



6
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

RELACION HUESPED PARASITO EN INFECCIONES
POR ENTAMOeba HISTOLYTICA.

Trabajo Monográfico de Actualización
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO
PRESENTADO POR:
CLAUDIA ALVARADO DE LA BARRERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1990

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA



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.

INDICE

INTRODUCCION

Epidemiología y aspectos clínicos	1
-----------------------------------	---

I) PATOGENESIS DE LA AMIBIASIS

1.1) Clasificación de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
1.2) Patogénesis de la amibiasis invasiva	3
1.3) Relación hospedero parásito	4
1.4) Predisposición genética a la amibiasis	7
1.5) Mecanismos de adherencia de <i>E. histolytica</i>	8
1.6) Capacidad citolítica de <i>E. histolytica</i>	12

II) FACTORES PREDISPONENTES A LA INFECCION

2.1) Factores de virulencia del parásito	15
2.2) Virulencia y cadenas patógenas	17
2.3) Toxinas secretadas. Citolisis dependiente de contacto	20
2.4) Citotoxinas liberadas por <i>E. histolytica</i>	21
2.5) Mecanismos citolíticos dependientes de contacto	23

III.A) RESPUESTA A LA INFECCION POR *Entamoeba histolytica*

3.1) Mecanismos de defensa no inmunes	25
3.2) Respuesta inmune a la amibiasis	25
3.3) Inmunidad humoral	26
3.4) Complemento	31

III.B) INMUNIDAD CELULAR

3.5) Polimorfonucleares	36
3.6) Celulas efectoras en el humano	38
3.7) Actividad mitogénica de extractos amibianos protéicos solubles	42
3.8) Respuesta inmune mediada por células en pacientes	43
3.9) Papel de la histamina en la respuesta inmune local anti-amiba	45

IV) DIAGNOSTICO DE LA AMIBIASIS	
4.1) Técnicas de examen de heces para detección de protozoarios intestinales	47
4.2) Antígenos parasitarios	49
4.3) Pruebas inmunológicas en el diagnóstico de amibiasis	50
4.4) Pruebas que emplean antígenos solubles	50
4.5) Pruebas que emplean antígenos particulados	51
4.6) Estudios de gabinete	52
4.7) Métodos de diagnóstico que podrían tener aplicación en el futuro	52
V) INDUCCION DE INMUNIDAD PROTECTORA	58
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	64

INTRODUCCION

a) Epidemiología y aspectos clínicos:

La amibiasis es causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. La enfermedad es de distribución mundial pero se presenta con mayor frecuencia en regiones de clima calido y humedo con bajo nivel socioeconómico y mal saneamiento. En México la infección se presenta como endémica.

Las condiciones de insalubridad favorecen la proliferación del parásito, pero debido al difícil control de éstas, se pretende encontrar otros metodos de prevención a la infección tales como los métodos inmunológicos. Para el establecimiento de la inmunidad a la amibiasis es necesario estudiar el mecanismo de infección del parásito distinguiendo las diferentes fases del padecimiento.

Dentro del aspecto inmunológico de la amibiasis se deben identificar los factores predisponentes a la infección inherentes al parásito, los relacionados con el hospedero y los relacionados al medio ambiente de ambos.

Es de gran importancia el papel de los mecanismos de respuesta inmune tanto humoral como celular presentados por el hospedero, así como la relacion de éste con el parásito que se establece durante la infección.

El control que se pueda llegar a tener sobre la infección amibiana está estrechamente relacionado con la confiabilidad de los métodos inmunológicos de diagnóstico existentes.

La enfermedad colónica invasiva usualmente se presenta con diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y esporádicamente con fiebres. Pueden existir ulceraciones en la mucosa, las que poseen una clásica forma de matraz se presentan rara vez. La forma fulminante de colitis con implicación total del colon y perforación de este se asocia con el uso de corticosteroides [10]. *E. histolytica* puede formar lesiones localizadas en forma crónica (amebomas) o puede presentarse sin causar dolor manteniéndose así durante años, pero ambas formas son de difícil diagnóstico.

El absceso hepático amibiano (AHA) se caracteriza por fiebre, dolor en el cuadrante superior derecho, una o muchas cavidades en el hígado y presencia de anticuerpos sericos contra la amiba. El absceso contiene derivados proteínicos, no precisamente pus (PMNLs); los trofozoitos se encuentran unicamente en la periferia de la lesión. El AHA puede aparcarse la cavidad peritoneal o extenderse hasta involucrar pulmones, pleura o pericardio.

CAPITULO I

1.1) Clasificación de *Entamoeba histolytica*:

Familia: *Endamebidae*

Orden: *Amoebida*

Subphylum: *Sarcodina*

Superclase: *Rhizopoda*

Clase: *Lobosea*

Genero: *Entamoeba*

Especie: *Histolytica*

1.2) Patogénesis de la amibiasis invasiva:

La patogénesis puede ser definida como el conjunto de eventos celulares, reacciones y otros mecanismos que se llevan a cabo en el desarrollo de la enfermedad. Siguiendo una secuencia de eventos, *E. histolytica* causa amibiasis invasiva por: 1) Adherencia a la mucosa, 2) Alteración de las barreras mediante la secreción de enzimas proteolíticas y toxinas, 3) Lisis de células epiteliales e inflamatorias del hospedero de lo cual resulta una ulceración del colon e invasión al hígado, y 4) Resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero [14].

La información existente acerca de la patogénesis de la amibiasis, proviene de estudios fundamentados en el análisis de material de biopsias y necropsias realizadas en individuos con

amibiasis invasora, así como de muestras procedentes de animales a los que se les provoca la enfermedad de manera experimental; también mediante el empleo de líneas celulares en contacto con la amiba o con extractos antigénicos.

Las consecuencias principales de la invasión por *E. histolytica* son: colitis amibiana, disenteria, absceso hepático y otras manifestaciones (apendicitis, amibiasis cutánea, ameboma del colon, focos primarios en pulmón y cerebro); pero todas capaces de evolucionar hasta causar la muerte del hospedero.

1.3) Relación hospedero-parasito:

Actualmente se define la amibiasis como la sola presencia de *E. histolytica* en el cuerpo humano; con o sin manifestaciones clínicas [15], sin embargo la parasitosis del ser humano por *E. histolytica* no implica que todo sujeto parasitado tenga enfermedad amibiana [16], ya que la amiba vive y se desarrolla comunmente en el intestino grueso del hombre. El parásito no siempre agrede al hospedero, sino que en gran número de casos se establece una coexistencia entre el parásito y el hombre, quien se convierte en el portador sano de la amiba [17].

El ciclo de vida de *E. histolytica* es complejo y en él se producen algunos cambios en la morfología del parásito; los más importantes desde el punto de vista médico son quiste y trofozoito o forma móvil. Las formas intermedias como el prequiste y metaquiste son parte del ciclo biológico que no muestran importancia médica [17].

No se conocen con precisión los factores que determinan el cambio de la amiba de parásito inofensivo o comensal (fenómeno mundial) a germen agresivo (con distribución geográfica específica). De manera general, se atribuye a exasperación de su virulencia o bien, a disminución en la resistencia del hospedero o a ambos [18].

En investigaciones de laboratorio se puede inducir la transición de una amiba avirulenta a virulenta, como un proceso gradual, con la simple adición de colesterol libre al medio de cultivo axénico. Se cree que el colesterol o sus derivados alteran el metabolismo de la amiba de tal forma que permiten la producción y liberación activa de enzimas proteolíticas dafinas, a través de los llamados lisosomas de superficie activa. Esto parece atribuir la patogenicidad de la amiba a una característica genética del parásito [19].

Pérez - Bárcenas et al. demostraron (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) que el triptofano es un modulador de la virulencia. Observaron que los animales a los que previamente se les inoculó con cinco diferentes cepas de *E. histolytica* y que posteriormente se alimentaron con frijol (L. triptofano) presentaron un número importante de abscesos y alteraciones histopatológicas comparativamente con los animales alimentados en forma habitual, donde no se presentaron alteraciones.

Es de importancia actual la discusión sobre la existencia de especies de amibas diferentes, obtenidas tanto de portadores sanos como de enfermos. Hecho basado en la observación de que las distintas cepas obtenidas de portadores sanos, difieren de *E.*

histolytica invasora en ciertas propiedades de superficie, tales como : tendencia a aglutinarse en presencia de concanavalina A (lectina), ausencia de carga en la superficie, mayor capacidad eritrofagocítica e incluso la idea de que *E. histolytica* aislada de casos de amibiasis invasora es biológicamente diferente de la que se encuentra en cepas obtenidas de la mayor parte de portadores asintomáticos, demostrado por sus diferentes patrones isoenzimáticos [18].

Trabajos de experimentación basados en la inoculación de diversas cepas de amibas en animales, demuestran que la proporción de animales que desarrollan AHA es diferente de acuerdo con la cepa patógena inoculada (HM1:IMSS, HM2:IMSS entre otras); lo que hace suponer variación en virulencia [19]. Además se cree que en la patogenia de la amibiasis intestinal intervienen de manera importante, las bacterias de la flora intestinal; como se observa en lesiones experimentales, que requieren de la relación de flora bacteriana humana o animal para provocar daño [15].

De los datos anteriores se desprende que la virulencia de la amiba es una propiedad intrínseca de los dos aspectos característicos de cepa: la infectividad o capacidad de colonización intestinal, e invasividad o capacidad de diseminarse y destruir los tejidos del hospedero.

La invasividad parece depender de manera fundamental de otras dos propiedades de los trofozoítos, que son la rapidez de crecimiento y destrucción tisular. Este último hecho es el más relevante de este parásito, e indica dos factores citopatogénicos capaces de lesionar y destruir a las células: los citotóxicos y

citolíticos [16].

En México, donde la frecuencia de amibiasis es de las más elevadas en el mundo, las amibas se observan con mayor frecuencia infectadas por virus. Ciertos trabajos al respecto parecen llevar a la conclusión de que un probable plásmido o factor extracromosomal interviene en la virulencia [15].

Por otro lado no debe pasar desapercibida la interacción entre el parásito y las condiciones del hospedero. De entre los factores que se consideran en tal relación destacan la situación geográfica, raza, sexo, (afecta en especial al varón en una proporción 4:1), edad (existe mayor frecuencia de AHA entre los 30 y 50 años), circunstancias nutricionales, dieta [21], condición inmunitaria, clima local y hábitos sexuales; otros señalan incluso flora bacteriana intestinal, niveles séricos de colesterol y progesterona [22].

Estudios recientes realizados por Burchard, G.D. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex 1989) muestran que pacientes homosexuales europeos que forman parte de los grupos de alto riesgo de SIDA tienen alta prevalencia de infección por *E. histolytica*, pero rara vez desarrollan amibiasis invasiva. Tampoco pacientes africanos presentan correlación entre la infección por HIV y la amibiasis. Sin embargo, Burchard et al. caracterizaron las cadenas proteicas de *E. histolytica* encontradas en pacientes con SIDA para determinar el papel de los mecanismos específicos e inespecíficos de defensa ante la infección amibiana. Ningún paciente de los anteriormente mencionados presentó síntomas clínicos de amibiasis, además todos resultaron ser seronegativos

para el parásito. La amiba aislada se cultivó, el patrón isoenzimático se determinó y el potencial de virulencia se evaluó mediante pruebas de destrucción de células CHO. De acuerdo a los criterios anteriores, las amibas en estudio se consideraron en estado de avirulencia. Los efectos de diferentes tratamientos inmunosupresores tales como irradiación, ciclofosfamida, cortisona e inhibidores en la síntesis de prostaglandinas en los mecanismos específicos de defensa a la infección por *E. histolytica* se evaluaron en ratas y cerdos de guinea. Ninguno de estos pretratamientos condujo a los animales a la invasión por amibas. Por otra parte, los animales a los cuales se les extrajo la mucosa intestinal con soluciones bromadas de cetilpiridina (previamente al enfrentamiento con *E. histolytica*) desarrollaron ulceraciones amebianas.

Estos resultados confirman que *E. histolytica* en Europa no causa síntomas clínicos en pacientes infectados por HIV. Lo anterior fue corroborado por el hecho de que los trofozoítos no invaden el intestino de animales inmunosuprimidos.

Mecanismos inespecíficos de defensa tales como la capa mucosa parecen ser más efectivos en la protección del intestino en contra del parásito.

1.4) Predisposicion genetica a la amibiasis:

Las estadisticas muestran que aproximadamente 1 de cada 300 individuos de los que albergan *E. histolytica* sufren invasion tisular. Estos casos se presentan predominantemente en ciertas zonas de Asia, Africa y Latino America. Los individuos que desarrollan AHA son solo una pequena fraccion de los anteriormente mencionados.

Debido a la alta frecuencia con que se presenta el AHA en la Ciudad de Mexico, J. Arellano y A. Isibasi evaluaron la frecuencia de HLA-A/B y DR en pacientes mestizos con AHA. Del estudio realizado, los investigadores demostraron que existe susceptibilidad racial o familiar a la amibiasis. Encontraron un aumento significativo en HLA-B16 y HLA-DR3 en 31 mestizos mexicanos con AHA. Posteriormente ampliaron el estudio de antigenos HLA-A, -B, y -DR a 110 mestizos mexicanos con AHA, incluyendo el estudio de complotipos C2, C4A, C4B, y Bf en 45 de estos pacientes. Los resultados confirman un aumento significativo en HLA-DR3 (35.5% vs 12.7 % $pc < 0.005$) y en el haplotipo HLA-A2-DR3 (20.9% vs 4.5%, $pc < 0.005$) cuando se compararon con 110 mestizos mexicanos sanos estudiados simultaneamente. El aumento de HLA-B16 no fue confirmado en este estudio mas amplio, ni se encontro asociacion con algun complotipo especifico. La susceptibilidad a la invasion hepatica por *E. histolytica* podria estar asociada al HLA-DR3, que se considera marcador de un gene de respuesta inmune debil, se asocia generalmente a enfermedades cronicas y autoinmunes del higado, y pudiera asi desempeñar un papel importante en la genesis del AHA.

1.5) Mecanismos de adherencia de *E. histolytica*:

La adhesión es determinada por moléculas específicas de la superficie celular, es un factor de virulencia de microorganismos patógenos. En muchos sistemas experimentales, se observa que la adhesión varía según el medio de cultivo.

La adhesión de los trofozoítos amebianos a células blanco es esencial para la citólisis mediada por contacto y para la fagocitosis, además posiblemente está involucrada con la colonización intestinal y la invasión por amebas.

Se han empleado varios modelos experimentales para estudiar la adhesión amebiana, dichos modelos varían en: 1) la clase de células blanco y el tipo de cadenas proteicas amebianas, 2) el medio y condiciones de cultivo, por ejemplo, la adherencia e integridad de la ameba disminuyen en medios con alta concentración de sales, 3) el tratamiento de las células antes de los ensayos de adherencia, 4) la concentración de amebas y la proporción ameba/célula blanco, 5) el tiempo de incubación durante las pruebas de adherencia y 6) los métodos empleados para medir la adhesión amebiana. Se sabe también que el suero de caballo favorece la integridad y viabilidad del trofozoíto, pero tiene un efecto inhibitorio sobre la adhesión.

Cano Mancera et al. encontraron que una lectina, cuya actividad puede ser inhibida por trómeros y tetrómeros de glucosa, N-acetil-D-glucosamina (Glu-NAC), participa en la adhesión de *E. histolytica* a células animales. También encontraron que el sistema de adhesión de los trofozoítos a glóbulos rojos humanos

puede inhibirse por varios monosacáridos y disacáridos que contienen residuos de galactosa (Gal), manosa (Man) y glucosa (Glu). Estos hallazgos indican que al menos tres azúcares diferentes son mediadores en la adhesión amibiana a eritrocitos.

Hace algunos años R. Guerrant y Jonathan I. Ravdin encontraron que concentraciones milimolares de Gal o monómeros de N-acetil-D-galactosamina (Gal-NAC) fueron capaces de inhibir completamente la adherencia de las amibas a células de ovarios de hamster chino (CHO), en tanto que muchos otros monosacáridos no pudieron hacerlo. Glicoproteínas cuyo carbohidrato terminal es Gal, fueron inhibidores de la adherencia 1000 veces más efectivos que la Gal. Se ha logrado que los trofozoitos de *E. histolytica* pierdan su capacidad de adherencia en presencia de Gal a eritrocitos, neutrófilos, células mononucleares y muchas otras células de mamíferos.

