

03062
3
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UACPyP/CCH.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

"PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNE SECRETORA
EN AMIBIASIS"

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN INVESTIGACION

BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

JULIO CESAR CARRERO SANCHEZ

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

- Dr. Librado Ortíz-Ortíz, por permitir que una parte de mi formación se diese en su laboratorio. Gracias por su amistad y apoyo.
- Dra. Bertha Espinoza y Dr. Lino Dfáz, por su amistad, comprensión y valiosa orientación académica en sus funciones como co-tutores de este proyecto.
- Biol. Martha Yadira Díaz, por su valiosa amistad, cariño, apoyo y comprensión. Por haber dejado sentado las bases sobre las cuales se fundamenta este trabajo. En buena medida esta tesis es tuya. Por coincidir, gracias.
- Biol. Antonio Ramirez, Q.F.B. Carlos Castellanos y Biol. Angel Oliva. Gracias por la asistencia técnica que me brindaron, por su amistad y colaboración.
- A mis compañeros de laboratorio: Gloria, Reyna, Nancy, Adriana, Mónica, Anita, Mona, Sadhna, Norma, Ruth, Prabir, Don Carmelo y Charlie por hacerme sentir en familia.
- A mis amigos: Dayana, Benjamín, Isabel, Martha, 2x Claudia, Verónica, Norma, Alfredo, Miriam, Alejandro, Cuahutemoc, nacho, Jorge, Rosario, Germán, Martha E., Fernando, Aquiles y demás.

- A las secretarias del departamento: Violeta, Pelita, Isabel, Amada y Lucy. Gracias por su apoyo.
- Al fotógrafo y dibujantes del instituto: Sr. José Aviléz y Sres. Enrique Vazquez y Rafael por su valiosa colaboración.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
1. Historia de la amibiasis	3
2. Biología de <i>Entamoeba histolytica</i>	8
2.1 Clasificación taxonómica	8
2.2 Descripción del parásito	9
2.3 Ciclo de vida	11
3. Epidemiología de la amibiasis	12
4. Patología amibiana	16
5. Inmunidad en la amibiasis	17
5.1 Inmunidad celular	19
5.2 Inmunidad humoral	22
6. Adherencia amibiana	28
7. Inmunoglobulina A secretoria	39
III. Planteamiento del problema	44
IV. Objetivos	46

V. Publicación: "Human secretory immunoglobulin A anti-Entamoeba histolytica antibodies inhibit adherence of ameba to MDCK cells."	47
1. Resumen	764
2. Introducción	764
3. Material y métodos	764-5
4. Resultados	765-6
5. Discusión	766-7
6. Bibliografía	767
VI. Otros resultados y comentarios finales	52
VII. Bibliografía general	59

RESUMEN

El paso esencial en la patología amibiana se inicia con la colonización del intestino a través de un proceso de adhesión mediado por lectinas de superficie. El objetivo de este trabajo fué el de analizar la respuesta inmune secretora en la saliva de pacientes con amibiasis intestinal a través de la determinación de anticuerpos IgA secretorios anti-amiba y la capacidad de los mismos de inhibir la adherencia amibiana.

En inmunotransferencias contra un extracto crudo de trofozoitos de la cepa HM1-IMMS usando un conjugado anti-IgA humana peroxidado, las salivas de los pacientes con amibiasis intestinal reconocieron predominantemente bandas de 23, 26, 36, 59, 87, y 170 kDa. Esta última podría corresponder a la subunidad pesada de una lectina con afinidad por galactosa descrita como una de las principales moléculas mediadora de adhesión en *Entamoeba histolytica*. La subunidad de 170 kDa se purificó por cromatografía de afinidad en columna de galactosa-agarosa y a través de inmunoblot fué reconocida por el 61% de las salivas de los pacientes. También se analizó el efecto de de las salivas de los pacientes sobre la adherencia de trofozoitos a monocapas de células MDCK a través de un ensayo inmunoenzimático desarrollado en el laboratorio por Díaz, M.Y. El 80% de las salivas inhibieron la adhesión de trofozoitos en más del 20% con una media de 35%. En contraste, salivas de pacientes con otras enfermedades parasitarias y de sujetos sanos sólo inhibieron en promedios de 13% y 9% respectivamente. Anticuerpos IgA

purificados a partir de las salivas de los pacientes con amibiasis inhibieron la adhesión al mismo nivel que las salivas totales. La inhibición se debió a anticuerpos IgA secretorios anti-amiba y en parte anti-lectina como se demostró por experimentos de absorción de las salivas con antígeno total y con la fracción de la lectina purificada.

