan al medio una serie de sustancias que intervienen en la patogenicidad de la ameba (ver antígenos amebianos y fisiopatología de *E. histolytica*.)

4. Material antigénico adquirido pasivamente.

El cultivo axénico de *E. histolytica*, está suplementado por suero bovino. El lavado exhaustivo de los trofozoitos cultivados de esta manera, no elimina de ellos la contaminación de las proteínas de este suero.

En 1980, dos grupos demostraron por inmunoelectroforesis e inmunofluorescencia, la presencia de anticuerpos anti-albúmina bovina en el suero de conejos inmunizados con trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en medio axénico (50,129). Los títulos de estos antisueros disminuyeron, pero no desaparecieron aun cuando se lavaran exhaustivamente las amibas. Rivera et al (159), al revelar por inmunotransferencia con un suero de conejo inmunizado con extracto total de *E. histolytica* de la cepa HK-9, los polipéptidos membranales de la misma cepa, encontraron por lo menos 5 antígenos contaminantes procedentes del medio de cultivo, siendo la albúmina sérica bovina (BSA) la más importante. La presencia de estos antígenos confirma que se encuentran fuertemente unidos a las proteínas de membrana, probablemente por uniones hidrófobas. De acuerdo a los datos obtenidos, los resultados sugieren que *E. histolytica* adsorbe e incorpora antígenos del huésped en la superficie de la membrana. Esto ha sido demostrado en *Schistosoma mansoni*, el cual adsorbe antígenos de grupo sanguíneo o del complejo principal de histocompatibilidad, como mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero (35,43).

II. ANTIGENOS AMIBIANOS Y TIPO DE RESPUESTA INMUNE.

1. Clases y subclases de anticuerpos.

Una respuesta serológica positiva a *E. histolytica*, puede indicar invasión por el parásito (70,72) y regularmente los títulos más elevados se presentan en las etapas iniciales de la enfermedad invasiva (84,95,100,116,141,183). La presencia de anticuerpos específicos puede persistir hasta por 11 años y hay evidencias de que el título de anticuerpos no correlaciona con el estado clínico del paciente.

La respuesta inmune humoral en los pacientes con amibiasis ha sido estudiada en todos los casos con antígenos solubles totales de *E. histolytica*.

Por otro lado estudios *in vitro* han demostrado que los trofozoitos de *E. histolytica* son capaces de agregar, ingerir y desprender a anticuerpos anti-amiba que se unen a su superficie. Esto sugiere un mecanismo de evasión del parásito a la respuesta inmune humoral del hospedero; por lo que la respuesta de anticuerpos que aparece en la amibiasis invasiva, no parece ser efectiva en la protección contra la enfermedad y la presencia de estos anticuerpos es solo un indicador de infección invasiva por *E. histolytica* (11,23,27).

El estudio de las inmunoglobulinas en el suero de los pacientes con amibiiasis, en tres regiones endémicas, mostró que la IgG está elevada, mientras que la IgM, se encontraba dentro de los límites normales (1,37,48,142). Por lo que respecta a la IgA el estudio hecho en México, demostró que esta inmunoglobulina estaba elevada. En todos los casos los estudios de inmunoglobulinas en suero fueron hechos por doble inmunodifusión radial; no se estudiaron inmunoglobulinas específicas anti-amiba, por lo que no se puede conocer con certeza si esta elevación de IgG es debida solamente a anticuerpos específicos anti-*E. histolytica*.

Por otro lado se han demostrado anticuerpos específicos anti-antígenos totales de amiba de las clases IgG (IgG1, IgG3 o IgG4) IgM e IgA en el suero de pacientes con amibiiasis (29,68,86,133,138,146).

La respuesta inmune humoral específica, contra un antígeno amibiano de naturaleza polisacáridica, fue estudiada por hemaglutinación indirecta en una serie de pacientes con diagnóstico de amibiiasis intestinal y AHA; los resultados demostraron que había respuesta específica hacia ese antígeno; sin embargo los títulos no tenían relación ni con el estado, ni con la evolución del padecimiento (82).

Las inmunoglobulinas de secreción, constituyen la primera línea de defensa contra agentes patógenos en las mucosas. En la amibiasis intestinal, se han encontrado coproanticuerpos anti-amiba en sobrenadantes de materia fecal. Por inmunoelectroforesis (18) de estos coproanticuerpos se encontraron bandas de precipitación, en las áreas de migración correspondientes a IgG, IgA y probablemente IgM (18). Se ha detectado IgA secretoria (S-IgA) anti-antígeno total y anti-LPF6 de *E. histolytica* en leche y en calostro humano respectivamente (3,4,6b).

En forma experimental se obtuvo S-IgA anti-LPF6 de *E. histolytica* en bilis de ratas inmunizadas intracecalmente (2).

La cinética de la respuesta inmune humoral local, anti-antígeno total y anti-LPF6 de *E. histolytica* fue estudiada en un modelo animal. Los resultados demostraron que ambos antígenos depositados en placas de Peyer de ratas, indujeron una respuesta inmune humoral local en la mucosa intestinal. Esta respuesta involucró IgM, IgG e IgA. Aun cuando se considera que la IgA debería ser la inmunoglobulina predominante en las mucosas, los resultados de este experimento señalan que las otras dos clases de inmunoglobulinas también están presentes y esto puede significar que las IgM e IgA también juegan un papel protector en la amibiasis (28).

Los niveles de IgE de sujetos que viven en zonas endémicas de amibiasis y en pacientes con amibiasis, ha sido estudiada por varios investigadores (20,58,69). Un grupo de ellos demuestran que los niveles séricos de IgE están elevados (37,158), mientras otros, los encuentran normales (51,60). Se ha demostrado que en otras infecciones por protozoarios, tales como giardiasis y trypanosomiasis, los niveles séricos de IgE son normales. Estos resultados permiten señalar que contrario a las infecciones por helmintos, la IgE sérica no se eleva en infecciones por protozoarios.

Se ha estudiado antígenos de *E. histolytica* inductores de una respuesta IgE específica. Un alérgeno proveniente de *E. histolytica* de la cepa HK-9, ha sido purificado parcialmente por filtración en Sephadex G-200 y por cromatografía en un gradiente de fuerza iónica en DEAE-celulosa. La respuesta de este alérgeno en el modelo murino, está aparentemente restringido al complejo principal de histocompatibilidad (205).

Dada la presencia de anticuerpos circulantes en la amibiasis invasiva, la generación de complejos inmunes sería importante en la patogénesis (167). Se ha demostrado la presencia de complejos inmunes en suero de pacientes con amibiasis (94,154); sin embargo no se han encontrado las manifestaciones de una enfermedad relacionada con la formación de estos complejos.

Por otro lado los niveles de complemento están elevados (48,154) y no disminuidos como sería de esperarse en una enfermedad por complejos inmunes.

Existe actividad amebicida, tanto en sueros de personas normales como de pacientes con diagnóstico de amibiasis. Esto se lleva a cabo por la activación del complemento por la vía alterna o clásica por trofozoitos completos o sus fracciones subcelulares (25,76,125,134,156,180,199).

Estudios con fracciones subcelulares de *E. histolytica*, demostraron que los componentes que activan el complemento, por la vía alterna se encuentran tanto en la superficie externa del trofozoito como en el citoplasma. Uno de ellos es una fracción homogénea de la membrana, llamada 4M y otras son de origen citoplasmático (125).

2. Respuesta inmune celular.

Tanto los estudios clínicos como los experimentales, señalan la importancia que tienen los mecanismos inmunes celulares en la amibiasis.

En los estudios donde se utiliza al hámster como modelo experimental, se demostró que al deprimir la inmunidad celular por medio de tratamientos con: esteroides, timectomía neonatal, esplenectomía, radiación, sílica, globulina anti-macrófago o

anti-linfocítica, se facilitaba la formación de AHA (52,53,54,56,57). En otros modelos se observó que había cierto grado de protección cuando se inmunizaba previamente con el bacilo de Calmette-Guerin o cuando había existido una infección previa por *Trichinella spiralis* (124).