Se tienen evidencias de que el enlace de adherencia a la Gal se encuentra en la amiba y no en la célula CHO pues la incubación de trofozoitos con Gal-Nac seguida de lavado tuvo como consecuencia la inhibición de la adherencia a la célula CHO [23].

Para determinar el mecanismo de colonización de *E. histolytica*, se ha estudiado la interacción *in vitro* de los trofozoitos con tejido proveniente del colon. La adherencia de trofozoitos cultivados en medio axénico unidos a timidina tritiada fue especialmente inhibida por GalNac y Gal. Cnacee et al. encontraron que la mucosa del colon humano es un receptor altamente afin a las lectinas de adherencia Gal/GalNac provenientes de amibas [24]. La oxidación o acción enzimática

sobre los residuos de Gal y GalNac tiene como consecuencia una total inhibición de la adherencia [14].

La adherencia de amibas en el colon mediada por lectinas parece facilitar la colonización intestinal, pero la IgH secretoria anti-lectinas podría ser una importante defensa del hospedero para impedir la unión de *E. histolytica* a la mucosa del mismo.

Se tienen evidencias de la existencia de otras proteínas de adherencia presentadas por el parásito, una lectina ambiana que funciona óptimamente a pH ácido y que es inhibida por N-acetil-D-glucosamina (citotriosa) fue aislada recientemente [25]. La citotriosa purificada, de 220 k-Da es capaz de aglutinar eritrocitos humanos y puede competir *in vitro* con trofozoitos por la adherencia a células Madin-Darby de riñón de perro (MDCK) [25]. Se piensa que esta lectina tiene un papel importante en el enquistamiento, posiblemente en la organización de la quitina contenida en la pared del quiste.

A pesar de que la Gal y GalNac inhiben completamente la adherencia de amibas a células CHO, estos monosacáridos no impiden la fagocitosis de células presentadoras por el parásito [26]. Arroyo y Orozco produjeron anticuerpos monoclonales capaces de inhibir la eritrofagocitosis por *E. histolytica* [27].

Recientemente se reportó el aislamiento de un grupo de mutantes de *E. histolytica* deficientes en adhesión, los cuales presentan deficiencia en fagocitosis y citopatogenicidad. La adhesión de la amiba a la célula blanco y la fagocitosis son dos funciones que participan activamente en la agresividad del

parásito.

Leyva-Leyva et al. efectuaron el estudio a nivel molecular del fenómeno de adherencia en mutantes de *E. histolytica* para establecer si su deficiencia en adhesión se relaciona con: a) la carencia de alguna proteína, b) la disminución en el número de moléculas, c) las modificaciones postraduccionales de los polipeptidos que participan en la adhesión. El análisis de los productos de traducción por electroforesis en geles de poliacrilamida, mostró una diferencia notable entre las clonas deficientes en adhesión y la cepa silvestre. Una banda de aproximadamente 40 Kd, presente en la cepa silvestre C9, se encuentra disminuida en una de las mutantes en adhesión (C923). No se detectaron otras diferencias apreciables entre las clonas.

Se han obtenido anticuerpos monoclonales dirigidos contra la superficie de la cepa silvestre de *E. histolytica*, que inhiben la adhesión de la amiba a eritrocitos humanos, la eritrofagocitosis y el efecto citopático de los trofozoítos amibianos sobre monocapas de células epiteliales. Empleando estos anticuerpos monoclonales, Orozco et al. identificaron por inmunotransferencia una proteína de aproximadamente 112 Kd. Esta proteína, a la que denominaron adhemiba 1, se detectó en la clona silvestre y se observó ausente o disminuida en las clonas C98, C919 y C923, las tres mutantes de *E. histolytica* deficientes en adhesión. Experimentos posteriores de inmunoprecipitación de productos de traducción empleando estos anticuerpos monoclonales, indicarán si la proteína de 40 Kd se encuentra relacionada con la adhemiba 1, o se encuentra involucrada en el fenómeno de adhesión en forma independiente de

la adhesión 1, o se trata de una proteína no involucrada en el fenómeno de adhesión.

Ravdin J. I. et al. demostraron que la adherencia de trofozoitos de *E. histolytica* a glóbulos rojos humanos no es específica de grupo pero sí de especie, con adherencia notablemente mayor a eritrocitos humanos tipo O en comparación con eritrocitos bovinos.

Jimenez-Cardoso, Kumate J. et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) comprobaron recientemente que la adherencia de *E. histolytica* puede modificarse por la inhibición de la fosfofructoquinasa dependiente de PPI (pírofosfato).

Orozco et al. utilizando una estrategia genética, demostraron que la fagocitosis es un fenómeno que participa directamente en el mecanismo agresor de la amiba. Estos investigadores aislaron una clona deficiente en fagocitosis que fue no virulenta. Revertantes en virulencia, obtenidas a partir de esta clona, mostraron un aumento en su velocidad de fagocitosis.

El proceso de fagocitosis es muy complejo, en él participan varios eventos, el primero de éstos es la adhesión del trofozoito a la célula blanco. Por lo tanto la deficiencia en fagocitosis mostrada por alguna cepa de *E. histolytica* puede deberse a deficiencias en su capacidad de adherencia a células blanco. Los factores que participan en la fagocitosis y en el efecto citopático de los trofozoitos, medido *in vitro*, participan en la virulencia de las cepas amibianas *in vivo*.

1.6) Capacidad citolítica de *E. histolytica*:

La patología característica de la citólisis en la amebiasis invasiva consiste en la presencia de trofozoítos rodeados por detritus proveniente de la necrosis de eosinófilos.

Hace algunos años se demostró por suspensión de células en dextrana [28], que *E. histolytica* destruye células presentadoras por contacto directo, no así por toxinas secretadas. Después de que la lectina encargada de formar el enlace Gal/GalNac ha terminado de actuar se lleva a cabo la fagocitosis de las células del hospedero que han muerto o están por hacerlo.

La destrucción de neutrófilos, macrófagos activados y linfocitos T por amebas es inhibible con Gal. Estudios en los que se emplean células CHO mutantes en la glicosilación (Ravdin et al. dato inédito) muestran que mutantes carentes de residuos de Gal o GalNac en la superficie celular son resistentes a la citólisis amebiana. Dichos estudios muestran también que la formación del enlace Gal/GalNac por la lectina amebiana antes mencionada es suficiente para la iniciación del proceso citolítico. Esta lectina podría contribuir directamente en la destrucción de la célula blanco, posiblemente mediante la inducción de un aumento del calcio intracelular de esta [29].

La citólisis de células blanco por *E. histolytica* depende en gran medida de la participación de los microfilamentos del parásito y de la actividad enzimática de la fosfolipasa A (PLA). Long-Jrug et al. [30] encontraron que los trofozoítos de *E. histolytica* contienen dos PLA diferentes: la primera es

dependiente de la presencia de calcio, presenta actividad óptima a $\text{pH}=7.5$, la segunda es independiente de calcio y su actividad óptima se presenta a $\text{pH}=4.5$. Inhibidores farmacológicos de las enzimas PLA dependiente de calcio impidieron la citólisis de células CHO por el parásito. Estos estudios muestran que PLA provenientes de *E. histolytica* promueven la adherencia del parásito a células blanco, por lo cual tienen un papel fundamental en la citólisis de estas.

J. I. Ravdin et al. midieron el pH de las vacuolas amebianas empleando isotiocianato de fluoresceína unido a dextrana; el pH encontrado fue aproximadamente de 5.1. Concentraciones de NH_4Cl capaces de aumentar el pH de la vacuola hasta 5.7 inhibieron la destrucción de células CHO por las amebas.

Los ésteres tales como el PMA son activadores específicos de cinasas C, por lo que pueden incrementar la velocidad de citólisis de células blanco sin promover la adherencia de amebas a éstas.

La posible participación del calcio en los pasos posteriores de la adhesión de la ameba a la célula blanco se estudió y se encontró que la concentración de calcio libre intracelular en neutrófilos y células CHO aumenta irreversiblemente a los 30-300 segundos de que ha tenido contacto con la ameba. En cambio los trofozoítos rara vez mostraron incrementos en el nivel de calcio. En consecuencia, se piensa que el calcio no tiene el papel de mensajero involucrado en la iniciación de adherencia o citólisis que lleva a cabo el parásito. Posiblemente el calcio sí interviene en el interior de la célula blanco, pues al elevarse los niveles

de éste después de la formación del enlace Gal\GalNac tal vez se lleve a cabo la activación de DNAsas, fosfolipasas y proteasas endógenas de la célula blanco, lo cual contribuye en la destrucción de ésta.

Hernández R, Keene W. E. et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) estudiaron la relación entre la actividad secretoria de los trofozoítos de *E. histolytica* y la virulencia del parásito. Para ésto, aislaron y caracterizaron dos mutantes deficientes en virulencia, las clonas T-42 y T-63. Los trofozoítos de estas clonas fueron deficientes en adhesión y en fagocitosis de eritrocitos, mostraron baja capacidad para dañar células epiteliales en cultivo y para producir abscesos hepáticos en hamsters inoculados intraportalmente. Para estudiar la capacidad secretoria de las clonas se determinó la producción de la proteasa neutra principal. Las clonas T-42 y T-63 produjeron cantidades mayores o similares a la clona silvestre, sin embargo secretaron 9% y 12% respectivamente de la proteasa total producida, mientras que la clona silvestre secretó el 38%. Se confirmó que la actividad proteolítica detectada en las secreciones y lisados de las mutantes amibianas correspondía a la proteasa neutra principal, se purificó la enzima a partir de la mutante hiperproductora deficiente en secreción T-42. Estos resultados apoyan la teoría de que los trofozoítos secretan enzimas proteolíticas y sustancias con actividad citotóxica, las cuales participan en la agresividad del parásito; además confirman que la proteasa neutra principal desempeña un papel importante en la expresión de la virulencia de *E. histolytica*.

CAPITULO II

FACTORES PREDISPONENTES A LA INFECCION

2.1) Factores de virulencia del parásito:

Factores quimiotácticos: Estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que *E. histolytica* secreta factores quimiotácticos para polimorfonucleares y neutrófilos de humanos [1]. La quimiotaxis es un elemento importante en la patogénesis de la amibiasis invasiva.

El movimiento amibiano es el resultado de un complejo conjunto de eventos tales como la extensión de pseudópodos, movimiento citoplásmico y de membrana, contracción de la célula completa y adhesión de ésta con el sustrato.

Durante la fase vegetativa, las células amebianas se encuentran como fagocitos con capacidad de división celular y con la cualidad de ser quimioatrayentes para el ácido fólico liberado por bacterias, que representa su principal recurso de sobrevivencia. Cuando la fuente de bacterias se acaba, la ameba se ve obligada a sintetizar receptores quimiotácticos para AMP cíclico.

Gerisch et al. demostraron que las amebas son capaces de trasladarse hacia un recurso quimioatrayente. Se ha observado que la extensión de pseudópodos se presenta aproximadamente de 15 a 30

segundos después del contacto de la célula con el quimioatrayente. La extensión de pseudópodos es por lo tanto una de las primeras respuestas morfológicas a la estimulación con agentes quimiotácticos. El sitio específico en la célula del cual se extienden los pseudópodos y su dirección de crecimiento parecen determinar la subsecuente polaridad, locomoción y por lo tanto quimiotaxis de la célula. Estas observaciones indican que el problema de la quimiotaxis puede ser reducido, en una primera aproximación, a cómo la estimulación quimiotáctica resulta en extensión de pseudópodos. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la extensión de pseudópodos es desconocido, pero se tienen dos ejemplos de células eucariotes en las cuales la extensión de pseudópodos es dirigida en parte por la polimerización localizada de actina [2].

Las señales extracelulares pueden promover la extensión de pseudópodos mediante la estimulación de sitios activos de polimerización de actina en la corteza celular, de lo cual resulta la formación de enlaces cruzados de actina que forman una estructura rígida.

Estudios con inmunofluorescencia indican que la actina, en particular la F-actina, está concentrada en pseudópodos. [3].

Para determinar si la extensión de pseudópodos está correlacionada con la polimerización de actina, Condeelis et al. [2] midieron el contenido de F-actina en las células. Comprobaron que con ácido fólico y con AMP cíclico la polimerización de actina ocurre al poco tiempo de la estimulación con los quimioatrayentes.

Dicho proceso presenta un punto máximo de F-actina entre los 5 y 10 segundos, seguido de un descenso en el contenido de la misma que alcanza el punto mínimo a los 20 segundos. El contenido de F-actina previo a la estimulación es aproximadamente del 35-40% de la actina total de la célula, en tanto que el contenido observado después de la estimulación es de 55-65% de la actina total de la célula.

La segunda parte del proceso de extensión de pseudópodos implica que los filamentos de actina presentados en respuesta a la estimulación, se presenten en forma entrecruzada para formar una estructura lo suficientemente rígida para extender la superficie celular. Estudios efectuados por Condeelis et al. demuestran que una proteína denominada ABP-120 se concentra con F-actina en los nuevos pseudópodos y la miosina II adquiere una distribución reticular en la corteza celular. Estos resultados sugieren que ABP-120 es responsable del entrecruzamiento de la F-actina. Lo anterior ha sido confirmado en estudios *in vitro*, en los cuales ABP-120 ha entrecruzado F-actina [2].

El mecanismo mediante el cual la polimerización de actina se relaciona con la estimulación de hormonas es desconocido [4], pero se tienen evidencias de que concentraciones fisiológicas de calcio parecen ser suficientes en algunos casos para para la estimulación hormonal que conduce al ensamble del citoesqueleto. El diacil-glicerol y el PIP2 son segundos mensajeros involucrados en el ensamble de actina estimulado por ligantes extracelulares, ambos son difusibles al menos en el plano de la membrana. El

estímulo de trombina a las plaquetas, causa un aumento en la hidrólisis de PIP₂ y acumulación de diacil-glicerol.

Si los componentes de actina del citoesqueleto funcionan como efectores durante la señal de transducción, entonces el nucleótido regulatorio de guanina (proteínas G), debe estar directamente involucrado en regular la asociación de complejos hormona-receptor con el citoesqueleto de actina, porque las proteínas G han mostrado ser mediadores de comunicación en otros sistemas.

Existen varias clases de proteínas en la corteza de amibas con capacidad de formar enlaces de actina, algunas son la ABP-240, ABP-220, ABP-120, miosina I y II, γ -actinina, etc.

2.2) Virulencia y cadenas patogénicas:

Diversas teorías se han postulado respecto a las propiedades específicas de los trofozoitos de *E. histolytica* que participan en su virulencia, éstas incluyen la fagocitosis, el efecto citopático sobre células en cultivo a la actividad de toxina de los extractos amibianos, la aglutinación con lectinas, la ausencia de carga neta de superficie, la actividad de colagenasa [5], la actividad formadora de canales en liposomas [6], la actividad de lectina de los trofozoitos y sus extractos, entre otras. Sin embargo no se ha logrado determinar si estos factores tienen un papel importante en la expresión de la virulencia amibiana, o si se trata de fenómenos que aunque correlacionan con la virulencia de las cepas, no toman

parte activa en el mecanismo agresor del parásito.

La diferenciación entre cadenas virulentas y no virulentas de *E. histolytica* se debe al estudio de los zimodemos ambientales [7]. Sargeant y colaboradores han clasificado de esta manera a las cepas obtenidas de pacientes infectados, esto es, midiendo el corrimiento electroforético en gel de cuatro enzimas: glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, l-malato: NADP (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato) oxidoreductasa y hexocinasa [8]. *E. histolytica* aislada de pacientes con amibiasis invasiva presenta zimodemos diferentes de los que presentan las amibas aisladas de pacientes asintomáticos [7].

Aun no se sabe si las amibas tienen capacidad de cambiar de zimodemo in vivo, pero amibas virulentas en cultivo axénico conservan su patrón de zimodemo.

Experimentos in vivo han canalizado la atención a la asociación de *E. histolytica* con bacterias, pues dicha asociación facilita el desarrollo inicial de las amibas en el medio de cultivo [9]. Wittner y Rosenbaum demostraron que las amibas requieren asociación directa con bacterias viables para ser virulentas, aunque ningún factor de virulencia soluble ha sido demostrado por dichos investigadores [10].