En conclusión los anticuerpos IgA secretorios anti-amiba desempeñan un papel relevante en los mecanismos de defensa local contra la invasión amibiana probablemente a través del bloqueo de la adhesión.

AMIBIASIS

Definición

La amibiasis es definida por el Comité de Expertos de la OMS como la condición de portador del parásito *Entamoeba histolytica* (Fig. 1), con ó sin manifestaciones clínicas (World Health Organization Expert Committee, 1969).

Historia de la amibiasis

E. histolytica como un parásito protozoario anaeróbico, probablemente apareció en la tierra muchos eones antes que el hombre y lo ha acompañado a lo largo de su carrera evolutiva. Aunque no hay pruebas de ello, se sospecha que algunas afecciones disentéricas documentadas en la antigua Grecia y China podrían haberse debido a este parásito (Vaidya y Ray, 1982). Sin embargo, recientemente se describió la presencia de restos fósiles, al parecer de *E. histolytica*, en una momia egipcia sometida a una autopsia. En tal caso, no sería extraño que *E. histolytica* haya sido un parásito del hombre desde la más remota antigüedad. En el año 1828,

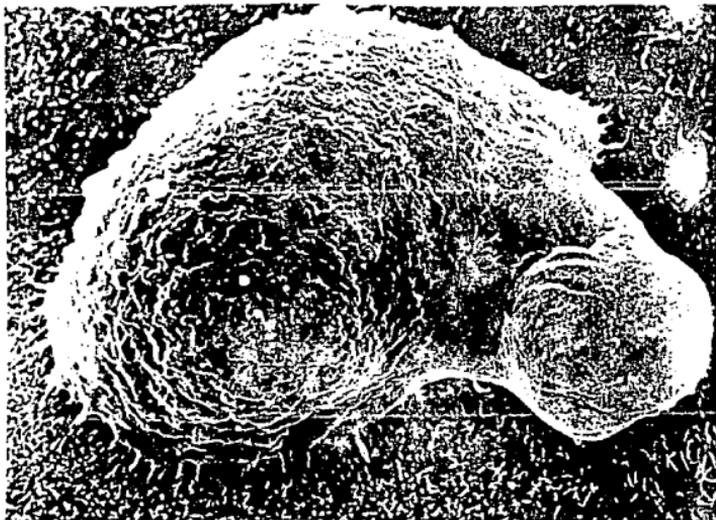


Figura 1. Trofozoito de Entamoeba histolytica adherido a una célula epitelial cultivada. Note el lobopodio al extremo derecho y la superficie arrugada con numerosos filopodios a la izquierda. (Gonzales-Robles y Martínez Palomo, J. Protozool.)

un médico inglés llamado James Annesley publicó 2 volúmenes dedicados a describir las enfermedades que más aquejaban a la India en ese momento. Entre ellas describió la disentería con absceso hepático, sin lograr establecer una relación directa entre ambos (Annesley, 1828).

A finales del siglo XVIII, bajo el reinado de Carlos IV de España, debido a los estragos causados por lesiones hepáticas en México, se publicaron dos referencias acerca del tema, describiéndose en ambos la enfermedad como una lesión purulenta causada por obstrucción inflamatoria del hígado, en donde la única solución razonable era la cirugía (Fourmes, 1956). En 1846, Parker un médico inglés de servicio en la Armada de la India, describió una forma de hepatitis primaria con lesiones supurativas, acompañada algunas veces de disentería grave en autopsias de pacientes seguramente muertos de amibiasis (Parker, 1846). En 1856 Miguel Jiménez escribió acerca de la importancia del estudio del absceso hepático en México, basado en dos poderosas razones: la alta incidencia de la enfermedad en México y la falta de tratamiento efectivo (Jimenez, 1856).