Por otro lado, se encontró que los macrófagos de sangre periférica, las células de bazo y las células mononucleares peritoneales de hámster previamente inmunizados, mataban a los trofozoitos de *E. histolytica* (55). En otros estudios efectuados usando como modelo el ratón Nu/Nu, se comprobó que son los macrófagos quienes juegan un papel importante, limitando el desarrollo del AHA (189).

Numerosos estudios han examinado las vías aferentes de la inmunidad celular en humanos hacia *E. histolytica*. En experimentos *in vitro* varios autores encontraron que las proteínas solubles provenientes de amibas no inducían transformación blastoide de los linfocitos provenientes de individuos sanos (49,68,175). En contraste con estos trabajos, se ha demostrado que extractos crudos de *E. histolytica* presentan actividad mitogénica dependiente de macrófagos, sobre linfocitos T humanos de sangre periférica (12,40,165). Esta actividad no se observó sobre linfocitos B. La actividad mitogénica del extracto total de *E. histolytica* de las cepas HK-9 y NIH:200, se ha podido separar de una actividad antígeno específica, mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-200 (12. Además esta actividad mitogénica estuvo

relacionada con las fracciones proteicas que presentaban actividad de lectina, cuya acción se inhibe con N-acetil-D-galactosamina (165).

Los extractos crudos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IM59, estimulan la producción *in vitro* de linfocinas por leucocitos de sangre periférica de personas normales siendo el interferón gamma uno de los mediadores solubles que se produce durante ese proceso (168). Estas linfocinas, son capaces de activar a macrófagos de individuos sanos, para destruir trofozoitos de *E. histolytica* mediante un mecanismo dependiente de contacto celular y de los sistemas oxidativos y no oxidativos del macrófago e independiente de anticuerpo (164). Así mismo estos extractos crudos, son capaces de activar *in vitro* a linfocitos T provenientes de pacientes con AHA, para destruir amibas (166).

Por otro lado, un extracto lisosomal de *E. histolytica*, indujo proliferación de linfocitos de sangre periférica obtenidos de pacientes con AHA. Este extracto a diferencia de los extractos totales de amiba, no presenta actividad mitogénica (178); sin embargo no se puede establecer una correlación con la estimulación antígeno específica que se logra con las fracciones de bajo peso molecular, obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-200 (12).

La importancia de la inmunidad celular, también ha sido evaluada mediante la reacción de hipersensibilidad tardía. Para esto se han empleado como antígenos extractos de amiba y fracciones parcialmente purificadas. Algunos investigadores han encontrado que la respuesta de hipersensibilidad tardía específica es negativa en la fase inicial del AHA y se recupera en los días siguientes de la curación (96,97,106,132,133).

La prueba de inhibición de la migración de los leucocitos (Lif), resultó positiva a un antígeno total y a la LPFG de *L. histolytica* en un 77% de los pacientes en fase aguda de AHA. La prueba positiva a ambos antígenos se relacionó con la buena evolución clínica del paciente y no así con el título de anticuerpos (31).

Los resultados de inmunidad celular, sugieren la presencia de antígenos específicos que pudieran estar involucrados en la inducción de protección, sin embargo antígenos con actividad biológicas inespecíficas, como la mitogénica, aparentemente se encuentran expresados en cantidades suficientes en la superficie del parásito. Esto podría contribuir a la evasión de la respuesta inmune específica, como se ha descrito en algunas infecciones virales (121).

III. FUENTES DE CARACTERIZACION DE ANTIGENOS AMIBIANOS UTILIZADOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA AMIBIASIS.

La detección de quistes o trofozoitos de *E. histolytica* en materia fecal o en los sitios de localización extraintestinal, sigue siendo la mejor forma para diagnosticar la enfermedad. Sin embargo para que esto se lleve a cabo es indispensable entre otros requisitos, que haya un buen técnico parasitólogo, lo que no es muy frecuente en algunos países donde la amibiasis es endémica. Esto además se complica por el hecho de que el número de quistes puede ser tan pequeño, que no es fácil demostrar su presencia. Debido a lo anterior, se ha buscado para el diagnóstico de la amibiasis, ensayos inmunológicos que se basen tanto en la detección de anticuerpos específicos, como de antígenos derivados de *E. histolytica*.

Con el cultivo axónico, se lograron obtener grandes cantidades de antígeno amibiano, lo que permitió emplearlo para las pruebas serológicas. La aplicación de la serología en el diagnóstico de la amibiasis ha sido objeto de varias revisiones (22,44,67,71,84,85,95,98,188). Las técnicas que se han utilizado en la búsqueda de anticuerpos específicos son (74,15,204);

-Fijación de complemento	(CF)
-Inmovilización de la ameba	(IA)
-Fijación de superficie a papel	(FS)
-Precipitación en acetato de celulosa	(PAC)
-Inmunoensayo en capa fina	(ICF)
-Floculación en bentonita	(Fu)
-Aglutinación en latex	(AL)
-Inmunodifusión Ouchterlony	(ID)
-Precipitación en tubo	(PT)
-Inmunolectroforesis	(IE)
-Contrainmunolectroforesis	(CIEF)
-Inmunofluorescencia indirecta	(IFI)
-Hemoaglutinación indirecta	(HAI)
-Inmunoensayo enzimático	(IAL)
-Inmunolectrotransferencia	(IET)

En la mayoría de estas técnicas se ha utilizado antígeno total de ameba. Este antígeno es muy heterogéneo pues ha sido obtenido de diferentes formas. En primer lugar, proviene de diferentes cepas y el cultivo puede ser tratado o no con inhibidores de proteasas. La extracción del antígeno puede hacerse por congelamiento y descongelamiento, homogeneización o sonicación de los trofozoitos, seguido de centrifugaciones a diferentes revoluciones. Además existen productos comerciales, cuya preparación real se desconoce. Ante esta situación, lo ideal sería unificar criterios y emplear un mismo antígeno para todas las pruebas.

La LPFG, es una molécula de naturaleza polisacarídica parcialmente purificada, que se ha empleado en algunas pruebas serológicas y ensayos de inmunidad celular. Sin embargo los casos que se han estudiado con este antígeno son muy pocos.

Uno de los puntos importantes en el diagnóstico de la amibiiasis, es la determinación de antígenos de *E. histolytica*. Estos podrían ser buscados tanto en el suero como en heces y material proveniente de otros órganos afectados.

El primer ensayo de búsqueda de antígeno circulante sérico, se hizo a través de la prueba de fijación de superficie. Con esta prueba se demostró simultáneamente anticuerpos específicos y antígenos totales de *E. histolytica* en el 16% de los sueros provenientes de pacientes con amibiiasis (162).

Usando diversas pruebas, entre las que se incluyen ELISA y radioinmunoensayo (RIA), se buscó antígeno circulante en el suero de pacientes con AHA. En estas pruebas se empleó anticuerpo policlonal anti-amiba, y los resultados fueron positivos entre el 89.5% y el 100% (75,145,157).

La técnica de ELISA ha sido utilizada para detectar antígeno de *E. histolytica* en heces. En algunos casos se ha usado IgG específica contra la cepa HX-9; este anticuerpo se ha unido directamente a la enzima y se ha empleado la técnica de ELISA de un solo anticuerpo. En otros, se han empleado anticuerpo de conejo anti-amiba y antisuero humano específico en un

humano específico en un sistema de doble anticuerpo, los resultados muestran en algunos casos poca especificidad sin detectar quistes; sin embargo no hay reacción cruzada con otros antígenos provenientes de otros protozoarios intestinales (64,139,150,160).

En 1985, aparece una técnica de ELISA, para la detección de antígeno amibiano, en la que se combinan un anticuerpo monoclonal anti-*C. histolytica* de la cepa HK-9 y un antisuero policlonal anti-amiba. Este método mostró una sensibilidad del 82% con una especificidad de 98% (200).

El uso de anticuerpos monoclonales en la técnica de ELISA para el diagnóstico de la amibiasis, facilita la estandarización del método, ya que son anticuerpos idénticos.