Brecha et al. demostraron que bacterias que en su superficie celular presentan sustancias que se unen con manosa, son ingeridas por amibas, y en cambio las bacterias no unidas a manosa son ingeridas por las amibas mediante opsonización con anticuerpos específicos antibacterianos [11]. Las amibas también ingieren

directamente bacterias que presentan residuos de galactosa o N-acetil-D-galactosamina (GalNac) en su superficie, tales como *Escherichia coli* O55. Bracha y Nirelman recientemente demostraron que se lleva a cabo un aumento en la virulencia de las amibas luego de su incubación con bacterias viables, ya que éstas suelen adherirse a las amibas [12]. Las bacterias que han sido inactivadas con calor, fijadas con glutaraldehído o expuestas a inhibidores de síntesis de proteínas, no aumentaron la virulencia amibiana. Los autores concluyeron que las bacterias posiblemente consumen las moléculas oxidadas, estimulando de esta manera el sistema de transporte de electrones de la amiba.

Al parecer, la asociación de bacterias con amibas no es un factor definitivo para la existencia de amibiasis invasiva, pero dicha asociación podría favorecer la colonización intestinal mediante la disminución del potencial oxido-reductor en el colon, facilitando así la adherencia del parásito a la mucosa intestinal. Podría pensarse también que la presencia de bacterias en el colon disminuye la cantidad de recursos nutricionales para las amibas, por lo cual éstas se ven obligadas a incrementar su actividad metabólica. [13].

Los factores nutricionales del hospedero también se relacionan con el grado de invasión tisular de la amiba, así un estado de desnutrición se asocia con enfermedad amibiana invasora [14]. El hierro es requerido por la amiba para crecer en cultivos axénicos [15]. Aunque la ingesta de hierro por el hospedero parece incrementar la invasividad en infecciones experimentales *in vivo*,

los estudios en humanos no revelan correlación alguna entre la amebiasis invasiva y los niveles séricos de hierro o el porcentaje de saturación de proteínas que forman enlaces con este [15].

Varios investigadores han observado un aumento en la virulencia debido a la exposición del parásito al colesterol *in vitro* o en inoculaciones directas al hígado [16], la virulencia permanece alterada por semanas. Es probable que el colesterol o sus derivados alteren el metabolismo de la ameba de tal manera que permitan la producción y liberación activa de enzimas proteolíticas.

La expresión de algunos factores de virulencia por *E. histolytica* involucra los pasos de adhesión, citólisis dependiente de contacto y/o fagocitosis y degradación intracelular. En algunos organismos eucarióticos estos procesos están regulados por la calmodulina (CaM). Con base en lo anterior, Arias Negrete et al. determinaron la participación de Ca^{2+} -CaM en estos procesos. Se evaluó de manera directa mediante la utilización de antagonistas de CaM tales como la TFP y W-7. Los trofozoítos de *E. histolytica* se preincubaron con dichos antagonistas de CaM, posteriormente se determinó su capacidad eritrofagocítica y citotóxica empleando como blanco células nucleadas de bazo de ratón. Los resultados encontrados indican que la TFP (15 μ M) inhibió la actividad eritrofagocítica hasta en un 25% como máximo. Concentraciones mayores resultaron tóxicas para los trofozoítos. El compuesto W-7 (36 μ M) inhibió la fagocitosis por amebas en un 34% como máximo, concentraciones mayores no aumentaron el efecto inhibitorio. La

preincubación de los trofozoitos con W-7 (62 μ M) durante 60 minutos produjo una disminución en la actividad fagocítica de un 5%. Los trofozoitos preincubados con IFP presentaron una disminución del 66% en su actividad citotóxica. También se evaluó el efecto de los antagonistas sobre *E. histolytica*. IFP (15 μ M) y W-7 (150 μ M) inhibieron el crecimiento en un 94 y 72% respectivamente. Estos resultados sugieren que la CaM juega un papel importante en los procesos de expresión de la actividad citotóxica y eritrofagocítica.

2.3) Toxinas secretadas y citólisis dependiente de contacto:

Se aislaron de *E. histolytica* numerosas enzimas proteolíticas, todas éstas son inhibidas por el suero y deben tener un contacto directo con el tejido para realizar su efecto. Se purificó hialuronidasa, sin embargo aun no se ha relacionado con patogenicidad. También se aisló tripsina, pepsina, gelatinasa, enzimas hidrolíticas para caseína, fibrina y hemoglobina [17]. Estudios realizados por Lushbaug concentraron su atención en una proteasa amibiana, es una protefna parecida a la catepsina [18]. Dicho autor encontró que cepas virulentas tienen mas capacidad enzimática por miligramo de protefna amibiana que cepas menos virulentas; aun no se ha demostrado que esta proteasa sea citolítica.

Muñoz et al. [19] demostraron que las amibas presentan actividad de colagenasa en ciertas fracciones de la membrana

celular. Dicho efecto fue demostrado unicamente mediante el contacto directo del colageno con las amibas. No se encontró actividad de colagenasa en sobrenadantes amibianos. Lundblad et al. purificaron β -N-acetilglucosaminidasa de dos cadenas axénicas de *E. histolytica* (HK-9 y H-200 NIH) que secretan la enzima al medio de cultivo [20]. Los autores postularon que esta enzima no tiene papel alguno en la lisis de los eritrocitos fagocitados. Wermes et al. purificaron la N-acetilglucosaminidasa secretada por amibas y estudiaron la actividad óptima de esta hidrolasa. La preferencia de esta enzima por ciertos sustratos fue interpretada por los autores como una probable participación de esta en la exquistación [21].

Aunque la actividad de enzimas secretadas no parece ser responsable del efecto letal o citolítico observado en cultivos celulares, los resultados obtenidos sugieren que las enzimas proteolíticas amibianas posiblemente interfieren en la adhesión célula-célula y en la integridad de la mucosa intestinal [13].

2.4) Citotoxinas liberadas por *E. histolytica*:

La secreción de enterotoxinas y citotoxinas se postula como un mecanismo que contribuye a la enfermedad en el hombre [22]. Se tienen evidencias de que el daño a la mucosa intestinal se produce en el sitio en el que se adhieren las amibas [23], aunque dichos estudios no excluyen el efecto causado por las citotoxinas y enterotoxinas.

El primer reporte de una citotoxina-enterotoxina ambiental se dio por Lushbaugh et al. [24], en el cual un sonificado de ambas presentó actividad de enterotoxina en intestino de conejo, no fue letal para las células pero presentó actividad de lectina [25].

Bos et al. encontraron que la citotoxina ambiental sensible al suero tiene un punto isoeléctrico de 4.5-5.0, es estable a un pH de 4-10 y es capaz de unirse a una columna de concanavalina A [26]. En estos estudios el suero disminuyó la destrucción dependiente de contacto de células de riñón de hamster. Los autores sugieren que dicha citotoxina posiblemente tiene algún papel en el evento mediado por contacto. La actividad citoletal de proteínas ambientales se estudió por Lopez-Revilla et al. quienes encontraron actividad hemolítica en extractos ambientales. Dicho efecto fue mayor en eritrocitos de roedores que en glóbulos rojos humanos [27].

La actividad hemolítica fue localizada en un fragmento vesicular, fue máxima a pH de 8 en presencia de calcio 1M y se perdió mediante calentamiento a 90° C. Mc Grown et al. purificaron parcialmente una citotoxina liberada de sobrenadantes ambientales mediante precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel de sefadex [28]. La citotoxina ambiental inhibió la incorporación de timidina tritiada en células blanco. Su pH óptimo resultó ser de 6.0-7.2 y fue inhibida por inhibidores de proteasas, además resultó ser inmunogénica. La virulencia *in vitro* fue directamente proporcional a la actividad citotóxica de las cadenas ambientales.

Existen numerosas sustancias que podrían participar en el

mecanismo de daño celular, tales como la citolisina, lipasa, colagenasa, proteasas, histolisina, proteína formadora de poros y hemolisina. También se pueden incluir las enterotoxinas, de las cuales se han caracterizado dos componentes enterotóxicos/citotóxicos (cuya actividad podría estar dirigida a la activación de adenilato ciclasa con aumento resultante de AMP cíclico). Son sustancias aparentemente relacionadas con la membrana ambiente que requieren de cambios en su permeabilidad [29].

Las alteraciones en células epiteliales observadas, previo contacto con cepas patógenas consisten en acortamiento y desaparición de microvellosidades, modificaciones en la permeabilidad de la membrana y formación de pequeñas discontinuidades o canales, con desaparición de las unidades intracelulares, redondeamiento y desprendimiento de las células epiteliales que tuvieron contacto con la amiba. La célula ya dañada, presenta aclaramiento en su citoplasma, edema de mitocondrias, dilatación del retículo endoplásmico rugoso y desaparición de la membrana plasmática [30]. La actividad citolítica de *E. histolytica* es multifactorial ya que junto con los efectos químicos, se observan peculiares efectos mecánicos como el "pinzamiento" y levantamiento de células epiteliales en sustratos *in vitro*.

2.5) Mecanismos citolíticos dependientes de contacto:

El efecto citoletal rápido de *E. histolytica* ocurre solamente cuando se lleva a cabo el contacto directo con la célula blanco [31].

La adherencia amibiana es seguida por la citólisis, que precede a la fagocitosis. Esta última también puede llevarse a cabo aunque se inhiba la adherencia específica de GalNac y los mecanismos citolíticos [32], posiblemente no se realice vía mecanismos de adherencia o adhesinas de superficie.

Los mecanismos mediante los cuales las amibas lisan células son dependientes de la temperatura, su actividad óptima se presenta a 37 °C.

Trissi et al. demostraron la presencia de una mayor carga negativa en la superficie de amibas axénicas que en monoxénicas, estas observaciones sugieren que la virulencia puede estar asociada con una reducción en la carga negativa de la superficie amibiana [33].

Estudios recientes indican que cambios del flujo de iones de membrana en la célula blanco y en la amiba son involucrados en la destrucción de la célula blanco. Ravidin et al. encontraron que los bloqueadores lentos de canales del flujo de Na^+ y Ca^{2+} son capaces de inhibir la citólisis de células CHO por amibas, en tanto que bloqueadores rápidos de dichos canales no presentaron efecto alguno. Estos hallazgos indican que cambios a nivel de membrana en amibas y células blanco, están involucrados en la lisis de células

blanco. Existe un experimento que confirma el papel del calcio en este evento, consta de una suspensión de amibas con células blanco en un medio libre de Ca^{2+} debido a la presencia de EDTA. Bajo estas condiciones fue inhibida la lisis de células blanco. Este efecto inhibitorio puede eliminarse por la adición de $CaCl_2$ extracelular. La fosfolipasa A hidroliza diacilfosfolípidos tales como la fosfatidilcolina, con la producción de lisodiacilfosfolípidos citolíticos y ácidos grasos libres [35]. Kavdin et al. encontraron que la citólisis de células blanco por amibas es inhibida por antagonistas farmacológicos de fosfolipasa A tales como fosfatidilcolina e hidrocortisona. Sonicados de trofozoitos de *E. histolytica* presentan dos máximos en la actividad de la fosfolipasa A: la actividad independiente de Ca^{2+} , óptima a pH=4.5, y la actividad dependiente de Ca^{2+} óptima a pH=7.5. Los antagonistas farmacológicos antes mencionados capaces de inhibir la citólisis también inhibieron la actividad dependiente del Ca^{2+} .

Drozco et al. demostraron que cionas deficientes en fagocitosis presentan capacidad citolítica disminuída in vitro, dichas cionas son menos aptas para ocasionar absceso hepático en hamsters.

CAPITULO III. A

RESPUESTA A LA INFECCION POR *Entamoeba histolytica*

3.1) Mecanismos de defensa no inmunes:

Las barreras a la infección para parásitos intestinales incluyen el pH ácido del estómago, enzimas digestivas, competencia con la flora normal intestinal y la protección que proporciona la mucosa intestinal. Las mucosidades entéricas parecen ser la principal defensa del hospedero contra la invasión por *E. histolytica* pues funcionan como receptor de trofozoítos, impidiendo así el contacto directo de éstos con células epiteliales. Chadee et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) encontraron que trofozoítos amibianos promueven la secreción de la mucosa intestinal de ratas. La acción de la mucosidad es simplemente mecánica pues atrapa a los trofozoítos impidiendo la movilidad de éstos.

3.2) Respuesta inmune a la amibiasis:

Se ha demostrado que las reacciones inmunitarias de la amibiasis se ajustan a los principios generales de la inmunología, es decir son reacciones semejantes a las que ocurren en cualquier otra infección y por consiguiente, participan tanto los fenómenos

de inmunidad humoral, dependientes de linfocitos B; como los de inmunidad celular, dependientes de los linfocitos T. Es probable que además intervengan otros fenómenos de inmunidad inespecífica, propios de la defensa orgánica contra agresiones externas [1].

3.3) Inmunidad humoral:

La inmunidad humoral se caracteriza por la presencia de anticuerpos circulantes que se identifican por medio de diversas técnicas para reacciones serológicas: inmunodifusión en gel de agar, fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, aglutinación de látex y contraelectroforesis [1].

Estas diversas reacciones son de gran utilidad en el diagnóstico serológico de la amibiasis invasora, particularmente en el AHA y en otras formas graves de la enfermedad, en las que la respuesta inmunológica es más intensa. Sepúlveda, B. et al. afirman que de estas pruebas, las más sensibles son la aglutinación indirecta y contraelectroforesis.

Sepúlveda subraya el hecho de que los anticuerpos específicos persisten años después de curada la amibiasis invasora y que con toda probabilidad, aparecen también después de infecciones subclínicas como ocurre en muchas otras enfermedades infecciosas. De este hecho se derivan dos consecuencias: la primera, que es preciso interpretar los resultados del estudio serológico de conformidad con el conjunto de datos clínicos, a fin de darles su

justo valor, ya que una reacción positiva puede ser sólo una secuela de reacción amibiana previa. La segunda consecuencia es que la presencia de los anticuerpos circulantes tiene mucha utilidad para los estudios seroepidemiológicos.

Estudios diversos confirman que los anticuerpos inducidos por amibas se encuentran principalmente en la inmunoglobulina G, en menor proporción también se presentan en la inmunoglobulina M. Se sabe que también la inmunoglobulina A del suero está elevada en pacientes con AHA, pero se desconoce su papel en la reacción inmunitaria. En lo que respecta a la inmunoglobulina E, se puede decir que no se ha detectado su presencia en el suero inmune.

La mayor parte de los antígenos de *E. histolytica* que provocan la formación de anticuerpos específicos se encuentran en la superficie exterior de la amiba.

En investigaciones sobre la purificación del antígeno de *E. histolytica* por filtración en gel se aislaron siete fracciones, cuyos pesos moleculares variaron entre 1,450 y 650,000. La mayor capacidad antigénica se encontró en las dos primeras fracciones, con peso molecular de 650,000 y 229,000 respectivamente [1].

Sepulveda resume en los siguientes puntos las investigaciones llevadas a cabo en su centro de estudios:

- 1) El suero humano inmune y la globulina gamma aislada del propio suero tienen efecto inhibitor en el desarrollo de cultivos de *E. histolytica*. La globulina gamma comercial no tiene este efecto inhibitor. El suero humano inmune, además neutraliza la virulencia de cultivos de *E. histolytica* patógenos.

2) El suero humano inmune tiene efecto citolítico sobre los trofozoítos de *E. histolytica*, de manera que más del 90% de las amibas se encuentran destruidas en los primeros 60 minutos de contacto con el suero.

El suero humano inmune pierde el efecto citolítico antiampibiano con el calentamiento a 56° C y recupera dicho efecto si se le agrega complemento de cobayo.

La globulina gamma aislada del suero humano inmune tiene efecto citolítico sobre los trofozoítos de *E. histolytica* semejante al suero inmune pero de menor intensidad. El calentamiento de la globulina gamma a 56° C por 30 minutos, o bien la adición de complemento de cobayo, no modifica el efecto citolítico de la misma. La globulina gamma comercial carece del efecto mencionado. Con toda probabilidad, el efecto citolítico de la globulina gamma inmune en ausencia de complemento se ejerce por la penetración del anticuerpo específico dentro de la amiba, gracias a la pinocitosis activa efectuada por el parásito.

5) La absorción del suero y de la globulina gamma inmunes con cultivo de amibas o con antígeno liofilizado elimina el efecto citolítico de ambos sobre los trofozoítos de *E. histolytica*. Al mismo tiempo que se pierde el efecto citolítico, la reacción de contrainmunolectroforesis se vuelve negativa en el suero como en la globulina gamma inmunes.

6) La inyección de suero humano en el hamster confiere protección parcial, probablemente del tipo de la inmunidad pasiva contra la inoculación intrahepática de *E. histolytica* virulenta.