La historia moderna de la amibiasis comenzó en el año 1875 cuando el médico Ruso Fedor Aleksandrovich Lösch publicó en el "Virchows Archiv für Pathologische Anatomie" un artículo titulado: "Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso" (Lösch, 1875). Lösch se basó en el caso de un granjero ruso de 24 años el cual trató

durante seis meses hasta su muerte en Abril de 1874. Se trataba de un caso típico de disentería amibiana con moco, sangre y numerosas amibas móviles con eritrocitos en su interior. Describió algunas características del núcleo y diferenció el ectoplasma del endoplasma. Además, Lösch trató de reproducir la enfermedad en perros mediante la administración de la material fecal del paciente por vía oral y rectal. Al parecer sólo uno de los cuatro perros, así tratados, desarrolló un cuadro aparente de disentería. El llamó al agente Ameba coli debido a su habitat en el colon.

Robert Koch, en el año 1886, a su paso por Egipto estudió 5 casos de disentería amibiana, dos de ellos con absceso hepático, e identificó por primera vez la presencia de amibas en paredes y capilares de absceso hepático, demostrandolas por medio de tinción (Koch, 1887). El mismo año, Kartulis, un médico griego, publicó sus observaciones de 150 pacientes egipcios con disentería y presencia de amibas en heces (Kartulis, 1886) y Jaroslav Hlava reportó 60 casos en Praga (Stillwell, 1955). A estas siguieron una serie de publicaciones, de las cuales la más importante fué la de William Councilman y Henry La Fleur, ambos de la Universidad John Hopkins, quienes cambiaron el término de Amoeba coli por Amoeba dysenteriae, considerándolo más convincente al plantear la posibilidad de existencia de otras amibas en el intestino grueso (Councilman, 1891). En 1893, los alemanes Quincke y Roos, demostraron la existencia de una amiba diferente de la E. dysenteriae incapaz de fagocitar eritrocitos y causar lesiones tisulares, y que hoy en día

conocemos como *E. coli* (Quincke y Roos, 1893).

Otros estudios realizados a principio del siglo XX llevaron al descubrimiento de otras especies de amibas y de agentes bacterianos causantes de disentería. Kuenen y Swellengebel en 1913 propusieron que la amiba pasa por 3 estadios en su ciclo de vida: el invasivo, un estado comensal ó minuta y el de quiste (Kuenen y Swellengebel, 1913). En 1925, se logró con éxito el primer cultivo de amiba por Boeck y Drbohlav usando un medio donde las amibas crecían en presencia de bacterias (Boeck y Drbohlav, 1925). Casi cuatro décadas después se abrió una nueva era en los estudios de *E. histolytica* cuando Diamond logró cultivar amibas en medio axénico (Diamond, 1961).

A partir de entonces, muchos estudios se han orientado hacia el diagnóstico sérico más confiable que el coproparasitoscópico; entre las pruebas usadas tenemos a la prueba de fijación del complemento con extracto amibiano axénico (Rees y col., 1942) y la aglutinación de partículas de latex ó de eritrocitos (Morris y col., 1970). Estas pruebas serológicas demostraron la presencia de anticuerpos sólo en caso de invasión tisular por el parásito y la persistencia de los mismos por largos períodos de tiempo (Morris y col., 1970). En la pasada década la mayor parte de los esfuerzos estuvieron dirigidos a resolver el llamado "Enigma de la Amiba" (Spice y Ackers, 1992), que implicaba definir la existencia de dos cepas de *E. histolytica*,

la patógena y la no patógena, sin resultados concluyentes. Se hizo una diferenciación por su patrón isoenzimático y se trataron de definir moléculas potencialmente involucradas en la capacidad citopatogénica de la amiba. En la actualidad se están tratando de definir los epítopes de una molécula con actividad de lectina involucrada en la adhesión amibiana, que reconocen las células T y B, en lo que parece ser por ahora el trabajo más promisorio de una vacuna en el futuro (Ravdin y col., 1993).