El diagnóstico ideal de la amibiasis, sería uno de tipo serológico, tal y como se emplea en las bacterias gram-negativas de acuerdo a la clasificación de Kauffmann y White. Esta clasificación permite reconocer diferentes cepas por medio de sueros específicos. Así por ejemplo, en el género *Salmonella* actualmente hay más de 2000 serotipos (81). Los zimodemas en la amibiasis, han permitido hasta el momento clasificar, más de 20 cepas de *C. histolytica* (148,171,172,173,174). Esta clasificación permite separar a las amibas en patógenas y no patógenas; la patogenicidad está dada por la ausencia de una banda α y presencia de una banda β en el corrimiento electroforético de la fosfoglucomutasa (PGM) y una-

das de corrimiento rápido de la hexoquinasa (HK) (excepto el zimodemo XIII). Con este método se logra un diagnóstico preciso entre *E. histolytica* patógena y no patógena. El problema de esta técnica, es que requiere de personal y material especializados, por lo que hace difícil que se utilice de manera rutinaria. Por otro lado existen evidencias de que en alguna forma la patogenicidad de la amiba (detectada por los zimodemos), se expresa en la superficie del trofozoito; así se encontró por primer vez que las cepas patógenas de *E. histolytica*, en contraste con las no patógenas, pueden resistir a la lisis por el suero humano normal (155), a pesar de que ambas activan el complemento (156). Esta lisis por el suero humano es mediada principalmente por la activación del complemento por la vía alterna, la cual generalmente está asociada a la presencia de moléculas polisacarídicas. Probablemente haya diferencias de composición, en los azúcares constitutivos de algunas moléculas polisacarídicas de superficie de los diferentes zimodemos, lo que hace que haya diferencias en la resistencia a la lisis por complemento de los diferentes zimodemos. Para comprobar esta hipótesis, lo ideal sería obtener de zimodemos patógenos y no patógenos moléculas polisacarídicas tipo LPS y demostrar que hay diferencias en la composición química. Si esto resultara cierto, sería posible hacer una clasificación serológica de los diferentes zimodemos, como se hace en las bacterias gram-negativas.

Para demostrar en parte esta hipótesis y al no tener un zimodemo no patógeno axenizado, se extrajo LPRG de trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IM88 y de dos clones derivadas de ella: la L-6, no virulenta y la C-A, virulenta (130). Ambas clones mantuvieron el mismo zimodemo II (patógeno) de la cepa original HM1:IM88. La concentración de azúcares y su HOS-PAGE (198) fue similar entre la cepa original HM1:IM88 y la clona A. Por otro lado se hizo el ensayo serológico de 60 sueros de personas normales y 76 sueros de AHA, por la técnica de ELISA, usando como antígeno la LPRG de las 3 clones. Los resultados demostraron que los títulos hacia la LPRG de la cepa original y de la clona C-A eran altos en los pacientes con AHA con respecto a los sueros normales; mientras que los títulos hacia la LPRG de la clona L-6, fueron bajos en los pacientes con AHA y semejantes a los testigos negativos. Estos resultados sugieren que existen diferencias estructurales entre la LPRG de la clona virulenta C-A y la no virulenta L-6 (8).

IV. ANTIGENOS AMIBIANOS Y FISIOPATOLOGÍA DE *E. histolytica*.

La patogenicidad se define como la capacidad del parásito de causar enfermedad en el huésped. En el caso de *E. histolytica* existen cepas patógenas y no patógenas, que se diferencian por sus propiedades biológicas (60,123,143).

En la infección por amebiasis, podemos señalar que en la primer fase de la enfermedad se lleva a cabo un proceso de adherencia entre el trofozoito y la célula blanco (153,182). En esta etapa, son importantes las moléculas de superficie del parásito que intervienen en este proceso. Trabajos experimentales señalan en forma indirecta, algunas moléculas que podrían estar involucradas en esos eventos. Se ha demostrado la presencia de una glucoproteína de superficie con peso molecular de 170 Kd, con propiedades biológicas de lectina, que se une a mucinas aisladas de células epiteliales de colon de ratas y humanos y que participa en la adherencia del trofozoito de *Entamoeba histolytica* a células CHO y neutrófilos. Además es mitógeno para linfocitos T humanos. Las funciones de esta lectina se inhibe con N-acetil-D-galactosamina (NACGal) y galactosa (33,144,182,185).

Se han descrito otras dos lectinas de superficie: una de ellas participa en la unión de trofozoitos de *E. histolytica* de las cepas HK-9 y HM1:IM88 a células epiteliales humanas (Henle 407). Esta propiedad se inhibe con N-acetilglucosamina o con moléculas que contengan ese monosacárido, tales como peptidoglicanos bacterianos y quitina (91,92). La otra lectina tiene un peso molecular de 220 Kd y se aisló a partir de trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IM88. La proteína purificada aglutina eritrocitos humanos e inhibe la unión entre los trofozoitos y una monocapa de células MDCK. Su especificidad está dirigida hacia ácido hialurónico, quitina y quitotriosa (161).

Se ha aislado de trofozoitos de *L. histolytica* de la cepa HM1:IMSS, una molécula denominada adhemibina I, cuyo peso molecular es de 112 kD. Su participación en los mecanismos de adhesión a las células blanco, se ha puesto de manifiesto en forma indirecta, ya que anticuerpos monoclonales dirigidos contra ella, inhiben en mas del 50% su acción y una clona derivante en adhesión, no tiene esta proteína (10,131).

Por otro lado, se aisló y purificó a partir de trofozoitos de *L. histolytica* de la cepas HK-9 y HM1:IMSS, una proteína de membrana que tiene la propiedad de formar canales de difusión, por lo que se le ha denominado umbaporo. Gracias a esta propiedad, se ha sugerido que la proteína se puede insertar en la membrana de la célula blanco y funcionar como un ionóforo (112,208).

La segunda fase de la infección por la ameba, constituye el daño de la célula blanco por moléculas con actividad enzimática. Entre éstas, se encuentran:

La colagenasa cuya acción esta dirigida a la destrucción de colagena humana -tipos I y III (47). La N-acetil-glucosaminidasa cuyo peso molecular es de 125 kD y de la cual se han aislado dos isoenzimas (108). La neuroaminidasa que se ha identificado sobre trofozoitos de *L. histolytica* de la cepa HM1:IMSS, la cual degrada N-acetil-neuramin-lactosa y mucina, liberando en ambos casos ácido N-acetilneuramínico (NANA) (199). La fosfolipasa que se localiza en la fracción

vesicular denominada P30, cuya función es la de liberar los ácidos grasos constituyentes de los fosfolípidos (163). Además existe una serie de enzimas proteolíticas intracelulares (47,111,122).

V. ANTIGENOS UTILIZADOS PARA INMUNOPROTECCION.

La mejor prevención de la amibiasis, depende del control de su transmisión. Esto incluye buena higiene, saneamiento ambiental y tratamiento de las aguas. Como en las condiciones actuales, esto se realiza muy lentamente, en los países donde la amibiasis es endémica, una solución sería la obtención de una vacuna contra la amibiasis.

El primer ensayo de protección experimental contra la amibiasis, usando antígeno total proveniente de cultivo axénico de *E. histolytica* de la cepa HK-9, se llevó a cabo en hamsters. Los resultados de esta prueba mostraron que en 29.1% de los animales vacunados no hubo lesiones características en el hígado después del reto (179). En otros trabajos se demostró que la vacunación con antígeno total de una cepa dada, protegía solo contra el reto de la cepa homóloga y que la vacunación con el antígeno total axénico con o sin adyuvante de Freund, no protegía contra el reto intrahepático de *E. histolytica* cultivada en medio monoxénico (181,191).