Este conjunto de datos puede apoyar la interpretación de que los anticuerpos específicos tienen acción antiambiana protectora y que contribuyen a la defensa inmunitaria contra la infección.

Es muy controvertida la idea de que los anticuerpos inducidos por ambas son o no protectores. En relación a esto, algunos autores afirman que la amibiasis intestinal puede recurrir a pesar de que el individuo afectado presente altos títulos de anticuerpos [2].

Diversos estudios comprueban la presencia de coproanticuerpos de la clase IgA en la amibiasis intestinal. Dichos anticuerpos persisten por muy poco tiempo.

Autores como Trissi D. [2] afirman que las respuesta humoral comunmente observada en la amibiasis invasiva, no parece ser efectiva en el control o protección contra dicho padecimiento. La presencia de anticuerpos sericos puede emplearse como marcador en la infección invasiva.

I.G. Kagan hace la observación de que la presencia de anticuerpos usualmente se asocia con resistencia, pero solamente aquellos anticuerpos que confieren inmunidad pasiva pueden considerarse protectores. Dicho autor cita a Swartzwelder, como uno de los pocos investigadores que han practicado la transferencia pasiva de anticuerpos con un pequeño grupo de perros. Los resultados obtenidos en este experimento fueron negativos.

La amibiasis sin embargo, induce un amplio espectro de anticuerpos, especialmente cuando invade tejidos. Con estudios de

pruebas cutáneas, se propone la presencia de anticuerpos IgE que pueden unirse a basófilos.

Un mecanismo probable de contribución a la patología de la amibiasis invasiva es la producción de IgE en el intestino. Los antígenos secretados por ambas reaccionan con las IgE presentes en la superficie celular de basófilos, de lo cual resulta una degranulación y liberación de sustancias farmacológicamente activas que lesionan al intestino. La posterior infiltración de eosinófilos en la pared intestinal puede neutralizar los efectos de la histamina y otras sustancias activas liberadas por basófilos.

Los resultados reportados referentes a pruebas cutáneas son difíciles de evaluar debido a una falta de apreciación, ya que distintas reacciones pueden llevarse a cabo simultáneamente. La reacción inmediata se asocia con anticuerpos IgE, desarrolla minutos después de la inyección con el anticuerpo y alcanza el máximo entre los 15 y 30 minutos, para desaparecer por completo a las 2 horas. La segunda reacción es de tipo Arthus, es mediada por complejos antígeno-IgG en presencia de complemento. Dicha reacción desarrolla después de 4 o 5 horas y puede persistir por 24 horas o más. El tercer tipo de reacción es de tipo retardado, es mediada por células. Difícilmente puede detectarse antes de 12 horas.

Cada tipo de reacción puede caracterizarse histológicamente por el tipo de células que la promueven. La reacción inmediata mediada por IgE la infiltración celular es predominantemente de eosinófilos. En la reacción de tipo Arthus se encuentran

predominantemente neutrófilos, y la reacción retardada está mediada principalmente por células mononucleares epiteliales.

En estudios realizados por Isibasi, A; Kumate, R. et al. se afirma que en los fluidos intestinales los anticuerpos predominantes son los de la clase IgA secretoria y estos inhiben la adherencia de bacterias en forma específica a las células epiteliales [3]. Este mismo mecanismo podría ser evocado en la interferencia de la adherencia en trofozoítos de *E. histolytica* a las células epiteliales del intestino, ya que IgA secretoria reacciona con antígenos de superficie de la amiba [4]. Los anticuerpos de la subclase IgA 2, que son los más abundantes en secreciones, contienen más residuos de N-acetil-D-galactosamina en su fragmento Fc por lo que es posible que a través de sus azúcares, interfieran en forma específica con la adherencia de trofozoítos a las células epiteliales [3]. Los autores antes mencionados encontraron que el calostro humano concentrado 25 veces sin anticuerpos anti *E. histolytica* inhibe su adherencia a los eritrocitos humanos, posiblemente por la participación de algunos componentes del calostro como IgA secretoria. La fracción carente de inmunoglobulinas de la leche y calostro humano inhibe la adhesión de bacterias a eritrocitos humanos [5].

La inhibición del receptor para eritrocitos humanos por IgA secretoria humana inespecífica puede deberse al alto contenido en carbohidratos como la N-acetil-D-galactosamina en esta inmunoglobulina, que es el monosacárido reconocido por el receptor tipo lectina presente en la membrana de la amiba. De esta manera

el calostro y el liquido intestinal rico en anticuerpos IgA secretorios, pueden inhibir la adherencia de las amibas a las celulas epiteliales del intestino de un hospedero susceptible (3).

Los anticuerpos especificos anti-amiba presentes en los sueros de pacientes con AMIA, calostro humano, gamma globulina humana y de conejo anti-amiba, IgA secretoria humana y de rata son capaces de provocar el desprendimiento de los trofozoitos al interactuar con los antigenos en la superficie de la amiba. La inhibicion en la formacion de rosetas puede deberse al bloqueo especifico de los receptores para eritrocitos humanos.

De los estudios antes mencionados se deduce que los anticuerpos IgA secretorios pueden inhibir la adherencia de los trofozoitos a las celulas blanco por dos mecanismos: el primero es inespecifico, mediado por carbohidratos como la N-acetil-D-galactosamina. El segundo es un mecanismo especifico que mediante el sitio activo de la IgA, reconoce determinantes antigenicos presentes en la superficie de los trofozoitos amibianos.

La proteccion de los recién nacidos en contra de *E. histolytica*, depende en sus primeros dias de la presencia de anticuerpos especificos transmitidos transplacentariamente, ya que el neonato no presenta niveles significativos de IgA en secreciones intestinales hasta las dos o tres primeras semanas de vida. La ingestion de calostro refuerza la inmunidad pasiva. Asi mismo por un mecanismo no dependiente de anticuerpos, los trofozoitos amibianos son destruidos al ponerse en contacto con

leche humana, debido probablemente a la acción de enzimas presentes en dicho fluido [6].

La importancia de la lactancia materna también ha sido reforzada por la demostración de la actividad amebicida *in vitro* de los macrófagos de calostro sobre los trofozoítos de *E. histolytica* [7].

Es posible que mujeres jóvenes contengan anticuerpos específicos contra diferentes constituyentes de la ameba y sean excretados en el calostro durante el puerperio.

3.4) Complemento:

El suero de pacientes que presentan anticuerpos contra *E. histolytica* funciona como amebicida contra trofozoítos mediante la activación de la vía clásica o alterna del complemento. Los hamsters que sufren depleción de complemento *in vivo* mediante la acción del veneno de cobra presentan mayor susceptibilidad a la formación de AHA [13]. En relación a lo anterior, algunos autores consideran que la amebiasis invasiva se debe a cepas de *E. histolytica* resistentes a la acción del complemento.

Reed et al. estudiaron la susceptibilidad al complemento de cepas virulentas y no virulentas. Los resultados que encontraron sugieren que la resistencia a la lisis mediante complemento es un factor indispensable para la invasión y diseminación *in vivo*.

El papel del complemento en la prevención de la invasión de la mucosa es incierto debido a que en secreciones del tubo digestivo, que es donde el parásito reside, no se encuentra casi complemento libre.

Al parecer, los mecanismos humorales son de importancia directa en la inmunidad contra cadenas amebianas sensibles a la acción del complemento.

En estudios realizados por Ortiz-Ortiz et al. [11] se demostró que trofozoitos de *E. histolytica* tienen capacidad de activar al complemento humano en ausencia de anticuerpos. Al incubar trofozoitos con suero humano normal, se observó el consumo de las proteínas de la vía alterna, lo cual indica que las amebas activan selectivamente dicha vía. Además, la lisis de células amebianas se realizó en ausencia de Ca^{2+} .

En un estudio realizado por Calderón, J. y Schreiber R.D. [8] la presencia de la proteína C3b en la membrana amebiana se usó como indicador de interacción directa entre parásito y complemento. Mediante el uso de suero depletado en algunos casos de su función alterna y en otros casos de su función clásica, se comprobó que los trofozoitos pueden activar ambas vías en suero no inmune. La activación de la vía clásica fue de mayor magnitud que la activación de la vía alterna, tanto en el aspecto cinético como en el cuantitativo, y condujeron a la lisis de la ameba. Para obtener suero depletado de la función clásica, se efectuó la adsorción del factor C4 en columnas con anticuerpos específicos para dicho factor. En cambio el suero depletado de la función

altrena se obtuvo mediante cromatografía, mediante la extracción de los factores C1q y D. Estos estudios demuestran que *E.histolytica* HMI puede activar la vía clásica en ausencia de anticuerpos. Este fenómeno no puede atribuirse al uso particular de una cadena proteica ambiana pues en los estudios realizados por Calderon, J. y Schreiber R.D. no se observaron diferencias entre la cepa HMI y la HM9. Dichos autores reportan que en sus estudios con suero humano normal carente de los factores C1q y D, se observó un 6% de consumo de C3 y un 84% de lisis con suero reconstituido con C1q, 17% de consumo y 46% de lisis en presencia del factor D, 33% de consumo y 93% de lisis cuando ambas vías fueron reconstituidas. Por lo tanto, en estas condiciones, la lisis y la presencia de C3 en la membrana del parasito fueron los indices mas confiables de medición de activación del complemento, es decir que no consideraron confiable evaluar el consumo de los componentes del complemento en el suero.

Existen varias partículas biologicas capaces de activar la via clásica en ausencia de anticuerpos, tales como bacterias, virus, carbohidratos [8].

Musoke y Barbet [9] demostraron que un antígeno variable de *Tripanosoma brucei* puede activar la vía clásica del complemento en ausencia de anticuerpo específico. Por lo tanto, la activación de ambas vías por *E. histolytica* parece deberse a un sistema análogo a los anteriormente mencionados.

Hasta el momento, no se han encontrado elementos que relacionen el desarrollo de la enfermedad con deficiencias en el sistema del

complemento [8]. El parásito por sí mismo, puede sufrir alteraciones que le permitan no ser reconocido como extraño, o que le hagan resistente a los efectos citolíticos del complemento. Amibas cultivadas *in vitro* ocasionalmente pierden ciertos componentes de superficie que les permiten pasar desapercibidas por los anticuerpos, y amibas cultivadas en presencia de complemento pierden susceptibilidad a éste.

En investigaciones realizadas por Muñoz Espinoza y Salazar Flores se hizo la consideración de que los niveles de complemento en suero no son factores que evidencian la activación del complemento. Los niveles séricos del complemento dependen de la capacidad de síntesis de este así como también de su consumo [10]. En cambio, la degradación de C3 se puede considerar como un criterio más confiable de activación del complemento. Las concentraciones de C3d plasmáticas se encuentran incrementadas en pacientes con enfermedad hepática crónica, con un catabolismo incrementado del complemento [10].

La C3 convertasa de la vía clásica o alterna rompe a C3 en C3a y C3b. A partir de este punto, dos sistemas regulatorios participan en la formación de productos de degradación de C3, 1) los factores H e I, 2) el factor acelerador del decaimiento del enlace de membrana (DAF) y el receptor de C3b (CR1). C3b forma un complejo biomolecular con el factor H. C3bi se forma cuando el factor I actúa sobre el complejo biomolecular. Uno de los productos finales de degradación es C3d, que se deriva del tratamiento con tripsina de C3bi. El estudio antes mencionado reporta niveles séricos o plasmáticos de C3d, C3 y factor H en

pacientes con ANA para determinar si la activación del complemento se lleva a cabo. La relación C3d/C3 también se midió, pues el hecho de que esta se encuentre incrementada refleja un consumo elevado del complemento. Los resultados de este estudio indican niveles incrementados del factor H y de C3 en pacientes con ANA que han recibido tratamiento médico. Esto es probablemente el reflejo de una síntesis incrementada de estos componentes. A medida que la enfermedad progresa, los niveles séricos de C3 y de C3d disminuyen, pues como consecuencia de la enfermedad también se observa un catabolismo acelerado del complemento.

C3 es sintetizado principalmente por hígado, y en menor proporción por el sistema retículo endotelial. El factor H es sintetizado por monocitos.

Los pacientes con ANA presentan niveles séricos de albúmina disminuidos, lo cual podría interpretarse como deficiencia en la capacidad sintética por parte del hígado. Este fenómeno no es muy evidente en la síntesis del factor H y C3, puesto que ambos también son sintetizados por el sistema retículo endotelial.

En estudios realizados por Keed, S.L; Mc Karrow; et al. se comprobó que tanto cadenas aisladas de pacientes asintomáticos, como cadenas aisladas de pacientes con amibiasis invasiva, son capaces de activar la vía clásica y alterna del complemento. En investigaciones más recientes realizadas por los mismos investigadores (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989), se estudió la interacción de una de las principales proteinasas neutras extracelulares de *E. histolytica*, que es la proteinasa de

la cisteína, de 56 kD con componentes purificados del complemento. Dicha proteinasa activa la vía alterna y por rompimiento de C3 produce C3b nemolíticamente activo. El rompimiento es a un aminoácido distal del sitio donde rompe la C3 convertasa. Para determinar si la proteinasa puede también activar la vía clásica independientemente de anticuerpos, se evaluó su capacidad de lisis de C4 y generación de productos fisiológicos provenientes de este. En contraste con el rompimiento esoe específico de C3, más del 90% de la cadena α de 10 μ g de C4 fue degradada en fragmentos menores a 20 kD después de 60 minutos de incubación con 200 u de proteinasa purificada. Por lo tanto, la disminución de la capacidad hemolítica observada de C4 en suero humano normal, incubado con trofozoítos, se debe probablemente a la degradación proteolítica de C4. De estos estudios se concluye que la proteinasa ambiana de 56 kD inactiva C4 por completa degradación de su cadena α , pero activa la vía alterna mediante el rompimiento específico de C3.

En estudios realizados por Ortiz-Ortiz et al. [12] se conjugó un anticuerpo monoclonal (MNC) que por sí mismo no activa el complemento, con Factor-veneno de cobra (FVC) que es un activador del complemento. Dicha conjugación se hizo para determinar si el complejo FVC-MNC es capaz de destruir trofozoítos de *E. histolytica*. Los resultados de este estudio muestran que el complejo covalente MNC-FVC, en presencia del complemento ejerce un efecto citopatogénico sobre los trofozoítos ambianos.

La molécula efectora (FVC) se combina con el factor B de los

mamíferos, correspondiente a la principal proenzima de la vía alterna del complemento, lo cual activa al factor D formando la C3/C5 convertasa o FVL_{8b}. Esta enzima puede activar directamente a C5 e iniciar la formación del complejo que ataca a la membrana sin la presencia de C3.

CAPITULO III. B

Inmunidad celular

3.5) Polimorfonucleares:

Estudios *in vitro* realizados por Guerrant et al. [1] demuestran que cadenas patógenas de *E. histolytica* son capaces de matar neutrófilos humanos mediante un mecanismo dependiente de contacto e independiente del suero, sin mostrar pérdida de viabilidad alguna. Por su parte, los neutrófilos fueron capaces de matar únicamente amibas axénicas que presentaron poca virulencia *in vitro*, aparentemente dicho efecto se realizó mediante un proceso extracelular independiente de anticuerpos anti-amiba.

La susceptibilidad de los neutrófilos a la lisis por diferentes cadenas de *E. histolytica* se asocia con la virulencia *in vitro* en cultivos celulares, así como también se asocia con la actividad de la adhesina inhibible por N-acetil-D-galactosamina de estas cadenas axénicas [2]. Con la adición de 1 gr de N-acetil D-galactosamina disuelto en 100 ml, se inhibió la destrucción de neutrófilos por amibas virulentas, permitiéndose así la destrucción de amibas por neutrófilos. Estos resultados muestran que la adhesina inhibible por N-acetil-D-galactosamina tiene un papel vital en la virulencia del microorganismo.

Considerando la posibilidad de que la inmunidad celular

participe en la resistencia a la infeccion a través de mediadores solubles o linfocinas, Ortiz-Ortiz, L. y Castellanos, C. [3] estudiaron el efecto de dichas linfocinas. Para ello emplearon sobrenadantes de cultivos de celulas linfoides estimuladas *in vitro* con concanavalina A, una lectina que favorece la formación de estos mediadores. Se observó que los sobrenadantes activados presentan un efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas y sobre la síntesis de DNA de *E. histolytica*. Cuando los sobrenadantes fueron acidificados a un pH de 2.5, no causaron el efecto antes mencionado, lo que hizo suponer a los investigadores que la linfocina responsable pudiera ser el interferón γ .