Biología de la Entamoeba histolytica

Clasificación taxonómica

La *Entamoeba histolytica* (Figs. 2 y 3) se clasifica taxonómicamente como sigue (Zaman-Vigar, 1979):

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Superclase	Sarcodina
clase	Rhizopodea
Familia	Entamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	histolytica

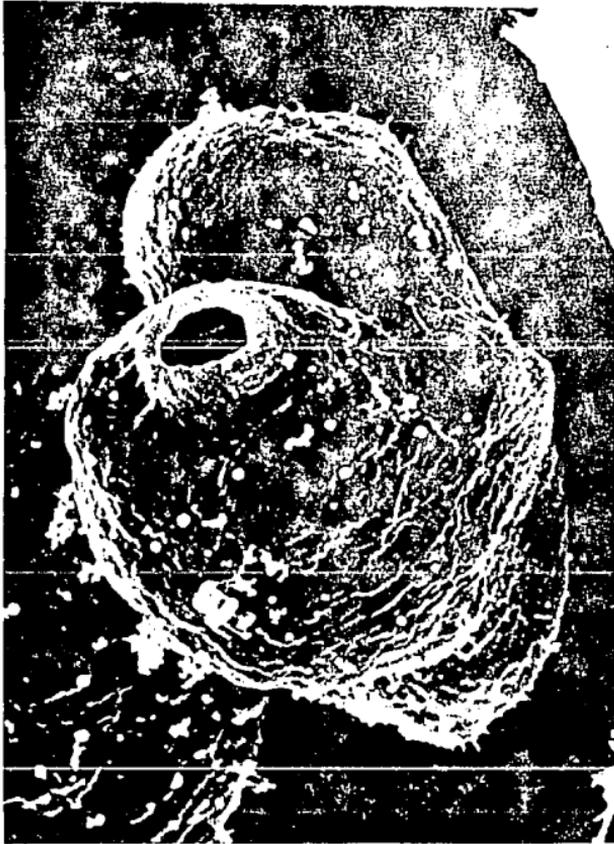


Figura 2. Apariencia de un trofozoíto de Entamoeba histolytica después de la citólisis de células intestinales en cultivo. (Rigothier y col., 1991).



Figura 3. Detalle de una vacuola fagocítica de un trofozoíto de *Entamoeba histolytica*. Note el grosor (B) alrededor del canal fagocítico (C) formado por la membrana plasmática. Barra lum. (Rigothier, y col., 1991).

Descripción

El protozooario *E. histolytica* se considera como un prototipo de célula eucariote muy primitiva. El trofozoito es la forma móvil e invasiva y mide entre 10 y 60 μm de diámetro, con un promedio de 25 μm (Noble y Noble, 1976) (Fig. 4). Contiene un núcleo organizado que mide de 3-5 μm , con cromatina periférica fina y un nucleolo central. Sin embargo, la división nuclear se presenta sin cromosomas evidentes y su organización citoplasmática es rudimentaria, con un ectoplasma y un endoplasma granular con numerosas vacuolas (Martínez-Palomo, 1987).

El trofozoito se mueve a través de la emisión de unas proyecciones citoplasmáticas llamadas filopodios. A diferencia de una célula eucariótica típica, *E. histolytica* carece de un citoesqueleto estructurado. Se ha identificado actina (Meza y col., 1983) y unas estructuras tipo microfilamentos (Michel y Schupp, 1976), pero aún hay controversias en cuanto a la presencia ó ausencia de tubulina. En el mismo orden, los trofozoitos también carecen de mitocondrias, de un sistema membranal del tipo aparato de Golgi y retículo endoplásmico y de lisosomas primarios y secundarios (Martínez-Palomo, 1987).