La fracción 1, obtenida por filtración en Sephadex G-150, de un antígeno total de *E. histolytica* de la cepa NIH:200, protegió en 100% contra el reto de amibas homólogas. Este antígeno estaba constituido por proteínas de alto peso molecular y se obtuvieron mejores resultados que con el antígeno total (103). Resultados similares se obtuvieron con la misma cepa y con la misma fracción. La diferencia en este caso fue el empleo de Sephadex G-200 para el fraccionamiento del antígeno total de amiba, y que la protección conferida fue del 92% (202).

Hay una serie de experiencias en las que se emplearon junto con el antígeno amibiano diferentes adyuvantes, para valorar su poder inmunopotenciador en la inducción de la protección. En todos estos ensayos se empleó *E. histolytica* de la cepa NIH:200. En dos de los ensayos se usaron antígenos totales mientras que en el otro se usó la fracción 1 (116). Los adyuvantes usados fueron β -1-3-polyglucosa (Glucano) (185), trehalosa-dimicolato (TDM), adyuvante completo de Freund (ACF) (186), y liposomas de fosfatidilcolina (LP) (149). Los resultados demostraron que en todos los casos que se usaron adyuvantes había protección total.

Se ha estudiado la inducción de inmunidad protectora anti-amibiana en hámsters, empleando antígeno soluble deshidratado de *E. histolytica* de la cepa HMI AX 1M68. Los resultados demostraron, según los autores que en un 90% de los animales vacunados no hubo lesiones hepáticas posteriores al reto (192).

VIII. CONCLUSIONES.

La amibiasis constituye un problema de salud a nivel mundial, por lo cual las investigaciones sobre ella, han sido enfocadas a los aspectos que permitan entender los mecanismos de relación entre el huésped y el parásito. Esto no ha sido del todo fácil, debido a que actualmente, solo se conocen algunos antígenos relativamente puros. Los antígenos amibianos usados en los estudios inmunológicos son muy heterogéneos, ya que son obtenidos de distintas formas y no se ha logrado estandarizar algunos de ellos para su uso.

Los estudios inmunoquímicos de los antígenos proteicos de superficie, de varias cepas patógenas de *E. histolytica* muestran analogías entre ellos, sin embargo no se ha llegado a establecer en muchos de ellos alguna correlación definida entre su estructura y función en el sistema inmune.

Por lo que respecta a los antígenos de naturaleza polisacáridica destaca la LPFG. Este antígeno ha sido purificado parcialmente y su actividad inmunológica se ha estudiado tanto en modelos animales como en la enfermedad natural.

Se han estudiado algunos antígenos con características de toxinas y lectinas que juegan un papel importante en la patogenia de la enfermedad.

La respuesta inmune-humoral sistémica o la amibiasis, muestra que hay producción de IGM, IgG e IgA; siendo la IgG la más abundante. La presencia de IgG, se ha relacionado a amibiasis invasora y aparentemente no juegan un papel importante en los mecanismos de protección. Por el contrario, los altos títulos de IgG podrían indicar activación polyclonal inespecífica.

La presencia de IgG en amibiasis es difícil de interpretar pues estos estudios se han realizado en regiones con infecciones endémicas de parasitosis por helmintos, los cuales producen niveles altos de esta inmunoglobulina.

En la amibiasis también se han descrito complejos-inmunes que no se han relacionado con la patogenia de la enfermedad.

La activación del complemento (por las vías clásica y alterna) de suero humano normal, por los trofozoitos de *A. histolytica*, se ha querido relacionar a un mecanismo de resistencia natural del hombre, contra la invasión extraintestinal de la amiba.

El papel de los antígenos amibianos en la respuesta inmunocelular, no sido estudiado por diversas técnicas y en la mayoría de ellas, los resultados han demostrado inmunodepresión específica en las etapas iniciales de la enfermedad. Esto se relaciona probablemente a mecanismos de evasión del parásito.

Lo anterior se ha demostrado, por la presencia de antígenos que estimulan de manera inespecífica algunas células del sistema inmune, esto es actividad mitogénica.

Las pruebas inmunológicas de serología para el diagnóstico de la amibiiasis, requiere actualmente de antígenos estandarizados. Esto será posible, solo si se reúnen los expertos en la materia y deciden el antígeno que se empleará para todas las pruebas. En definitiva, la mejor prueba inmunológica sería la detección del antígeno amibiano. Esto se ha logrado parcialmente a través de la técnica de ELISA, empleando anticuerpos monoclonales.

Se han empleado una serie de antígenos, en la protección experimental contra la amibiiasis. Los resultados de estas experiencias han sido confusos, debido a los antígenos empleados, así como al modelo experimental que es muy artificial.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1 - Abioye, A.A., Lewis, E.A and McFarland, H. Clinical evaluation of immunoglobulins in amoebiasis. *Immunology*. 23, 937, 1972.
- 2 - Acosta, G., Campos, R., Barranco, C., Isibasi, A. and Kumate, J. Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 409, 760, 1983.
- 3 - Acosta, G., Cote, V., Isibasi, A. and Kumate, J. Anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. *Inmunología*. 4, 24, 1985.
- 4 - Acosta-Altamirano, G., Torres-Sanchez, E., Meraz, E., Isibasi, A. and Kumate, J. Detección de anticuerpos de la clase IgA dirigidos contra una lipopeptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* en muestras de calostro humano. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 17 (Suppl. 1), 291, 1986.
- 5 - Aley, S.B., Scott, W.A., and Cohn, Z.A. Plasma membrane of *E. histolytica*. *J. Exp. Med.* 152, 391, 1980.
- 6 - Ali-Khan, Z. and Meeroovitch, E. Serological characterization of gamma M (19s) and G (7s) rabbit antibodies in response to *E. histolytica* antigens. *Can. J. Microbiol.* 14, 1317, 1968.
- 7 - Ali-Khan, Z. and Meeroovitch, E. Studies of the purification of *E. histolytica* antigen by gel filtration I. Some physicochemical properties of the isolated fraction. *Can. J. Microbiol.* 16, 485, 1970.
- 8 - Arreguín, C., Rodríguez, T., Blanco, F., Vargas, M., Orozco, E., Ortiz, V., Isibasi, A. and Kumate, J. Diferencias inmunológicas de la lipopeptidofosfoglicana obtenida a partir de clones virulentos y no virulentos de la cepa HM1-IM88 de *Entamoeba histolytica*. XIX Congreso Nacional de Microbiología, Monterrey, N.L., 1988, 68.
- 9 - Arroyo, A. Simposio: inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos" antígenos en el hámster lactante. B. Material antigénico. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1), 311, 1978.
- 10 - Arroyo, R. and Orozco, E. Localization and identification of adhemibe, a protein which participates in the adhesion of *E. histolytica* to human erythrocytes and epithelial cells. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 17 (Suppl. 1), 135, 1986.

11 - Aust-Kettis, A. and Sundqvist, K.G. Dynamics of the interaction between *E. histolytica* and components of the immune response. I. Capping and endocytosis: influence of inhibiting and accelerating factors; variation on the expression of surface antigens. *Can. J. Immunol.* 71, 35, 1978.

12 - Aust-Kettis, A. and Sundqvist, K.G. Activation of lymphocytes from healthy donors and patients with amoebiasis by extracts of *E. histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 32, 245, 1982.

13 - Aust-Kettis, A., Thorstensson, R. and Utter, G. Antigenicity of *E. histolytica* strain NIH:200: a survey of clinically relevant antigenic components. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 512, 1983.

14 - Bailey, C.F. and Bowers, B. Localization of lipophosphoglycan in membranes of *Acanthamoeba* by using specific antibodies. *Cell. Biol.* 1, 358, 1981.

15 - Beltrán, F., Biagi, F., Ortega, P.S. and Rivas, C. Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización con *Entamoeba histolytica*. *Rev. Gastr. Mex.* 30, 491, 1965.

16 - Biagi, F. and Buentello, L. Immobilization reaction for diagnosis of amoebiasis. *Exp. Parasitol.* 11, 188, 1961.

17 - Moonkpucknaving, S. and Nair, R.C. Serological diagnosis of amoebiasis by immunofluorescence. *J. Clin. Path* 20, 875, 1967.