En estudios posteriores realizados por Castellanos, C. y Ortiz-Ortiz, L. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989), fue posible comprobar que el interferón γ es el responsable del efecto inhibitorio observado.

López Osuna et al. [4], estudiaron la interacción de polimorfonucleares (PMN) con *E. histolytica*. Como indicador de destrucción de PMN emplearon la liberación del isótopo Cr_{51} . Se empleo una cepa virulenta (HMI-IMSS) y una menos virulenta (HK9-NIH). La primera cepa produjo gran liberación del isótopo, en tanto que la segunda lo hizo en una mínima proporción. Estos resultados confirman que cepas virulentas de *E. histolytica* poseen capacidad de destruir PMN mientras que las cepas menos virulentas son menos aptas para ello.

Ferez-Tamayo et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) recientemente estudiaron la participación de proteinasas amibianas

y PMN en el daño tisular. El modelo experimental empleado fue una lesión aguda amibiana desarrollada en testículo de rata. En ratas leucopenicas (con menos de 1000 leucocitos/ml) la inyeccion intratesticular de trofozoitos axénicos HM-1 produjo lesiones indistinguibles del control normal. En cambio, la inhibicion del 80% (promedio) de la actividad de proteinasa produjo lesiones inflamatorias mínimas casi indistinguibles de los controles. Los datos sugieren que en este modelo experimental de amibiasis aguda los PMN no participan en el daño tisular y que las proteinasas amibianas son responsables de la virulencia de *E. histolytica*.

En otros estudios realizados por Perez-Tamayo et al. [5], se estudio tambien el papel de las proteinasas amibianas y de los PMN en lesiones tisulares. Se encontró que el principal daño a tejidos es causado por la proteinasa de la cisterna. Fue evidente que los leucocitos no son mediadores en procesos necroticos porque en animales leucopénicos se encontraron lesiones similares a las de animales normales.

3.6) Células efectoras en el humano:

Ghadirian et al. encontraron que las intervenciones que deprimen la inmunidad mediada por células tienen como consecuencia un mayor desarrollo del AHA. Dichas intervenciones son tratamiento con esteroides, timectomia neonatal, esplenectomia, radiación, terapia con sílice e inmunoglobulinas anti-macrófago o anti-linfocito [6]. La protección se consiguió con la inmunización

con el bacilo de Calmette-Guerin o mediante la infección previa con *Trichinella spiralis* [7]. En modelos animales, la infección previa con *E. histolytica* o la inmunización con extractos protéicos amibianos, confirió protección contra la amibiasis invasiva. Ghadirian y Meerovitch [8] encontraron que los linfocitos de sangre periférica, las células esplénicas y mononucleadas peritoneales de hamsters inmunizados, son capaces de destruir trofozoitos amibianos *in vitro*. Estudios realizados por Stern et al. [9] con múridos muestran el papel del macrófago como célula crítica en la fase efectora de la respuesta del hospedero.

En humanos, la actividad de células efectoras contra *E. histolytica* se reportó por Guerrero et al. [10], quienes demostraron que los linfocitos de pacientes que recientemente curaron de AHA, resultaron citotóxicos para trofozoitos amibianos. En cambio, linfocitos de pacientes con amibiasis aguda fueron rápidamente fagocitados por amibas.

Stemberger [11] encontró que los eritrocitos cubiertos con antígeno amibiano fueron lisados por monocitos humanos en presencia de suero inmune. Este hecho sugiere la participación de un mecanismo celular citolítico dependiente de anticuerpos.

Salata et al. describieron la interacción *in vitro* de leucocitos humanos provenientes de individuos infectados con trofozoitos de *E. histolytica* virulenta. Amibas virulentas de la cepa HMI:IMSS, destruyeron células mononucleadas de sangre periférica y linfocitos T sin pérdida de viabilidad alguna. La adición de suero inmune no ocasionó que las células del hospedero

destruyeran amibas. Por otra parte, macrófagos activados con concanavalina A, destruyeron trofozoitos de *E. histolytica* virulenta. La adición de suero inmune no potencio dicho evento, lo cual indica que es un proceso independiente de anticuerpos. Fue posible corroborar que se trata de un mecanismo dependiente de contacto mediante el examen microscopico. Mecanismos oxidativos como el de la catalasa y liberación de H_2O_2 por parte del macrófago, fueron requeridos para la lisis de la amiba. Además, las amibas mostraron susceptibilidad al H_2O_2 exogeno.

Ravdin y Salata [12] observaron que linfocitos T activados con fitohemaglutinina destruyeron amibas virulentas de la ceoa HMI, durante una incubación independiente de anticuerpos. La actividad amebicida de dichos linfocitos fue eliminada mediante la depleción con anticuerpos monoclonales OKT8 y complemento, lo cual indica que las células con fenotipo T8 son responsables de la actividad amebicida observada. Un mecanismo dependiente de contacto fue confirmado mediante microscopia.

Estudios realizados por Salata et al. [13] muestran que el interferon γ es uno de los componentes activos de la concanavalina A y que es capaz de estimular macrófagos y linfocitos a la destrucción amibas.

Algunas de las pruebas comúnmente empleadas en la medición de la inmunidad celular son la de transformación blastoide de linfocitos en presencia del antígeno y la de producción de factor inhibidor de la liberación de macrófagos (MIF).

En estudios realizados por Denis M. y Chadee K. [14], fue

Posible comprobar que en la amibiasis hepática experimental con gerbos, los macrófagos provenientes del AHA resultan seriamente afectados en sus funciones de células efectoras y presentadoras. En cambio, los macrófagos esplénicos y peritoneales no disminuyen sus funciones tan drásticamente.

Los macrófagos esplénicos y peritoneales provenientes de animales infectados, presentaron una considerable capacidad de destrucción de amibas (28 y 45 % respectivamente). Los macrófagos hepáticos directamente afectados, resultaron deficientes en la liberación de H_2O_2 e interleucina 1 (IL-1) y presentaron respuesta disminuida a linfocinas.

Estudios recientes indican que sobrenadantes de cultivos amibianos axénicos pueden inhibir la quimiotaxis, quimioquinesis y movilidad de células mononucleares fagocíticas [15]. Esto evidencia lo involucradas que están las proteínas amibianas, ya sean intrínsecas o secretadas, en la disfunción observada de los macrófagos hepáticos. Además se puede sugerir que los productos amibianos requieren de una gran proximidad a los macrófagos para inhibir las funciones de estos, ya que en los macrófagos distantes al absceso hepático no presentan las mismas disfunciones.

La habilidad de los extractos amibianos para disminuir la liberación de IL-1 explica en parte la notable falta de cicatrización alrededor del AHA en humanos o en modelos experimentales, puesto que la IL-1 es un factor importante involucrado en la deposición de colágeno y en el proceso de curación [16].

Los macrófagos esplénicos de animales infectados presentan respuesta disminuída a la concanavalina A. Una respuesta similar se observó en leucocitos periféricos de pacientes con AMA [17].

Los extractos protéicos solubles provenientes de amibas virulentas son mitogénicos para linfocitos humanos y de múridos. Esta mitogenicidad está relacionada con la actividad de lectina, que a su vez lo está con la virulencia [18]. Estudios sobre el principio mitogénico de los trofozoítos amibianos indican que *E. histolytica* puede actuar como activador policlonal de linfocitos T, lo cual tiene como consecuencia disfunciones en el sistema inmune.

En estudios realizados en hamsters, a los cuales se les administró suero antimacrófago, luego se les inoculó intrahepáticamente con *E. histolytica*, se observó aumento en el número y tamaño de los abscesos del hígado y también una diseminación mayor en los otros órganos en comparación con los testigos. Esto confirma que la resistencia a la amibiasis depende de los macrófagos y en menor grado de los linfocitos [19].

Por otra parte en el calostro humano se ha demostrado la presencia de elementos inmunitarios que incluyen constituyentes celulares como linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, así como elementos solubles como son anticuerpos IgA, IgG, IgM, e IgD, componentes del complemento, lisozima, lactoperoxidasa y lípidos asociados con resistencia anti-estafilocócica [20].

Tomando en cuenta la posibilidad de que los trofozoítos de *E.*

histolytica interaccionen con macrófagos intestinales y hepáticos. Rocha-Rodríguez et al. [21] estudiaron la interacción de estos trofozoítos con macrófagos del calostro humano. Los resultados de este estudio indican que al contacto de trofozoítos con macrófagos de calostro humano se provoca una disminución en la viabilidad de los trofozoítos, siendo esta disminución estadísticamente significativa. En relación a los macrófagos se observó que la viabilidad se mantiene en un 75-80%, pero esta disminución no fue significativa.

Es importante notar que la amiba no fue lisada por el macrófago, sólo se observó una disminución de viabilidad. Esto podría explicarse por el hecho de que el macrófago, al interaccionar con la amiba se activa liberando factores tales como hidrolasas lisosomiales, proteínas y metabolitos de ácido araquidónico, así como intermediarios de oxígeno reactivo [22]. Estos últimos son causa de daño citotóxico sobre los trofozoítos. Es probable que al establecer contacto con las amibas, los macrófagos liberen cantidades importantes de IgA tanto específicos como inespecíficos, ya que se cree que los macrófagos de calostro tienen una función de vehículo y almacenamiento de IgA, lo cual posiblemente interviene en la adherencia y viabilidad de los trofozoítos como se ha demostrado en estudios *in vitro* [23].

De los estudios de Rocha-Ramírez también se puede concluir que el macrófago interacciona con diferentes cepas de *E. histolytica* puesto que en todas las que se estudiaron hubo

disminución de viabilidad.

Canales-Treviño; Tsutsumi, V. y Martínez-Palomo (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) realizaron estudios con el fin de saber si el macrófago juega un papel preponderante en la resistencia del cobayo a la infección amibiana. En dicho estudio se administró sílice por vía intraperitoneal para disminuir el número de macrófagos. Los resultados obtenidos mostraron que las lesiones amibianas persisten por más tiempo y son más extensas en el hígado de cobayos depletados de macrófagos, sugiriendo así, que los macrófagos intervienen en la resistencia del cobayo ante la infección hepática amibiana. Para determinar si esta resistencia depende además, de una inmunidad mediada por células linfocíticas, se utilizó la ciclosporina A como agente tóxico para linfocitos T. Los resultados obtenidos indican que la resistencia del cobayo a la infección por *E. histolytica* no tiene una relación directa con la inmunidad mediada por linfocitos T.

3.7) Actividad mitogénica de extractos amibianos protéicos solubles:

Estudios realizados por Diamanstein et al. [24], muestran que extractos amibianos protéicos solubles inducen la proliferación de linfocitos T de individuos sanos. En cambio, los linfocitos B no proliferan ante dicho estímulo. Después de filtrar en gel los extractos antes mencionados, la actividad mitogénica se asoció con

fracciones que presentaron lectina inhibible por N-acetil-D-galactosamina.

3.8) Respuesta inmune mediada por células en pacientes:

En estudios clínicos que miden la hipersensibilidad cutánea retardada o la liberación del factor inhibidor de macrófagos (liberada por linfocitos), los pacientes con AHA presentaron un retardo en la respuesta inmune mediada por células [25]. Se obtuvieron respuestas positivas después del tratamiento.

Estudios recientes efectuados por Salata y Kavdin caracterizaron los fenotipos de linfocitos T, las respuestas proliferativas y la actividad de células efectoras en pacientes con AHA que previamente habían recibido tratamiento. Encontraron disminuidos los radios de T4 y T8 (ayudadores y supresores). La respuesta de linfocitos de pacientes a la concanavalina A fue menor que la de linfocitos controles. La respuesta a fitohemaglutinina A no se encontró deprimida. Diversos estudios demuestran respuestas disminuidas a lectinas en pacientes con AHA, lo cual se debe probablemente a un efecto supresor de la lectina inhibible por N-acetil-D-galactosamina. Los monocitos fueron requeridos para una respuesta óptima a proteínas ambientales por linfocitos de pacientes. Los extractos obtenidos de linfocinas de controles muestran menor cantidad de interferón γ [26]. Los monocitos activados con fitohemaglutinina A provenientes de pacientes, fueron capaces de destruir trofozoítos de amibas

virulentas. Dichos estudios sugieren que después del tratamiento para el AHA, a pesar de que se observa un decremento en el radio de linfocitos T4 y T8, se lleva a cabo una sensibilización de las células inmunes, por lo cual están presentes mecanismos efectores. Tanto la respuesta humoral como celular están presentes en la amibiasis. Observaciones clínicas indican que la inmunidad protectora se desarrolla para prevenir amibiasis recurrente. La respuesta humoral no parece ser un factor protector contra la infección [27].

En investigaciones realizadas por Sepúlveda et al. fue posible observar que en la etapa inicial de la enfermedad, los pacientes con AHA tuvieron reacciones cutáneas tardías negativas en la mayoría de los casos. En cambio, las mismas reacciones se volvieron positivas en la mayor parte de los pacientes después de la curación. Resultados similares se obtuvieron con la prueba de inhibición de migración de macrófagos y con la prueba de transformación blastoide [28]. Los datos anteriores sugieren que al inicio de la infección amibiana hay una fase de anergia específica transitoria. La especificidad radica en que la falta de reacción cutánea se registró sólo para el antígeno amibiano, no así para la estreptocinasa y estreptodornasa. No es probable que la disminución transitoria de la inmunidad celular se deba a falta de linfocitos T, ya que la prueba de la roseta dio resultados normales [28].

Sepúlveda supone que en la fase inicial de la enfermedad la respuesta inmunológica a la infección amibiana parece ser

únicamente de naturaleza humoral; y que la inmunidad mediada por células aparece como regla hasta la fase tardía del padecimiento.

Isibasi et al. [29], realizaron investigaciones con el objeto de verificar la presencia de inmunidad celular en la etapa aguda y de convalecencia en pacientes con AHA. Se utilizó la prueba de inhibición de migración de leucocitos (LIF) debido a su sencillez, confiabilidad y rapidez. Se encontró una prueba positiva de LIF en la mayoría de los casos de AHA tanto en la fase aguda como en la de convalecencia. Esto último es válido para los dos antígenos empleados, que fueron un purificado polisacárido y un homogeneizado total. Los investigadores subrayan la importancia de que mientras la respuesta celular mediada por la prueba de LIF se relacionaba mucho con la buena o mala evolución de la enfermedad, los anticuerpos circulantes hacia ambos antígenos amibianos siempre estuvieron presentes y sus títulos no mostraron relación con la evolución de la enfermedad. Por otra parte, en la prueba de LIF no hubo una diferencia estadísticamente significativa en los resultados al utilizar uno u otro antígeno, lo cual sugiere la posible importancia del polisacárido en la respuesta hacia *E. histolytica* durante el AHA.

En los pacientes con AHA la respuesta inmune humoral se ha detectado y cuantificado por diversos métodos serológicos, encontrándose títulos elevados de anticuerpos en estos pacientes, pero también en amibiasis asintomática e incluso en individuos aparentemente sanos; además los anticuerpos circulantes anti-amibianos persisten por meses o años. Todo lo anterior reduce

la utilidad diagnóstica de las pruebas serológicas habituales. por ello Isibasi et al. [30] investigaron la presencia de células plasmáticas productoras de anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA en la sangre periférica de pacientes con AMA y su utilidad diagnóstica.

En la sangre periférica de todos los pacientes con AMA se encontraron células plasmáticas; por el contrario en los grupos testigos solamente en algunos individuos se detectaron en número más reducido. A pesar de ello, la prueba puede ser útil en el diagnóstico, la mayor sencillez y rapidez de las pruebas serológicas la hace impráctica para el uso rutinario.

Por otro lado, las células plasmáticas habitualmente no se encuentran en la circulación general de roedores, incluso después de la inmunización intravenosa y su número es muy limitado en la sangre periférica humana a menos que ocurra proliferación excesiva como en el caso de los mielomas [31]. Por lo tanto, es posible que la presencia de células plasmáticas en la circulación de pacientes con AMA pueda deberse a la intensa proliferación de los precursores por productos mitógenos procedentes de la amiba o a productos procedentes de las células T activadas [32].

3.9) Papel de la histamina en la respuesta inmune local anti-amiba:

La histamina tiene efectos diversos tanto sobre las respuestas inmunes no específicas, tales como la inhibición de la

quimiotaxis y la fagocitosis, como sobre la liberación de enzimas y mediadores por FMN. De esta manera participa en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular sistémica, a las cuales inhibe directamente incrementando los niveles de AMPc en las células efectoras o induciendo la aparición de una población de células T supresoras. También inhibe la secreción de anticuerpos específicos anti-amiba. [33].

Isibasi et al. [34] realizaron una investigación basada en la hipótesis de que los trofozoítos de *E. histolytica*, a través de la secreción de polipéptidos básicos, citotoxinas, lectinas o contacto directo, provocan la liberación de histamina contenida en los mastocitos de la mucosa intestinal. La gran cantidad de histamina liberada interfiere con los mecanismos de defensa inespecíficos y específicos en contra del parásito, lo cual a su vez permitirá la permanencia de éste y su diseminación posterior. Los resultados obtenidos en dicha investigación muestran que los productos procedentes de *E. histolytica* pueden provocar la liberación de histamina por basófilos humanos, lo cual inhibe la secreción de IgA anti-amiba por parte de las células plasmáticas de la mucosa intestinal. Este podría ser un mecanismo local de evasión de la respuesta inmune empleado por la amiba.

CAPITULO IV

DIAGNOSTICO DE LA AMIBIASIS

Los signos y síntomas de una infección amibiana son de gran ayuda en el diagnóstico clínico. La última determinación de la infección es la identificación en laboratorio, ya sea directamente mediante la demostración de la presencia del agente etiológico, o indirectamente mediante la demostración de anticuerpos o antígenos en suero, heces u otros fluidos biológicos. Tanto los métodos directos, como los indirectos presentan problemas inherentes.

El examen de heces en fresco es el método más confiable en el diagnóstico de infecciones por *E. histolytica*. Todos los métodos de examen directo son tardados, caros y dependen en gran medida de la habilidad que tiene la persona que los realiza en el uso del microscopio. Además, los quistes en heces pueden presentarse tanto en individuos asintomáticos como en individuos con enfermedad invasiva.

Actualmente no se cuenta con métodos rápidos y sencillos capaces de distinguir entre cadenas patógenas y no patógenas de *E. histolytica*, pero se sabe que los trofozoítos hematófagos sólo se presentan en amibiasis invasiva [1].

4.1) Técnicas de examen de heces para detección de protozoarios intestinales [2]:

Examen directo en fresco: con sol. salina o iodo

Tinción con sol. de hierro-nematoxilina

Tinción con tricromo

Tinción con azul de metileno

Tinción y/o concentración con merthiolate-iodo-formalina

Fijación con alcohol polivinílico

Fijación con formalina (4%-10%)

Flotación con sulfato de zinc

Sedimentación con formalina-eter

Sedimentación con formalina-acetato de etilo

Cultivo

ELISA

Inmunofluorescencia

Otros

De los métodos de rutina, el de concentración con merthiolate-iodo-formalina parece ser el más sensible. Un método de dilución de heces en sol. salina isotónica es menos sensible que el uso de técnicas de tinción y concentración. Si se aplican diversos métodos a la vez, el diagnóstico sera más confiable.

Frecuentemente se obtienen falsos positivos debido a la confusión de trofozoitos amebianos con macrófagos que tienen glóbulos rojos en su interior.

Otra dificultad en el diagnóstico de amibiasis es la multiplicidad de sustancias que interfieren con las determinaciones. Las sustancias más comunes son:

Antibióticos: tetraciclinas, sulfonamidas

Antiparasitarios: agentes anti-protozoarios

Laxantes, antiácidos, hidróxido de Mg, aceite mineral

Medio de contraste para radiología: sulfato de Ba

Astringentes: bismuto, compuestos derivados de caolin

Sangrado gastrointestinal no relacionado a la infección.

En pacientes con disentería severa que requieren hospitalización, sólo un 50%-80% presentan anticuerpos circulantes [3], y una menor proporción de aquellos con diarrea tienen anticuerpos circulantes. La colonización del intestino con cepas patógenas induce respuesta inmune humoral, pero la colonización del intestino con cepas no patógenas rara vez lo hace.

Actualmente las pruebas inmunológicas son de gran utilidad en el diagnóstico de amibiasis invasiva, tanto a nivel individual, como en estudios seroepidemiológicos en los que se suelen incluir datos de incidencia, morbilidad, mortalidad y prevalencia de la infección amibiana.

En general se ha reportado que las pruebas serológicas tienen un 95%-100% de sensibilidad en pacientes con AHA y un 85%-95% en pacientes con enfermedad intestinal invasiva [4].

Por otra parte, es importante considerar que las pruebas de diagnóstico inmunológico tienen limitaciones tales como la persistencia de anticuerpos anti-amiba por varios años. Esto tiene el agravante de que se dificulta la diferenciación de pacientes que padecen infección activa, de los pacientes que curaron hace meses o años. Otros inconvenientes del diagnóstico inmunológico son las diferencias antigénicas de las diversas cepas de *E. histolytica* y los distintos títulos de anticuerpos considerados como positivos.

Para el conocimiento de la inmunología de las infecciones producidas por parásitos se debe considerar: a) los antígenos parasitarios; b) los métodos y técnicas de detección de la respuesta inmune, y la aplicación práctica que pueden tener.

4.2) Antígenos parasitarios:

Los parásitos poseen una estructura compleja que desde el punto de vista inmunológico se traduce en un elevado número de diferentes antígenos, esto ha sido denominado por algunos autores como el "mosaico antigénico". Para un mismo parásito, el número y características de estos antígenos es variable según sea el momento de su desarrollo. Los antígenos de un parásito pueden tener distintos efectos: algunos son similares a los del hospedero y su función es la de bloquear la especificidad antigénica del parásito y por lo tanto protegerlo de la agresión inmunológica del hospedero. Otros serían inmunógenos capaces de desencadenar la

produccion de anticuerpos [5].

Los determinantes antigenicos especificos de cada parasito son de gran utilidad pues son los que contienen al diagnostico inmunologico la garantia de especificidad, ya que no dan reacciones cruzadas con sueros de otras parasitosis.

De acuerdo con la tecnica inmunologica a efectuar, se usaran antigenos solubles o corpusculares. Los primeros se usan en tecnicas de inmunoprecipitacion, enzimoimmunoensayo, etc; y los segundos en las pruebas de aglutinacion o inmunofluorescencia.

Los antigenos pueden tener diferentes origenes: tegumento, membrana celular o citoplasma (exo y endogenos) y se obtienen por rotura mecanica o quimica del cuerpo del parasito, o bien recogiendo los productos de secrecion y excrecion durante el metabolismo del mismo [5].

4.3) Pruebas inmunologicas en el diagnostico de amibiasis:

La mayoria de las pruebas cutaneas han caido en desuso, aunque en algunos casos todavia pueden significar un aporte en el diagnostico individual o en encuestas epidemiologicas. La sensibilidad de las pruebas cutaneas es por lo general muy elevada, pero su aplicacion se ve limitada por una inespecificidad tambien alta.

4.4) Pruebas que emplean antígenos solubles:

Prueba de fijación de complemento (FC): Es una de las más utilizadas, es compleja y requiere el uso de reactivos estandarizados tales como hemátides de carnero y complemento de cobayo, que además son de vida muy corta. Un considerable número de sueros pueden tener actividad anticomplementaria.

Pruebas de aglutinación: La aglutinación directa de parásitos se basa en utilización de antígenos corpusculares; sin embargo, existen variables que emplean antígenos solubles adsorbidos sobre soportes que aglutinan. La aglutinación pasiva sobre soportes utiliza partículas inertes como látex y bentonita, o bien hemátides de conejo, carnero u otros animales. A estos soportes se les fija por métodos fisicoquímicos antígenos solubles. En la hemaglutinación pasiva (HA), los antígenos se encuentran adsorbidos a la membrana del hematie gracias a la acción de agentes como el ácido tánico, el glutaraldehído, etc; que confieren estabilidad y duración al reactivo.

Pruebas de inmunoprecipitación: Las técnicas más utilizadas son: doble difusión, inmunolectroforesis, inmunodifusión radial, contraelectroforesis (CIEF). Estas técnicas se basan en la reacción antígeno-anticuerpo que se produce sobre gel o agarosa. Como principales inconvenientes se pueden mencionar el desmesurado consumo de antígeno y la necesidad de utilizar sueros concentrados para incrementar la sensibilidad de la prueba. La nefelometría es otra prueba de inmunoprecipitación comúnmente empleada.

Enzimo:inmunoanálisis: En el método ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) se une una enzima a un anticuerpo específico, que se hace reaccionar con su respectivo antígeno. Después de lavar, se añade el sustrato de la enzima, lo que produce un cambio en la coloración que puede ser observado espectrofotométricamente. En dicho método la especificidad inmune se ve ampliada por la reacción enzimática.

4.5) Pruebas que utilizan antígenos particulados:

Inmunofluorescencia indirecta (IFI): La IFI es uno de los métodos serológicos más rápidos y sensibles. Esta prueba no está libre de presentar reacciones cruzadas. En la IFI la lectura de la reacción es subjetiva, lo que se ha resuelto al introducirse un método fluorimétrico automatizado conocido como FIAX, que utiliza antígenos solubles (fijados a un soporte de celulosa) y cuyas lecturas se efectúan a través de un fluorómetro en forma automatizada.

En resumen, las pruebas empleadas en el diagnóstico de amibiasis invasiva son:

Aglutinación

Látex o bentonita

Hemaglutinación pasiva

Fijación de complemento

Inmunoprecipitación

ELISA

IFI

Pruebas cutáneas (reportadas ocasionalmente).

4.6) Estudios de gabinete:

En el diagnóstico del AHA son actualmente empleadas las pruebas de gabinete, tales como: 1) Radiología; 2) Centellografía de hígado, que se basa en la demostración de uno o más defectos de captación que corresponden a la zona de necrosis tisular. Por medio de este método se puede conocer el tamaño y localización de los abscesos. 3) Ultrasonografía y tomografía axial computada: mediante la ultrasonografía el absceso se identifica como imagen sonolúcida y con ello es factible estudiar situación, número y tamaño de las lesiones.

4.7) Métodos de diagnóstico en estudio que podrían tener aplicación en el futuro:

En estudios realizados por Agundis, C; Isibsi, A. et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) se planteó como objetivo producir anticuerpos monoclonales capaces de detectar antígenos relevantes de superficie de trofozoítos de *E. histolytica*, con el fin de emplearlos en una prueba diagnóstica.

La fusión celular para la obtención de los anticuerpos monoclonales (ACM) se efectuó con células de bazo de ratones previamente inmunizados con glicoproteínas de membrana y células SP2/O. Se probaron los sobrenadantes de los hibridomas por ELISA, empleando como antígeno las glicoproteínas y

lipopeptidofosfoglicana (LPFG). Se encontraron seis hibridomas productores de AcM contra las glicoproteínas, y de éstos, tres reconocen también a la LPFG. La capacidad de reaccionar de los AcM contra las dos moléculas desapareció para todos los positivos contra la LPFG cuando fue tratada con NaIO_4 .

Con los resultados obtenidos se deduce que algunos AcM reconocen como epítotope la porción polisacáridica, por lo que puede inferirse que están dirigidos contra la superficie y serán por ende, buenos candidatos para su futuro uso como diagnóstico.

En investigaciones realizadas por González Chávez A; Pereyra Alfonso et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) se presentó un sistema para evaluar de manera objetiva la evolución de la amibiasis invasora en hígado con el fin de identificar en forma temprana los pacientes con riesgo de desarrollar complicaciones. Dicho sistema puede resumirse en la siguiente tabla:

VARIABLE	PUNTO DE CORTE	CALIF.
Edad (años)	>50	1
Irritación peritoneal	presente	5
Albúmina (g/dl)	<2.2	5
Plaquetas	<300,000	4
Fosfatasa alcalina(mU/ml)	<188	3
Bandas (%)	>7	2
Velocidad de sedimentacion globular (mm/hr)	>38	1
Número de abscesos	>2	3
	1	2
Tamaño de abscesos (cm)	>9	2

De acuerdo a la escala, a mayor calificación correspondera un riesgo mayor de desarrollar complicaciones.

Jimenez Cardozo, E; De Iachica-Gilles, P. et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989). desarrollaron un método para cultivar amibas, que podría tener aplicación en el diagnóstico de la amibiasis.

Se estudiaron 404 pacientes con trastornos gastrointestinales en los que se determinó en una muestra de heces fecales la prevalencia de *E. histolytica* por: 1) análisis coproparasitoscopico; 2) cultivo monoxenico de Robinson y 3) cultivo monoxénico adicionado de tioglicolato.

El análisis coproparasitoscópico dio una positividad de 20.55%, el cultivo monoxénico de Robinson de 42.08% y el cultivo monoxenico adicionado de tioglicolato dio una positividad de 58.66%.

De acuerdo al numero de cultivos positivos obtenidos, los autores antes mencionados proponen que el medio de cultivo adicionado de tioglicolato podría utilizarse en el diagnóstico de la amibiasis intestinal.

Del Muro, R; Acosta, E; Ortiz-Ortiz, L. et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989), realizaron una investigación sobre la posibilidad de hacer un diagnostico de amibiasis intestinal mediante anticuerpos salivales.

La presencia de amibas en el lumen intestinal puede estimular al tejido linfoide asociado a la mucosa e inducir la producción de anticuerpos en las secreciones externas.

El objetivo de dicho trabajo fue el evaluar el potencial diagnóstico de los anticuerpos de la clase IgA anti-*E. histolytica*

en la saliva de un grupo de niños, mediante la prueba de ELISA. La búsqueda de estos anticuerpos mostró una certeza diagnóstica del 91%. Además se observó una correlación significativa entre la detección de antígeno amibiano en materia fecal y la presencia de anticuerpos IgA en saliva. Los resultados muestran que la detección de dichos anticuerpos por el método de ELISA es de valor diagnóstico en la amibiasis intestinal.

Torian, D.E. et al. (6) proponen un método de diagnóstico de amibiasis invasiva basado en la detección de la respuesta serológica a un antígeno purificado de 96 kDa que se encuentra situado en la superficie de *E. histolytica* patógena.

Dicho antígeno puede encontrarse tanto en cepas patógenas como en cepas no patógenas, pero se encontró que solamente en las primeras resulta altamente inmunogénico.

Los autores proponen que el antígeno de 96 kDa combinado con otro antígeno purificado o proveniente de una clona en particular, podrían representar un método sensible y específico para la detección de amibiasis invasiva.

Recientemente Jackson et al. (7), mediante la utilización de la técnica de inmunofluorescencia (IF), mencionaron la presencia de IgM específica en títulos bajos en 40% de pacientes con amibiasis intestinal y en 83% de pacientes con AHA. Identificaron además IgG específica en 100% de los casos. Por lo anterior, el autor considera que la presencia simultánea de IgM e IgG específicas denotan infección reciente y activa, mientras que la presencia de IgG específica con IgM negativa, sugiere ausencia de infección

activa.

Con esta información, Onofre-Muñoz; et al. (8), decidieron utilizar la técnica de ELISA para identificar IgM e IgG específicas contra *E. histolytica* en el suero de pacientes con AHA y en un grupo de adultos sanos. En este estudio, se identificó la actividad antiambiana fundamentalmente en la fracción IgG y muy escasa actividad en la fracción IgM, que no pudo diferenciarse de la del grupo control.

Los resultados obtenidos por Onofre-Muñoz indican que la respuesta inmunológica humoral en pacientes con AHA relacionada con la fracción IgG fue muy útil para el diagnóstico, de aparición temprana y a títulos elevados desde la primera semana de la enfermedad, sugestiva de respuesta inmune secundaria. No fue posible reproducir los resultados de Jackson con respecto a utilizar la fracción IgM específica como indicador de infección reciente y activa.

Sanchez-Guillen; Arguello-Garcia; et al. (XI Seminario sobre amebiasis, Mex. 1989) realizaron una investigación con el fin de establecer una posible correlación entre el zimodemo de las diferentes cepas de *E. histolytica* y la respuesta serológica a éstas en humanos. En este estudio se recolectaron muestras de suero y de heces para ser analizadas. A las muestras que presentaron cadenas amebianas con zimodemo característico se les aplicaron las pruebas de HA y Electroinmunotransfer blot (EITB) para determinar el título de anticuerpos.

En este estudio no se encontró correlación alguna entre el

zimoto de las cepas y el título de anticuerpos encontrado por HA y EITB.