18 - Bos, H.J., Leijendrcker, W.J. and Van den Eijk, A.A. *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity, including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. *Exp. Parasitol.* 50, 342, 1980.

19 - Bos, H.J. and van den Eijk, A.A. Serum-inhibited toxicity of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 11 (Supl 1), 125, 1980.

20 - Bray, R.S., Harris, W.G. The epidemiology of infection with *Entamoeba histolytica* in Gambia West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 401, 1977.

21 - Brown, J.A.H. and Whitby, J.L. An immobilization test for amoebiasis. *Clin. Path.* 8, 245, 1955.

22 - Bruckner, D. Serologic and intradermal test for parasitic infections. *Pediatr. Clin.* 32, 1083, 1985.

23 - Calderón, J., Muñoz, M.L. and Acosta, H.M. Surface redistribution and released of antibody-induced caps in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Med.* 151, 184, 1980.

24 - Calderón, J. and Tovar-Gallegos, R. Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in *Entamoeba histolytica* Arch. Invest. Med. (Mex.). 11 (Suppl. 1), 241, 1980.

25 - Calderón, J. and Schreiber, U. Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. Infect. Immun. 50, 560, 1985.

26 - Calderón, J. and Tovar, R. Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* by treatment with human serum. Immunology 58, 467, 1986.

27 - Calderón, J. and Avila, E. Antibody caps in *Entamoeba histolytica*; isolation and electrophoretic analysis. J. Infect. Dis. 153, 927, 1986.

28 - Campos-Rodríguez, R., Andrade, P., Acosta, G., Barranco, C., Isibasi, A. and Kumate, J. Inducción de una respuesta inmune humoral local contra antígenos de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Med. (Mex.). 17 (Suppl. 1), 277, 1986.

29 - Capin-Gutiérrez, N.R., Ortiz-Ortiz, L., Zamacona-Ravello, G. and Aubanel, M. Efecto del mercaptoetanol en las reacciones serológicas de la amibiasis invasora. Arch. Invest. Med. (Mex.). 4 (Suppl. 1), 177, 1973.

30 - Crosgrave, W.B. and Hanson, W.L. Partial characterization of polysaccharide from the trypanosomid flagellate *Crithidia fasciculata*. Am. Zoologist, 2, 401, 1982.

31 - Cruz, M.S., Isibasi, A., Miranda, R., Lares, S., Ramírez, A. and Kumate, J. Evaluación de la inmunidad celular en pacientes con absceso hepático amibiano utilizando la prueba de la inhibición de la migración de los leucocitos (Lif). Arch. Invest. Med. (Mex.). 17 (Suppl. 1), 319, 1986.

32 - Cruz, M.S. Inmunuquímica de un antígeno de naturaleza polisacáridica de la superficie de *Entamoeba histolytica*. Tesis Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., 1988.

33 - Chadee, K., Petri, W.A., Innes, D.J. and Ravdin, J.I. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica* Clin. Invest. 80, 1245, 1987.

34 - Chang, S.M., Lin, C.M., Dusanic, D.G. and Cross, J.H. Antigenic analysis of two axenized strains of *Entamoeba histolytica* by two-dimensional immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28, 845, 1979.

35 - Cher, A., et al. Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med. 148, 46, 1978.

- 36 - Chugh, A., Saxena, A. and Vinayak, V.K. Interactions between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and cells of the immune system. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 63, 1, 1985.
- 37 - Dasgupta, A. Immunoglobulin in health and disease. III. Immunoglobulins in the sera of patients with amoebiasis. *Clin. Exp. Immunol.* 86, 163, 1974.
- 38 - Dearborn, D.G., Smith, S. and Korn, E.U. Lipophosphonoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* 249, 3342, 1974.
- 39 - Dearborn, D.G., Smith, S. and Korn, E.U. Lipophosphonoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* 251, 2976, 1976.
- 40 - Diamanstein, T., Klos, M., Gold, U. and Hahn, H. Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. I. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for human peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* 126, 2084, 1981.
- 41 - Diamond, L.S. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*. 134, 336, 1961.
- 42 - Diamond, L.S. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Scaudinn 1903 and *Entamoeba histolytica* like amoebae. *Parasitol.* 54, 1047, 1968.
- 43 - Doldring, O.L., et al. Acquisition of human blood group antigen by *Schistosoma mansoni* Clin. Exp. Immunol. 26, 181, 1976.
- 44 - Elsdon-Dew, R. Serodiagnosis of amoebiasis. In *Immunology of Parasitic Infections*, Cohen, S. and Sadun, E. Eds. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1975, 56.
- 45 - Feingold, C., Bracha, K., Wexler, A. and Mirelman, D. Isolation, purification and partial characterization of an enterotoxin from extracts of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 48, 211, 1985.
- 46 - Freeman, G.C. The preparation and proteins of a specific polysaccharide from *Bacterium typhosum* 1y2. *Biochem. J.* 36, 340, 1942.
- 47 - Gadasi, H. and Kessler, E. Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 39, 528, 1983.
- 48 - Ganguly, N.K., Mahajan, R.C., Datta, D.V., Sharma, S., Chhuttani, P.N. and Gupta, A.K. Immunoglobulin and complement levels in cases of invasive amoebiasis. *Ind. J. Med. Res.* 67, 221, 1978.

49 - Ganguly, N.K., Mahajan, R.C. and Gill, N.J. Cellular reactions to amoebic antigen in invasive amoebiasis: a preliminary communication. *Ind. J. Med. Res.* 70, 412, 1979.

50 - García-Tamayo, F., Hashimoto-Yañez, B. and Kumate, J. Proteínas propias y del medio de cultivo en los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* obtenidos axenicamente. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 11 (Suppl. 1), 159, 1980.

51 - Geller, M., Geller, M., Flaherty, D.K., Black, P. and Capanea-Souza, A.P. Serum IgE levels in amoebiasis. *Clin. Allergy* 8, 565, 1978.

52 - Ghadirian, E. and Meerovitch, E. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscess in hamsters. Proceedings of the 4th International Congress of Immunology. Abstract No. 12, 8, 10, Paris, 1980.

53 - Ghadirian, E. and Meerovitch, E. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscess in hamsters. *Parasite Immunol.* 3, 329, 1981.

54 - Ghadirian, E. and Meerovitch, E. Effect of splenectomy on the size of the amoebic liver abscess and metastatic foci in hamsters. *Infect. Immun.* 31, 571, 1981.

55 - Ghadirian, E. and Meerovitch, E. *In vitro* amoebicidal activity of immune cells. *Infect. Immun.* 36, 243, 1982.

56 - Ghadirian, E. and Meerovitch, E. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amoebiasis in hamsters. *Parasite Immunol.* 4, 219, 1982.

57 - Ghadirian, E. and Meerovitch, E. and Kongsavn, P. Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. *Infect. Immun.* 42, 1017, 1983.

58 - Gil-Recasens, M.E., Cats, S., López-Osuna, M., Rosenstein, Y.J., Romo, R., Cervera, J. and Kretscher, R.R. Increased leucocyte histamine release by *Entamoeba histolytica* antigen in patients with amoebic abscess of the liver. *Parasit. Immunol.* 6, 211, 1984.

59 - Gitler, C., Clef, E. and Rosenberg, I. Citopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Phil. Trans. R. Soc. Lon.* 307, 73, 1984.

60 - Gitler, C. and Mirelman, D. Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 237, 1986.

61 - Glottlieb, M., Lanzetta, P. and Berech, J. *Crithidia fasciculata* characterization of polysaccharide. *Exp. Parasitol.* 32, 206, 1972.

62 - Glottlieb, M. A carbohydrate-containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. *J. Immunol.* 119, 485, 1977.

63 - Goldman, M. and Gleason, N.N. Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. IV. Relationships of two strains of *Entamoeba histolytica* and one of *Entamoeba hartmanni* demonstrated by cross absorption techniques. *Parasitol* 46, 778, 1962.

64 - Grundy, M.S. Preliminary observations using a multi-layer ELISA method for the detection of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigens in stool samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 396, 1982.