Es importante mencionar que actualmente se está trabajando en la estandarización de la prueba EITB, (Garduño, G; et al. XI Seminario sobre amibiasis, Mex., 1989). Esta técnica presenta una especificidad tan alta que puede permitir la detección de antígenos de *E. histolytica* en pacientes sintomáticos y asintomáticos. También permite descartar la presencia de reacciones cruzadas con otros parásitos intestinales.

Pérez de Suárez; et al. (9), recientemente propusieron un método inmunocitoquímico al que llamaron Inmunoperoxidasa (IP), para la detección de *E. histolytica*. Consta de varios pasos, pero a grandes rasgos el tratamiento de las muestras de heces, exudados rectales o biopsias hepáticas puede describirse así: 1) bloquear la peroxidasa endógena con H_2O_2 diluido, 2) bloquear con suero de chivo normal diluido, 3) añadir antisuero anti-*E. histolytica* diluido, 4) lavar con solución salina fosfatada, 5) añadir suero de chivo diluido anti IgG humana conjugado a peroxidasa, 6) lavar con PBS, 7) añadir H_2O_2 con un indicador de color, 8) lavar con agua, 9) montarlo en glicerina-gelatina.

El método de la IP tiene la ventaja de que permite la detección de *E. histolytica* en casi todas las muestras positivas. No se observa reacción con leucocitos, células endoteliales, o con quistes de otros protozoarios. El método tiene la misma sensibilidad que la HA, es de 98.6%. Tres ventajas del método IP que deben considerarse son que no presenta reacción cruzada, es

útil en la detección de *E. histolytica* en cualquiera de sus formas de vida, y detecta antígenos ambientales superficiales e intracelulares.

Debido a las razones expuestas, el método de la IP se está evaluando en grupos de pacientes para su posterior estandarización y uso en el diagnóstico de rutina.

CAPITULO V

INDUCCION DE INMUNIDAD PROTECTORA

En experimentos realizados por Sepúlveda se demostró que la inyección del antígeno total liofilizado obtenido de cultivos ajenicos de *E. histolytica*, o bien la inyección de cultivos viables de la misma amiba, confieren inmunidad protectora en hamsters contra la infección amibiana.

Otros investigadores demostraron que la fracción I obtenida por cromatografía a partir del antígeno total de *E. histolytica*, estimula la producción de títulos elevados de anticuerpos en el cobayo.

Por otra parte, datos estadísticos muestran que la frecuencia de recidivas del AHA es excepcional, probablemente esto se debe a inmunidad postinfección.

Tanto en la amibiasis invasora con destrucción tisular extensa como por medio de la inyección de antígenos o de cultivos amibianos se provoca respuesta inmunitaria específica capaz de proteger contra la infección por *E. histolytica*. No es infundado suponer entonces que pueden encontrarse los medios para inducir la inmunidad activa anti-amibiana en el humano (1).

En investigaciones realizadas por Ghadirian, E. et al. (2), se extirpó el bazo a ratones para observar su efecto en la infección con *E. histolytica*. Los resultados indican que la esplenectomía induce un incremento en la resistencia a la

amibiasis intestinal en ratones. El mecanismo mediante el cual se induce resistencia a la infección amibiana, posterior a la esplenectomía es desconocido.

En el mismo estudio los investigadores comprobaron que el tratamiento con sílice disminuyó la resistencia a la infección amibiana en ratones esplenectomizados y normales.

El bazo es fuente de células T que suprimen la respuesta inmune. Por esta razón, una probable explicación a lo anterior es la atribución de resistencia anti-amibiana en ratones esplenectomizados a la pérdida de dicha actividad supresora.

Salata, R.A. et al. (3), en pacientes tratados de AHA estudiaron los mecanismos inmunes mediados por células. Dicho estudio abarcó el número de linfocitos T, respuestas proliferativas a mitógenos y proteínas amibianas, generación de linfocinas en respuesta a dichas proteínas y la actividad de macrófagos frente a cepas virulentas de *E. histolytica*.

Los autores demostraron que la cuenta absoluta de linfocitos T fue similar en pacientes normales y en pacientes tratados de AHA, pero la relación T4/18 y el porcentaje de T4 se encontraron disminuidos en pacientes tratados de AHA.

Se encontró que las proteínas amibianas inducen a los linfocitos de pacientes a la secreción de linfocinas efectivas en la activación de macrófagos, que a su vez adquieren la capacidad de destruir trofozoítos. Los linfocitos también adquieren dicha capacidad luego de tener contacto con proteínas amibianas.

En relación a los resultados anteriores, los autores

concluyeron que existe la posibilidad de aislar antígenos amibianos que mediante la inducción de inmunidad protectora, puedan emplearse en la inmunoprofilaxis contra la amibiasis invasiva.

Vinayk, V.K. et al. (5) realizaron una investigación para evaluar el potencial protector de los antígenos asociados a la membrana de *E. histolytica* (NIH:200 V). Los resultados que obtuvieron indican dichos antígenos confieren un alto grado de protección contra la infección amibiana

Jiménez Cardozo, J.M; Barradas, A. y Kumate, J. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989), efectuaron un estudio morfológico del hígado del hamster, protegido por la actividad enzimática de la 6-fosfoglucomutasa de la *E. histolytica*. La actividad de esta enzima se encontró en el sobrenadante obtenido de centrifugar un homogenado amibiano de la cepa HMI-IMSS. La purificación parcial de la enzima se llevó a cabo por cromatografía en columna. Los cinco picos que presentaron actividad enzimática más alta se utilizaron para inmunizar a 40 hamsters. Después, los animales y un grupo control fueron desafiados intrahepáticamente con la cepa amibiana antes mencionada.

En relación a este estudio los autores concluyeron que la inmunización se llevó a cabo con las fracciones protéicas que contenía la enzima parcialmente purificada y los valores de actividad específica coincidieron con los de protección inmunológica más alto. La enzima dio protección para evitar que se produjera AHA, en los hamsters inmunizados por la formación de

anticuerpos anti-enzima.

Schain, D.C; Petri, W.A. et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989), realizaron estudios sobre el efecto que tiene la inoculación de animales con una lectina de adherencia de *E. histolytica*, sobre la respuesta inmune.

Los esplenocitos de gerbos con AHA presentaron respuesta blastogénica a la lectina inhibible por N-acetil-D-galactosamina de *E. histolytica*, además adquirieron capacidad amebicida luego de cinco días de incubación con la lectina. Los esplenocitos de gerbos inmunizados con la lectina presentaron menor respuesta blastogénica que los esplenocitos de gerbos con AHA, pero también adquirieron capacidad amebicida después de ser incubados con la lectina. En cambio, los esplenocitos provenientes de controles no presentaron capacidad amebicida y su respuesta blastogénica a la lectina fue deficiente.

La conclusión de los autores sobre el estudio fue que el AHA en gerbos está asociado con la respuesta inmune a la lectina antes mencionada. La inoculación con la lectina despierta una respuesta inmune algo menor que la adquirida con la infección por amibas.

Ghadirian y Kongshavn (6) realizaron una investigación para observar si los ratones adquieren resistencia a la infección amibiana luego de ser inoculados con *Corynebacterium parvum* y el *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG).

Los resultados obtenidos indican que el pretratamiento de ratones con BCG, les confiere completa protección contra la infección por amibas. El pretratamiento con *C. parvum* les

proporcionó a los animales una protección algo menor a la anterior.

El mecanismo de protección inducido por estas sustancias por lo general se ha asociado con la inmunidad no específica. Se cree que tiene relación con la activación de macrófagos, que son células con capacidad amebicida.

Jimenez-Cardozo, E; Camacho-Vargas et al. (XI Seminario sobre amibiasis, Mex. 1989) estudiaron la modificación en el patrón isoenzimático de la fosfoglucomutasa de *E. histolytica*, debida a la presencia de metabolitos secundarios de *Z. liebmanni*arum.

Se cultivo *E. histolytica* en presencia de tres metabolitos aislados de *Z. liebmanni*arum. Se utilizaron testigos cultivados en iguales condiciones sin los metabolitos. En todos se determinó número y viabilidad, así como el patrón electroforetico isoenzimático de la fosfoglucomutasa. Los metabolitos tuvieron un efecto letal sobre los cultivos de *E. histolytica*.

Los autores proponen que los metabolitos secundarios de *Z. liebmanni*arum son productos que potencialmente podrían utilizarse en la terapéutica de la amibiasis, en donde el efecto letal se correlaciona con cambios estructurales de la fosfoglucomutasa.

CONCLUSIONES

Entamoeba histolytica causa colitis invasiva y AHA, es responsable de altas tasas de morbilidad y mortalidad. Aproximadamente un 10% de la población mundial es portadora del parásito.

Las condiciones insalubres favorecen la proliferación del parásito, pero difícilmente podrían controlarse en zonas endémicas por el alto costo que esto representaría. Es por eso que sería más factible el control de la enfermedad mediante el manejo de la genética y bioquímica del parásito.

Actualmente no se cuenta con métodos rápidos y sencillos para diferenciar cepas amebianas patógenas de cepas no patógenas, pero los trabajos realizados sobre la respuesta inmune en infecciones por *E. histolytica* son muy prometedores en cuanto a los alcances que tendrán en el diagnóstico y terapéutica de la amebiasis.

La falta de modelos adecuados de infección intestinal en humanos y el poco presupuesto con que se cuenta en los laboratorios son problemas que dificultan el estudio de la enfermedad.

En los últimos años las pruebas inmunológicas han tenido gran auge puesto que son de utilidad en estudios epidemiológicos, pero tienen el agravante de no distinguir entre pacientes con infección activa y pacientes que han curado, puesto que los anticuerpos prevalecen por meses o años.

La mayoría de las pruebas serológicas son positivas solo cuando la enfermedad es extremadamente severa, pero permanecen positivas por tiempo indefinido.

A pesar de las dificultades en el estudio de la amebiasis, recientemente se ha avanzado en el conocimiento de las características morfológicas y bioquímicas de *E. histolytica*, así como también sobre su forma de infectar.

La inmunología pretende aplicarse a diversos niveles, por ejemplo antes de la infección a nivel preventivo, si se lograra obtener la vacuna. Otro nivel sería en el diagnóstico, con el desarrollo de técnicas confiables y costeables. Por último, la inmunología podría aplicarse en la terapéutica, ya sea mediante el refuerzo de los mecanismos de defensa del hospedero o mediante la disminución de la virulencia del parásito.

BIBLIOGRAFIA

REFERENCIAS A LA INTRODUCCION Y CAPITULO I

1) Walsh, J. A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect Dis. 1986; 8: 228-38.

2) Bray, R. S; Harris, W.G. The epidemiology of infection with *E. histolytica* in the Gambia, West Africa. Trans. R. Soc. Med Hyg. 1977; 71: 401-7.

3) Petri, W. A. Jr; Ravdin, J. I. Amebiasis in institutionalized populations. In: Ravdin J. I; ed. Amebiasis: human infection by *E. histolytica*. New York: John Wiley and Sons, 1988; 576-81.

4) Sexton, D. J; Krogstad, D. J; Spencer, H. C. Jr; Healy G. R; Sinclair, S; et al. Amebiasis in the mental institution: serologic and epidemiologic studies. Am J Epidemiol. 1974; 100: 414-23.

5) Markell, E. K; Havens, R. F; Kurtsubo, R. A; Wingerld, J. Intestinal Protozoa in homosexual men of the San Francisco Bay area; prevalence and correlates of infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 33: 239-45.

6) Smith, F. D; Lane, H. L; et al. Intestinal infections in patients with AIDS: etiology and response to therapy. Ann. Intern. Med. 1988; 108: 328-33.

7) Katzenstein, D; Richerson, V; Braude, A. New Concepts of amoebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. Medicine. 1982; 61: 237-46.

8) Fuchs, G; Ruiz-Palacios, G; Pickering, L. K. Amoebiasis: human infection by *E. histolytica*. New York: John Wiley and Sons. 1988; 594-613.

9) Lewis, E. A; Antia, A. U. Amoebic Colitis: Review of 295 cases. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1969; 63: 633-8.

10) Tucker, P. C; Webster, P. D; Kilpatrick, Z. A. Amoebic colitis mistaken from inflammatory bowel disease. Arch. Invest. Med. 1975; 135: 681-5.

11) Gathiriam, V; Jackson, T. Frequency distribution of *E. histolytica* zymodemes in a rural South Africa population. Lancet. 1985;72: 669-72.

12) Sargeaunt, P. G. The reliability of *E. histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. Parasitol. Today. 1987; 3:40-3.

13) Mirelman, D; Bracha, R; Wexler, A; Chayan, A. Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *E. histolytica* during axenation. Infect. Immunol. 1986; 54: 827-32.

14) J. I. Ravdin. *E. histolytica*: From adherence to Enteropathy. The Journal of Infectious Diseases. 1989; 159: 420-29.

15) Kretschmer, R. R. Immune phenomena in amebiasis. Surv. Immunol. Res. 1984; 3:1-10.

16) Arias-Negrete; et al. Actividad citotóxica de *E. histolytica* sobre células linfoides de bazo de ratón. Arch. Invest. Med. Mex. 1982. 13: 217-22.

17) Schirman-Gaytan. Amebiasis. Observaciones de laboratorio. Infectologia. 1987; 1: 25-34.

18) Martinez-Palomo, et al. Ambiasis. Salud Publica de Mexico. 1983; 563-73.

19) Meerovitch, E. and Ghadirian, E. Restoration of virulence of axenically-cultivated *E. histolytica* by cholesterol. Arch. Invest. Med. Mex, 1986 (supl 1), 253-56.

20) Gill, Recasens, M. E; et al. Increased leucocyte histamine release by *E. histolytica* antigen in patients with amoebic abscess of the liver. Parasite Immunol. 1984; 6: 211-22.

21) Brandt, H; Perez-Tamayo, R. Amebiasis. Prensa Medica Mexicana. Mex. 1970.

22) Kagan, Irving, G. The immunology of amebiasis. Arch. Invest. Med. Mex. 1973. 4 (supl 1): 169-75.

23) Ravdin, J. I; Murphy, C. F; Salata, R. A; Guerrant, R. L; Hewlett, E. L. NAc-D-Gal-binding lectin which mediates the in vitro adherence of *E. histolytica*. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. J. Infect. Dis. 1985; 151: 804-15.

24) Chadee, K; Petri, W. A; et al. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *E. histolytica*. J. Clin. Invest. 1987; 80: 1243-54.

25) Rosales-Encina, J. L; Meza, I; et al. Isolation of a 220-KD protein with lectin properties from a virulent strain of *E. histolytica*. J. Infect. Dis. 1987; 156: 790-7.

26) Ravdin, J. I; Guerrant, R. L. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *E. histolytica*: study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest. 1981; 68: 1305-13.

27) Arroyo, R; Drozco, E. Localization and identification of an *E. histolytica* adhesin. Mol. Biochem. Parasitol. 1987; 23: 151-7.

28) Ravdin, J. I; Croft, B. Y; Guerrant, R. L. Cytopathogenic mechanisms of *E. histolytica*. J. Exp. Med. 1980; 152: 377-90.

29) Ravdin, J. I; Moreau, F; et al. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *E. histolytica*. Infect Immun. 1988; 56: 1505-12.

30) Long Krug, S. A; Ravdin, J. I; et al. Phospholipase A enzymes of *E. histolytica*: description and subcellular localization. J. Infect. Dis. 1985; 152: 542-9.

REFERENCIAS AL CAPITULO II:

1) Guerrant, R. L; Ravdin, J. I; et al. Interaction between *E. histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 1981; 143: 83-93.

2) Coondelis, J; Hall, A; et al. Actin polymerization and pseudopod extension during ameboid chemotaxis. Cell Motility and the cytoskeleton. 1988; 10: 77-90.

3) Haal, A; Schlein, A; et al. Relationship of pseudopod extension to chemotactic hormone - induced actin polymerization in ameboid cells. J. Cell. Biochem. 1988; 37: 285-89.

4) Ogihara; et al. Actin architecture in moving cells and chemoattractant-elicited actin changes of *Dictyostelium*. Exp Cell Res. 1988; 160: 275-86.

5) Muñoz, M. L; Rojkind, M; et al. *E. histolytica*: Collagenolytic activity and virulence. J. Protozool. 1984; 31: 468.

6) Young, J; et al. Characterization of membrane poroforming protein from *E. histolytica*. J. Exp. Med. 1982; 156: 1677.

7) Sargeant, P.G; Williams, J. E; Grene, J. D. The differentiation of invasive and not invasive *E. histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop Med. Hyg. 1978; 72: 519-21.

8) Sargeant, P. G; Williams, J. E; et al. The epidemiology of *E. histolytica* in Mexico City. A pilot survey I. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1980; 74: 653-6.

9) Phillips, B. P; Bortgis, I. L. Effects of growth *in vitro* with selected microbial associates and of encystation and excystation, on the virulence of *E. histolytica* for Guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1954; 3: 621-7.

10) Wittner, M; Rosenbaum, R. M. Role of bacteria in modifying virulence of *E. histolytica*: studies of amebae from axenic cultures. Am J. Trop Med. Hyg. 1970; 3: 621-7.

11) Bracha, R; Kobiler, D; Mirelman, D. Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *E. histolytica*. Infect Immun. 1982; 36: 396-406.

12) Bracha, R; Mirelman, D. Virulence of *E. histolytica* trophozoites; effects of bacteria, microaerobic conditions and metronidazole. J. Exp. Med. 1984; 160: 353-68.

13) Ravdin, J. I. Pathogenesis of disease caused by *E. histolytica*: Studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. Rev. Infect. Dis. 1986; 2:247-60.

14) Singh, B. N; Sirvastra, R; Dutta, G. P. Virulence of strains of *E. histolytica* to rats and the effect of Cholesterol Rat Cecal Strains. Indian J. Exp. Biol. 1971; 9: 21-7.

15) Diamond, L. S; et al. *E. histolytica*: Iron and nutritional immunity. Arch. Invest. Med. Mex. 1978; 9 (supl 1) : 329-38.

16) Lushbaug, W.B; et al. Secuential histopathology of cavitary liver abscess formation induced by axenically grown *E. histolytica*. Arch. Pathol. Lab. Med. 1980; 575-9.

17) Jurumilinta, R; Maegraith, B.G. Enzymes of *E. histolytica*. Bull Wno. 1969; 50: 531-50.

18) Ravdin, J. I; Guerrant, R. L. Citopathogenic Mechanisms of *E. histolytica*. J. Exp. Med. 1980; 152: 377-90.

19) Muñoz, M.D; et al. The Collagenase of *E. histolytica*. J. Exp. Med. 1982; 155: 42-51.

20) Lundblad, G; Huidt; et al. β -N-Acetylglucosaminidasa from *E. histolytica*. Stocholm Physiol. 1981; 68B: 71-6.

21) Werries, E; Nebinger, P. Degradation of biogene oligosacaries by β -N-acetylglucosaminidasa secreted by *E. histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 1983; 7: 127-40.

22) Pittman, F. E; Henniger, G. R. Sigmoidoscopic and colonic mucosal biopsy findings in amebic colitis. Arch. Pathol. 1974; 97: 155-8.

23) Brandt, H; Perez Tamayo, R. Pathology of human amebiasis. Hum Pathol. 1970; 1: 352-85.

24) Lushbaug, W. B; Kairalla, A. B; et al. Isolation of a citotoxin-endotoxin from *E. histolytica*. J. Infect Dis. 1979; 9-17.

25) Uderzulu, I. A; Leitch, G. J; Bailey, G. B. Use of indometacin to demonstrate enterotoxic activity in extracts of *E. histolytica* trophozoites. Infect Immun. 1982; 34: 795-801.

26) Bos, H.-J; et al. *E. histolytica*: Citopathogenicity, including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. Exp. Parasitol. 1980; 34: 2-8.

27) Lopez-Revilla, R; Said - Fernandez, S. Citopathogenicity of *E. histolytica*. Causes intestinal secretion: role of serotonin. Science. 1988; 22: 762-4.

28) Mc Gowan, K; Deneke, C. F; et al. *E. histolytica* citotoxin: purification, characterization, strain virulence and protease activity. J. Infect. Dis. 1982; 146: 616-25.

29) Martinez-Palomo; et al. Structural bases of the cytolytic mechanisms of *E. histolytica*. J. Protozool. 1985; 32 (1): 166-75.

30) Schirrmann-Gaytan, E. I. Amebiasis. Observaciones de laboratorio. Infectologia. 1987; Año 7 (1).

31) Aust Kettis; et al. Actin in *E. histolytica* trophozoites revealed by human actin antibodies. J. Parasitol. 1977; 63: 581-3.

32) Ravdin, J. I; Guerrant, R.L. Role of adherence in citopathogenic mechanisms of *E. histolytica*: study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin Invest Med. 1981; 68: 1305-13.

33) Trissi, D; Martinez-Palomo, A; et al. Surface properties related to concanavalin A - induced agglutination: a comparative study of several *E. histolytica* strains. J. Exp. Med 1977; 145: 652-65.

34) Ravdin, J. I; Murphy, C. F; et al. Effect of calcium and phospholipase A antagonists in the citopathogenicity of *E. histolytica*. J. Infect Dis. 1985; 152:542-9.

35) Werries, E; et al. dDegradation of biogene oligosacaries by β -N-acetylglucosaminidasa secreted by *E. histolytica*. Mol. Biochem Parasitol. 1983; 7: 127-40.

REFERENCIAS AL CAPITULO III.A

1) Sepulveda, B. Inmunología de la amibiasis, en Memorias de la Conferencia Internacional sobre amibiasis, Sepulveda, B. y Diamond, L.S.; Eds.I.M.S.S. Mexico, 1976.

2) Trissi, D. Immunology of *E. histolytica* in human and animal hosts. Rev Infect Dis. 1982; 4: 1154-84.

3) Barranco-Tovar; Issibasi, A; Kumate, R, et al. Inhibición por anticuerpos de la adherencia de los trofozoitos de *E. histolytica*. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17: 237-241.

4) Acosta, G; Campos, C; et al. Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive and thropozoites of *E. histolytica*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1983; 409: 760.

5) Molmgran, J; et al. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemmaglutination) and enterotoxin binding of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 1981; 33: 136.

6) Acosta-Altamirano; Terrez-Sanchez; Isibasi-Araujo; et al. Deteccion de anticuerpos de clase IgA dirigidos contra la lipopeptidofosfoglicana de *E. histolytica* en muestra de calostro humano. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17: 291-5.

7) Acosta, G; Rocha, L. M; Isibasi, A; et al. Human macrophages are citotoxic against thropozoites of *E. histolytica*. Fed. Res. 1975; 19: 1028.

8) Calderon, J; Schreiber, R.D. Activation of the Alternative and Classical Complement Pathways by *E. histolytica*. Infection and Immunity. Nov, 1985. 560-65.

9) Musoke, A.J; Barbet. Activation of complement by variant - specific surface antigen of *Tripanosoma brucei*. Nature. London. 1977; 270: 438-40.

10) Muñoz- Espinoza, L; Salazar-Flores, O. Serum or plasma levels of C3, factor H and C3b in patients with amebic liver abscess. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17: 297-300.

11) Ortiz-Ortiz, L; et al. Activation of the alternate pathway of complement by *E. histolytica*. Clin. Exp. Immunol. 1978; 34: 10-18.

12) Wilhelm-Vogel; Alainz, R; Capan, R; Ortiz-Ortiz, L. Efecto del acoplamiento de un activador de la via alterna del complemento a un anticuerpo monoclonal anti-*E. histolytica* no activador del complemento. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17: 286-92.

13) Ghadirian, E; Meerovitch, E. Effect of complement depletion on hepatic amoebiasis in hamsters. Clin. Immunol. 1982; 24: 315-9.

REFERENCIAS AL CAPITULO III. B

1) Guerrant, R. L; Bush, J; Ravdin, J. I. Interaction between *E. histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 1981; 143: 83-93.

2) Ravdin, J. I; Salata, R. A; Guerrant, R. L; et al. The N-acetyl-D-galactosamine -inhibible lectin of *E. histolytica*: I-partial purification and relationship to amoebic in vitro virulence. J. Infect. Dis. 1985; 141: 816-22.

3) Castellanos, C; Ortiz-Ortiz, L. Efecto de sobrenadantes obtenidos de linfocitos estimulados con concanavalina A sobre trofozoitos de *E. histolytica*. Arch. Invest. Med. 1986; 17: 225-9.

4) López-Osuna, M; Contreras, B. A; Kretschmer, R. In vitro interaction of polymorphonuclear leukocytes and *E. histolytica*. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17: 247-49.

5) Perez-Tamayo, R; Becker, I; Monntfort, I; et al. *E. histolytica*: Role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amoebiasis in the rat. Exp. Parasitol. 1988; 67: 268-80.

6) Ghadirian, G; Meerovitch, E. Effect of immunosupresion on the size and metastasis of the amebic liver abscess in hamsters. Paris, 1988. International Congress of Immunology.

7) Meerovitch, E; Ghadirian, E. Effect of *Trichinella spiralis* infection on the experimental amoebic liver abscess in hamsters. Arch. Invest. Med. 1980; 11 (supl 1): 185-8.

8) Ghadirian, E; Meerovitch, E. Role of macrophages in host defence against hepatic amoebiasis in hamsters. Infect Immun. 1983; 42: 1017-9.

9) Stern, J. I; Graybill, J. R; et al. Murine amoebiasis: The role of macrophage in host defence. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 33: 372-80.

10) Guerrero, M; Rios, D; et al. Interaction between thropozoites of *E. histolytica* and lymphocytes of patients with invasive amoebiasis. Memorias de la conferencia internacional sobre amebiasis. Mex. IMSS, 1976: 529-39.

11) Stemberger, H. Zytolytische Immunreaktionen *in vitro* gegen Thropoziten von *E. histolytica*. Immung Infekt. 1978; 6: 71-8.

12) Salata, R. A; Cox, J. G; Ravdin, J. I. The killing of virulent *E. histolytica* thropozoites. Clin Res. 1984; 32: 365-A.

13) Salata, R.A; Murray, H. W; Ravdin, J. I. The role of γ interferon in the generation of human macrophages and T lymphocytes capable of killing virulent *E. histolytica* thropozoites. Am. Soc. of Trop. Med. & Hyg. 1985.

14) Denys, M; Chadee, K. *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage functions in amebiasis. Infect. Immun. Dec. 1988; 3126-31.

15) Ghadirian, E. & Meerovitch. Macrophage requirement for host defence against experimental hepatic amoebiasis in hamsters. Parasite Immunol. 1983; 4: 219-23.

16) Ghadirian, E; Meerovitch, E. & P.A.L. Kongshavin. The role of macrophages in defence against experimental hepatic amoebiasis in hamsters. Infect. Immun. 42: 1017-19.

17) Salata, R. A; Martinez-Palomo, et al. Patients treated on amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *E. histolytica*. J. Immunol. 137: 2633-39.

18) Salata, R. A. & Ravdin. N-acetyl-D-galactosamine-inhibible adherence lectin of *E. histolytica* II. Mitogenic activity of human lymphocytes. J. Infect. Dis. 151: 816-22.

19) Stern, S. J. Ggaybill, J.R. Drutz, D.J. Murine amebiasis: The role of macrophage in host defence. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 33: 372.

20) Parmely, M. J; Williams, S. B. Immunology of breast milk. Raven Press, New York. 1979; pag 173.

21) Rocha-Ramirez; Kumate-Rodriguez; et al. Interaccion *in vitro* de trofozoitos de *E. histolytica* con macrófagos de calostro humano. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17: 307-12.

22) Bionda, G; Feri, N; et al. Antibody dependendent citotoxicity of human mononuclear phagocytes: defective stimulation of tumoricidal activity in milk macrophages. Clin. Exp. Immunol. 1982; 50: 701.

23) Weaver, E. A; Tsuda, R.M; Goldblum, A.S; et al. Relationship between phagocytes and IgA. Release from colostrum macrophages. Infect Immun. 1982; 38: 1073.

24) Diamanstein, T; Klesm M; et al. Interaction between *E. histolytica* and the immune system. I. Mitogenicity of *E. histolytica* extracts for human peripheral T lymphocytes. J. Immunol. 1981; 126: 2084-6.

25) Acharya, D. P; Sen, P. C. Rosetting cells in amoebic liver abscess. Indian. J. Med. Res. 1981; 74: 348-51.

26) Salata, R. A; Martinez-Palomo, A; et al. Patients treated for amoebic liver abscess develop T-lymphocyte responses effective in vitro against *E. histolytica*. Clin. Res. 1985; 33: 418 A.

27) Salata, A; Ravdin, J.I. Review of Human Immune Mechanisms directed against *E. histolytica*. Rev. of Infect. Dis. 1986; 8: 261-72.

28) Sepulveda, B. Inmunología de la amibiasis, en Memorias de la Conferencia Internacional sobre amibiasis, Sepulveda, B. y Diamond, L.S; Eds. I.M.S.S. México, 1976.

29) Santa-Cruz, M; Isibasi, A; Kumate, J; et al. Evaluación de la inmunidad celular en pacientes con absceso hepático amibiano utilizando la prueba de inhibición de la migración de los leucocitos (LIF). Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17: 319-25.

30) Campos-Rodriguez, R; Isibasi, A; Kumate, J; et al. Celulas plasmaticas anti-amiba en sangre periferica de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17 (supl): 303: 6.

- 31) Ginsburg, W. W; Finkelman, F. D; et al. Circulating and mitogen induced immunoglobulin secreting cells in human peripheral blood: evaluation by a modified reverse hemolytic plaque assay. J. Immunol. 1978; 120: 33.
- 32) Howard, D; Faul, W. E. Regulation of B cell growth and differentiation by soluble factors. Ann. Rev. Immunol. 1983; 1:137.
- 33) Beer, D.J; Matloff, S.M; et al. The influence of histamine on immune and inflammatory responses. Adv. Immunol. 1984; 35: 209.
- 34) Isibasi, A; Campos-Rodriguez, R; et al. Papel de la histamina en la respuesta inmune local anti-amiba. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17 (supl): 273.

REFERENCIAS AL CAPITULO IV

- 1) J. A. Walsh. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the global magnitude of Morbidity and Mortality. Rev. Infect. Dis. 1986; 8; 2: 228-38.
- 2) J. A. Walsh. Amebiasis in the world. Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17 (supl): 385.
- 3) Lobel, H. O; Kagan, I.G. Seroepidemiology of parasitic diseases. Ann. Rev. Microbiol. 32: 329-47.
- 4) G. R. Healy. Immunologic tools in the Diagnosis of Amebiasis: Epidemiology in the United States. Rev. Infect. Dis. 1986; 8: 239-46.
- 5) Terrez-Rodriguez, J.M. Diagnóstico inmunológico de las enfermedades parasitarias. Medicine. Enfermedades infecciosas.

6) Torian, D. E. Serologic response to the 96 000-Da surface antigen of pathogenic *E. histolytica*. J. Infect. Dis. 1989; 159 (4) : 744-7.

7) Jackson, T; Anderson, C. B; et al. Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. Trans. Roy. Soc. Med. Hyg. 1984; 78: 342.

8) Onfre-Muñoz; Hernández-Velarde, R; et al. ¿Es posible diferenciar entre infección hepática antigua y reciente mediante análisis inmunoenzimático? Arch. Invest. Med. Mex. 1986; 17 (supl): 327-30.

9) Pérez de Suárez; Pérez-Schael; et al. Immunocytochemical detection of *E. histolytica*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1987; 81: 624-6.

REFERENCIAS AL CAPITULO V

1) Sepúlveda, B. Inmunología de la amebiasis, en Memorias de la Conferencia Internacional sobre amebiasis. Sepúlveda, B. y Diamond, L.S; Eds. I.M.S.S. Mexico, 1976.

2) Ghadirian, E. & P.A.L. Kongshavin. The effect of splenectomy on resistance of mice to *E. histolytica* infection. Par. Immunol. 1985; 7: 479-87.

3) Salata, R. A; Martínez-Falomo, A; et al. Patients treated for Amebic Liver Abscess develop Cell-Mediated Immune Responses effective *in vitro* against *E. histolytica*. Journal of Immunol. 1986; 13: 2633-39.

4) Schneider, E.L. Infectious diseases in the elderly. Ann. Intern. Med. 1983; 98: 395.

5) Purnima, C. K; Vinnik, V. K; Nain. Elicitation of protective immunity to *E. histolytica*, an experimental study. Immunol. Cell. Biol. 1987; 65: 217-22.

6) Ghadirian, E. & P.A.L. Kongshavn. Protection of mice against amoebiasis with B.C.G.; *Corynebacterium parvum* and *Listeria monocytogenes*. Parasite Immunology. 1986; 8: 663-67.