65 - Grundy, M.S., Cartwright-Taylor, L., Lundin, L. et. al. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. *J. Clin. Microbiol.* 17, 753, 1983.

66 - Guerrant, R.L. The global problem of amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* 8, 218, 1986.

67 - Gupta, A.K. Immunodiagnosis of amebiasis by antibody detection. *Indian J. Pediatr.* 51, 725, 1984.

68 - Harris, W.G. and Bray, K.S. Cellular sensitivity in amoebiasis preliminary results of lymphocytic transformation in response to specific antigen and to mitogen in carrier and disease states. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 340, 1976.

69 - Harris, W.G., Friedman, M.J. and Bray, K.S. Serial measurement of total and parasite-specific IgE in an African population infected with *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 427, 1978.

70 - Healy, G.R., Kagan, I.G. and Gleason, N.N. Use of the indirect hemagglutination test in some studies of seroepidemiology of amebiasis in the western hemisphere. *Health Laboratory Science* 7, 109, 1970.

71 - Healy, G.R. and Cahill, K.M. The serology of amebiasis. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 47, 494, 1971.

72 - Healy, G.R., Viñesvarre, G.S. and Kagan, I.G. Observations on the persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 5 (Suppl. 2), 495, 1974.

73 - Healy, G.R. Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis in the United States. *Rev. Infect. Dis.* 8, 234, 1986.

74 - Healy, G.R. Serology. Diagnostic methodology. In *Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica*. Reydin, J.I. Ed. John Wiley and Sons, USA, 1988, Chap. 41.

75 - Hernández, R., Muñoz, O., Jaime, M. and Garduño, G. Identificación de antígeno amibiano circulante en el hombre por análisis inmunoenzimático. I. Desarrollo de la técnica. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 13 (Suppl. 3), 297, 1982.

76 - Huidt, G., Davies, P. Allison, A.C. and Scholmer, H.V. Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. *Nature* 227, 214, 1979.

77 - Imperato, P.J. A historical overview of amebiasis. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 57, 175, 1981.

78 - Isibasi, A., García-Tamayo, F. and Kumate, J. Polisacáridos obtenidos de *E. histolytica* en cultivo axénico. *Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amebiasis México, D.F.*, 1975.

79 - Isibasi, A., Sánchez, N., García-Tamayo, F. and Kumate, J. Serología con polisacáridos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1), 285, 1978.

80 - Isibasi, A., Cruz, M.S., Ramírez, A. and Kumate, J. Immunochemistry of lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HK-9. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 13 (Suppl. 3), 51, 1982.

81 - Isibasi, A., Cruz, M.S., Soto Montano, X., Ramírez, A. and Kumate, J. Localization of the lipopeptidophosphoglycan extracted by phenol-water from trophozoites of HK-9 strain of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 13 (Suppl. 3), 57, 1982.

82 - Isibasi, A., Cruz, M.S., Cottlieb, M. and Kumate, J. Purification of the polysaccharide portion of the lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of HK-9 strain of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 17 (Suppl. 1), 73, 1986.

83 - Joyce, M.P. and Ravdin, J.I. Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38, 74, 1988.

84 - Juniper, K., Worrel, C.L., Minshew, M.C., Roth, L.B., Cypert, H. and Lloyd, R.E. Serological diagnosis of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21, 197, 1972.

85 - Kagan, I.G. *Seroepidemiology of amebiasis*. In Proceedings of the International Conference on Amebiasis. Sepúlveda, B. and Diamond, L.B. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1976, 574.

86 - Kane, G.J., Matossian, R. and Batty, I. Fluorochromelabeled anti-immunoglobulin fractions used with stabilized antigen preparations for the assesment of parasitic diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 177, 134, 1971.

87 - Kauffmann, F. *Classification of bacteria*, 1st edition, Munksgaard, Denmark, 1975.

88 - Kean, B.H. A history of amebiasis. In *Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. Ravdin, J.I. Ed. John Wiley and Sons, U.S.A., 1988, Chap.1.

89 - Kessel, J.F., Lewis, W.P., Molina-Pasquel, C. and Turner, J.A. Indirect hemagglutination and complement fixation tests in amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14, 540, 1965.

90 - Ketteridge, D.S. Lipopolysaccharide from *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 101, 1978.

91 - Kobiler, D., Mirelman, D. and Mattern, C.F. Lectin and toxin-like activities of *Entamoeba histolytica*: comparison of properties. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 30, 955, 1981.

92 - Kobiler, D. and Mirelman, D. Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to monolayers of human cells. *J. Infect. Dis.* 144, 539, 1981.

93 - Korn, E.D., Dearborn, D.G. and Wright, P. Lipophosphoglycan of plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Isolation from whole amoebae and identification of water-soluble products of acid hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 249, 3335, 1974.

94 - Koster, F.T., Tong, K.S.K., Gilman, R.H., Ahmad, A., Rahman, M.M. and Williams, R.C. Circulating immune complexes in bacillary and amebic dysentery. *J. Clin. Lab. Med.* 5, 153, 1981.

95 - Kotcher, E., Miranda, M. and Garcia de Salgado, V. Correlation of clinical, parasitological, and serological data of individuals infected with *Entamoeba histolytica*. *Gastroenterology*, 58, 338, 1970.

96 - Kretschmer, R.R. and López-Osuna, M. Estudios sobre inmunidad celular con antígeno amibiano axénico y sus fracciones. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 2 (Suppl. 1), 269, 1971.

97 - Kretschmer, R.R., Sepúlveda, B., Almazan, A. and Gamboa, f. Intradermal reactions to an antigen (histolyticin) obtained from axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Trop. Geogr. Med.* 24, 275, 1972.

98 - Kretschmer, R.R. Immunology of amebiasis. In *Amebiasis*, Martínez-Palomo, A. Ed., Elsevier, Amsterdam, 1986, Chap. 4.

99 - Krupp, I.M. Immunoelectrophoretic analysis of several strains of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 849, 1966.

- 100- Krupp, I.M. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 388, 1970.
- 101- Krupp, I.M. and Powell, S.J. Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 414, 1971.
- 102- Krupp, I.M. Comparison of contraimmunoelectrophoresis with other serologic test in diagnosis of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 27, 1974.
- 103- Krupp, I.M. Protective immunity to amebic infection demonstrated in guinea-pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 355, 1974.
- 104- Krupp, I.M. Definition of the antigenic pattern of *Entamoeba histolytica* and immunoelectrophoretic analysis of patients response to amebic disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26, 387, 1977.
- 105- Levine, N.D. et al. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27, 37, 1980.
- 106- Landa, L., Capin, R. and Guerrero, M. *Estudios sobre inmunidad celular en la amebiasis invasora*. In Proceedings of International Conference on Amebiasis, Sepúlveda, B. and Diamond, L.S., Eds., Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico, D.F., 1976, 654.
- 107- López, J.S., Jensen, F.J., Mendoza, F. and Ortiz-Ortiz, L. Anticuerpos monoclonales contra *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 13 (Suppl 3), 291, 1982.
- 108- Lundblad, G., Huldt, G., Eliander, M., Lind, S and Sletten-gren, K. β -N-acetylglucosaminidase from *Entamoeba histolytica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68, 71, 1981.
- 109- Lushbaugh, W.B. and Miller, J.H. Fine structural topochemistry of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903. *J. Parasitol.* 60, 421, 1974.
- 110- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Cantey, J.R., Hofbauer, F. and Pittman, F.E. Isolation of cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 139, 9, 1979.
- 111- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., et al. Inhibition of *Entamoeba histolytica* cytotoxin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 375, 1981.
- 112- Lynch, E.C., Rosenberg, I.M. and Gitler, C. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO Journal* 1, 801, 1982.

113- Maddison, S.E., Powell, S.J. and Elsdon-Dew, R. Comparison of hemagglutinins and precipitins in amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14, 551, 1965.

114- Maddison, S.E., Kagan, I.G. and Elsdon-Dew, R. Comparison of intradermal and serological test for the diagnosis of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17, 540, 1968.

115- Maddison, S.E., Kagan, I.G. and Norman, L. Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis. *J. Immunol.* 100, 217, 1968.

116- Mahajan, R.C., et al. Coproantibodies in intestinal amebiasis. *Ind. J. Med. Res.* 60, 547, 1972.

117- Martínez-Báez, M. Historical introduction. In *Amebiasis* Martínez-Palomo, A. Ed., Elsevier, Amsterdam, 1986, Chap. 1.

118- Martínez-Castro, S., Gorab, A., Muñoz, O. and Reyes, M. Coproanticuerpos en amebiasis intestinal. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 10, 121, 1979.

119- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. and de la Torre M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by concanavalina A. *Nature New Biol.* 245, 186, 1973.

120- Mattern, C.F.T., Caspar-Natovitz, P. and Keister, D.B. Detection of antibodies against lectin-like "toxin" of *Entamoeba histolytica* in sera of patients with amebiasis. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 11 (Suppl. 1), 143, 1980.

121- McClelland, A.J. Vaccination against paramyxoviruses. *Nature* 264, 404, 1980.

122- McLaughlin, J. and Faubert, G. Partial purification and some properties of a neutral sulphydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can. J. Microbiol.* 23, 420, 1977.

123- McLaughlin, J. and Aley, S. The biochemistry and functional morphology of *Entamoeba*. *J. Protozool.* 32, 221, 1985.

124- Meeroovitch, E. and Gharidian, E. Effect of *Trichinella spiralis* infection on the experimental amebic liver abscess in hamsters. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 11 (Suppl. 1), 185, 1980.

125- Meri, S., et. al. Complement activation by antigenic fractions of *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol.* 7, 153, 1985.

126- Meza, I., Cazares, I., Rosales-Encina, J. L., Talamas, P. and Rojkind, M. Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 156, 798, 1987.

127- Muñoz, M. L., Acosta, H. and Calderon, J. Redistribución de antígenos superficiales de *Entamoeba* y su caracterización inmunquímica. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1), 183, 1978.

128- Neal, K. A., Robinson, G. R., Lewis, W. P. and Kessel, J. F. Comparison of clinical observations on patients infected with *Entamoeba histolytica* with serological titers and virulence of their amoebas to rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62, 69, 1968.

129- Noya, O., Warren, L. G. and Gohd, R. Serum proteins in the plasma membrane in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 11 (Suppl. 1), 109, 1980.

130- Orozco, E., Suárez, M. and Sánchez, T. Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. *Int. J. Parasitol.* 15, 655, 1985.

131- Orozco, E., Arroyo, R., Rodríguez, M. A. and García-Rivera, G. Identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin using adhesion deficient-mutants and monoclonal antibodies. In Molecular Strategies of Parasitic Invasion. Agabian, N., Goodman, H. and Nogueira, N. Eds. Alan R. Liss, Inc., New York, 1987, 531.

132- Ortiz-Ortiz, L., Zamacona-Ravello, G. and Capin, N. R. Hipersensibilidad celular en amibiasis. III. Efecto *in vitro* de la concanavalina A y de antígeno amibiano sobre leucocitos periféricos de pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 5 (Suppl. 2), 481, 1974.

133- Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B. and Capin, N. R. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscesses of the liver. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4, 127, 1975.

134- Ortiz-Ortiz, L., Capin, N. R., Sepúlveda, B. and Zamacona, G. Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. *Clin. Exp. Immunol.* 34, 10, 1978.

135- Ortiz-Ortiz, L. Inducción de inmunidad protectora amibiana con nuevos antígenos en el hámster lactante. E. Reacción inmunológica. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1), 325, 1978.

136- Ortiz-Ortiz, L., Ximenez, C., Mendoza, F., Mitchalak, E., Melendro, L. I. and Oliva, A. *Entamoeba histolytica*: specific antigen recognized by monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 61, 390, 1986.

137- O'Shea, M.S. and Feria-Velasco, A. Demostración ultramicroscópica de antígenos de superficie en trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. I. Por inmunofluorescencia con IgG humana específica. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 5 (Suppl. 2), 307, 1974.

138- Osisanya, J.O.S. and Warhurst, D.C. Specific anti-amoebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitin test in *Entamoeba histolytica* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 605, 1980.

139- Palacios, O., De la Hoz, K. and Sosa, H. Determinación del antígeno amibiano en heces por el método ELISA para la identificación de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1) 339, 1978.

140- Parkhouse, M., Cid, M.E. and Calderón, J. Identificación de antígenos de membrana de *Entamoeba histolytica* con anticuerpos de pacientes con amibiasis. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1), 211, 1978.

141- Patterson, M., Healy, G.R. and Shabot, M. Serologic testing for amoebiasis. *Gastroenterol.* 78, 136, 1980.

142- Perches, A., Kretschmer, R., Lee, E. and Sepúlveda, B. Determinación de inmunoglobulinas del suero en pacientes con amibiasis invasora. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 2 (Suppl. 1), 697, 1970.

143- Pérez-Tamayo, R. Pathology of amebiasis. In *Amebiasis*. Martínez-Palomo, A. Ed., Elsevier, Amsterdam, 1986, Chap 2.

144- Petri, W.A., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, F. and Kavdin, J.I. Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infect. Immun.* 55, 2327, 1987.

145- Pillai, S. and Mohiem, A. A solid phase sandwich radioimmunoassay for *Entamoeba histolytica* proteins and the detection of circulating antigens in amoebiasis. *Gastroenterology*. 83, 1210, 1982.

146- Pinon, J.M., Poirriez, J., Remy, G. and Lèpau, H. Immunological studies in amebiasis: characterization of specific antibodies by enzyme-linked immunofiltration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 290, 1987.

147- Pinto da Silva, P., Martínez-Palomo, A. and González-Robles, A. Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. *J. Cell. Biol.* 64, 538, 1975.

148- Proctor, E.M., Wong, Q., Yang, J. and Keystone, J.S. The electrophoretic isoenzyme patterns of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in two mayor cities in Canada. *J. Trop. Med. Hyg.* 37, 296, 1987.

149- Purnima, C., Nain, K. and Vinayak, V.K. Vaccination against experimental hepatic amoebic infection- an evaluation of phosphatidylcholine liposomes as immunopotentiator. *J. Parasit.* 73, 859, 1987.

150- Randall, G.R., Goldsmith, R.S., Shek, J., Mehaliko, S. and Heyleman, D. Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Entamoeba histolytica* in faecal samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 593, 1984.

151- Ravdin, J.I. and Guerrant, R.L. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* 4, 1185, 1982.

152- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L. and Hewlett, E.L. N-acetyl-D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relationship to amoebic *in vitro* virulence. *J. Infect. Dis.* 141, 816, 1985.

153- Ravdin, J.I. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, toxins, and contact-dependent cytotoxicity. *Rev. Infect. Dis.* 8, 247, 1986.

154- Ravi, V.V., Mithal, S., Malaviya, A.N. and Tandon, A.N. Immunologic studies in amoebic liver abscess. *Indian J. Med. Res.* 63, 1732, 1975.

155- Reed, S.L., Sargeant, P.G. and Braude, A.I. Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 77, 248, 1983.

156- Reed, S.L., Curd, J.G., Gigli, I., Gillin, F.D. and Braude, A. Activation of complement by pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 136, 2265, 1986.

157- Resano, F., Trujillo, J., Jiménez, G. and Palacios, O. Detección de antígeno amibiano por el método de ELISA en el suero de pacientes con absceso hepático. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 13 (Suppl 3.), 301, 1982.

158- Revoltella, R. et. al. Parasite-reactive serum IgE antibodies in African populations. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* 62, 23, 1980.

159- Rivera, P., Carabez-Trejo, Cortés, L.F., Islas, A. and Kumate, J. Immunochemical characterization of *Entamoeba histolytica* plasma membranes own and culture medium antigens. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 15, 405, 1984.

160- Root, D.M., Cole, F.X. and Williamson, J.A. The development and standardization of an ELISA method for the detection of *Entamoeba histolytica* antigens in fecal samples. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1), 203, 1978.

161- Rosales-Encina, J.L., Meza, I., López-De-León, A., Talamás, P. and Rojkind, M. Isolation of 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 156, 790, 1987.

162- Ruiz-Castaneda, M., de la Torre, M. and Aubanel, M. Investigación de antígeno circulante en amibiasis invasora. *Gac. Med. Mex.* 112, 393, 1976.

163- Said-Fernández, S. and López-Revilla, R. Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 56, 874, 1988.

164- Salata, R.A., Pearson, R.D. and Ravdin, J.I. Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica*. *Clin. Invest.* 76, 491, 1985.

165- Salata, R.A. and Ravdin, J.I. N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 151, 816, 1985.

166- Salata, R.A., Martínez-Palomo, A., Murray, H.G., et al. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 136, 2633, 1986.

167- Salata, R.A. and Ravdin, J.I. Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. *Rev. Infect. Dis.* 8, 261, 1986.

168- Salata, R.A., Murray, H.W., Rubin, B.Y. and Ravdin, J.I. Role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 72, 1987.

169- Sánchez, M.E. and Martínez-Palomo, A. Inducción de inmunidad antiamebiasis en primates subhumanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica*. II. Aislamiento y caracterización del antígeno lisosomal. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 11 (Suppl. 1), 247, 1980.

170- Sánchez-Nereida, M., García-Tamayo, F. and Kumate, J. Inmunológica de proteínas inmunogénicas de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 9 (Suppl. 1), 149, 1978.

171- Sargeant, P.G., Williams, J.E. and Grene, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 519, 1978.

172- Sargeaunt, P.G. and Williams, J.E. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 225, 1979.

173- Sargeaunt, P.G., Williams, J.E. and Neal, R.A. A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK-9, etc.), *E. histolytica*-like and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 489, 1980.

174- Sargeaunt, P.G. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. *Parasitology Today* 3, 40, 1987.

175- Bavanet, T., Viriyanond, P. and Nimitmongkol, N. Blast transformation of lymphocytes in amoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 705, 1973.

176- Sawheny, S., Chakravarti, R.N., Jain, P. and Vinayak, V.K. Immunogenicity of axenic *Entamoeba histolytica* antigen and its fractions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 26, 1980.

177- Saxena, A. and Vinayak, V.K. Low susceptibility of trophozoites of virulent *Entamoeba histolytica* to cellular and antibody dependent cellular cytotoxicity by guinea-pig effector cells. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 933, 1987.

178- Segovia, E., Capin, R. and Landa, L. Transformación blastoide de linfocitos estimulados con antígeno lisosomal en pacientes con amebiasis intestinal. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 11 (Suppl. 1), 225, 1980.

179- Sepúlveda, B., Tanimoto-weki, M., Vázquez-Saavedra, J.A. and Landa, L. Inducción de inmunidad antiamebiana en el hamster con antígeno obtenido de cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 2 (Suppl. 1), 284, 1971.

180- Sepúlveda, B., Chavez, A., Iturbide-Alesio, I. and Ortiz-Ortiz, L. Efecto de la gammaglobulina inmune amebiana sobre el trofozoito de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 4 (Suppl. 1), 579, 1973.

181- Sepúlveda, B., Tanimoto-weki, M., Guerrero, A. and Solís, G. Inmunidad en hámsters consecutiva a vacunación con cultivos monoxénicos y axénicos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 4, 159, 1973.

182- Sepúlveda, B. Amebiasis: host-pathogen biology. *Rev. Infect. Dis.* 4, 836, 1982.

183- Sheelson, M. and Baker, R.P. Detection of coproantibodies in amebiasis of the colon: a preliminary report. *Am. J. Clin. Pathol.* 54, 615, 1970.

184- Sheffer, J.G. and Ansfield, J. The effect of rabbit antisera on the ability of *Entamoeba histolytica* to phagocytose red blood cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5, 53, 1956.

185- Sharma, A., Haq, A.U., Siddiqui, M.U. and Ahmad, S. Immunization of guinea-pigs against *Entamoeba histolytica* using glucan as an adjuvant. *J. Immunopharmac.* 6, 463, 1984.

186- Sharma, A., Haq, A.U., Ahmad, S. and Lederer, E. Vaccination of rabbits against *Entamoeba histolytica* with aqueous suspensions of trehalose-dimycolate as the adjuvant. *Infect. Immun.* 48, 634, 1985.

187- Staub, A.M. Somatic degraded polysaccharide of gram-negative bacteria. In *Methods in carbohydrate chemistry*. Academic Press, New York, 1965.

188- Stamm, W.P., Ashley, M.J. and Bell, K. The value of amoebic serology in an area of low endemicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 49, 1976.

189- Stern, J.J., Graybill, J.R. and Orutz, D.J. Murine amebiasis: the role of the macrophage in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 372, 1984.

190- Stewart, D.L. and Warren, L.G. The origin of antigenic substances in *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 and serologic manifestations of their antibody-inducing properties. *J. Parasitol.* 48, 124, 1962.

191- Tanimoto-Weki, M., Cortés, A., Vázquez Saavedra, J.A., Calderón, P. and Aguirre-García, J. Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno axénico. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 4 (Suppl. 1), 147, 1973.

192- Tanimoto-Weki, M., Aguirre-García, J., Sánchez, M.E. and Sepúlveda, B. Inducción de inmunidad protectora antiamebiana en el hámster por medio de antígeno soluble deslipidizado. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 17 (Suppl. 1), 233, 1986.

193- Thompson, P.E., Graedel, S.K., Schneider, C.R., Stucki, W.P. and Gordon, R.M. Preparation and evaluation of standardized antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. *Bull. W.H.O.* 34, 349, 1968.

194- Torian, B.E., Lukehart, S.A. and Stamm, W.A. Use of monoclonal antibodies to identify, characterize, and purify a 96 kilo-dalton surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 156, 334, 1987.

195- Treviño-García, N., Feria-Velasco, A., Ruiz de Chávez, I. and de la Torre, M. Lisosomas de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 11 (Suppl. 1), 179, 1980.

196- Trissl, D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animals hosts. *Rev. Infect. Dis.* 4, 1154, 1982.

197- Trissl, D., Müller, R., Ries, R. and Rathmann, M. Anti-surface antibodies to *Entamoeba histolytica* and their role in complement lysis. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 17 (Suppl. 1), 203, 1986.

198- Tsai, C.M. and Frasch, C.M. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Ann. Biochem.* 19, 115, 1982.

199- Udezulu, I.A. and Leitch, G.J. A membrane associated neuraminidase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 55, 181, 1987.

200- Ungar, B.L., Yolken, R.H. and Quinn, T. Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. *Am. J. Trop. Med. (Mex.)*. 34, 485, 1985.

201- Vargas, A.M., Zinker, S. and Orozo, E. Caracterización de las proteínas ribosomales de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 17 (Suppl. 1), 81, 1986.

202- Vinayak, V.K., Sawhney, S., Jain, P., and Chakravarti, R.N. Protective effects of crude and chromatographic fractions of axenic *Entamoeba histolytica* in guinea-pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 483, 1980.

203- Von Brand, T., McMahon, P., Tobie, E.J., Thopson, M.J. and Moseittig, E. Chemical composition of the culture from *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 8, 171, 1959.

204- Walsh, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8, 228, 1986.

205- Wipawee, U., et al. Mouse IgE response to an allergen from *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 68, 398, 1982.

206- World Health Organization Expert Committee. Amebiasis. *W.H.O. Tech. Rep. Ser.* 421, 1, 1969.

207- Yap, E.H., Aw, S.E. and Zaman, V. IgG as the main immobilization factor in rabbit antisera against *Entamoeba*. *Ex-parientia*. 25, 401, 1969.

208- Young, J.D.E., Young, T.M., Unkeless, L.P.L., and Cohn, Z.A.
Characterization of a pore-forming protein from *Entamoeba*
histolytica. *J. Exp. Med.* 156, 1677, 1982.