La superficie de la amiba está constituida por una sólo membrana plasmática de

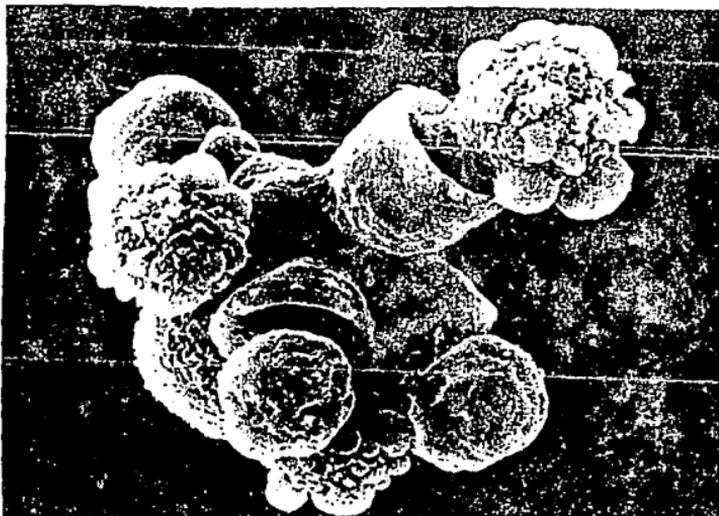


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de una amiba fagocitando simultáneamente media docena de células epiteliales (Martínez-Palomo, 1987).

aproximadamente 10 nm de ancho; el estudio de sus componentes revela la presencia de una cubierta rica en carbohidratos ó glucocalix, más evidente en trofozoítos aislados de tejidos que cultivados (Lushbaugh y Miller, 1974) y una región uroide donde se aglomeran vesículas que descargan al exterior (Pittman y col., 1973). Varias de sus glicoproteínas de superficie tienen actividad de lectina y están involucradas en la adherencia de amibas a diferentes tipos celulares. También se han identificado receptores, como el de la colágena y fibronectina, que pueden participar en la destrucción de células de mamífero y tejidos, subsecuente al proceso de adhesión (Kretschmer, 1990).

El trofozoíto también presenta un complejo y extenso sistema de enzimas (zymodemos), cuyo patrón electroforético en geles de almidón, se ha sugerido como un eficiente método de diferenciación entre cepas patogénicas y no patogénicas (Sargeant y col., 1978). Entre algunas de las enzimas más importantes identificadas en los trofozoítos se encuentran: la glucosa fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa, oxidoreductasa y hexoquinasa (Sargeant y col., 1978).

Por otra parte, el quiste, que es la forma infectante y de resistencia de *E. histolytica*, mide entre 5 y 20 μm de diámetro, con 12 μm como promedio (Fig. 5). Dependiendo de su estado de madurez puede presentar de 1 a 4 núcleos idénticos al núcleo de los trofozoítos (Smith y col., 1979). La principal característica estructural

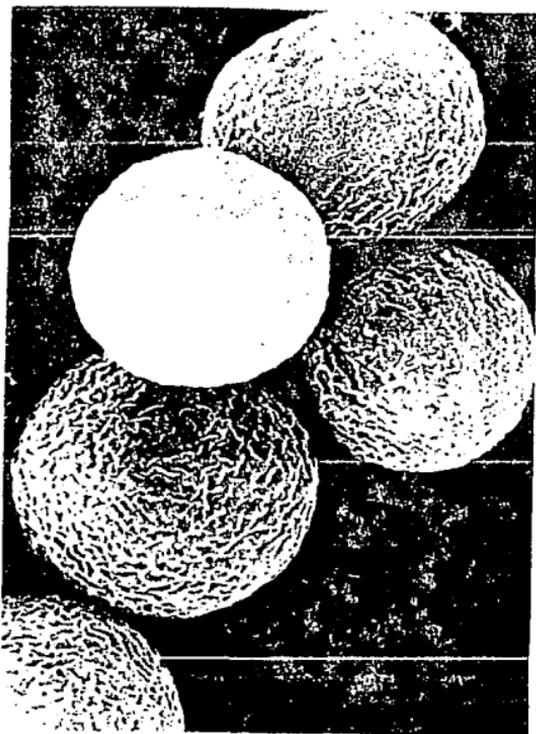


Figura 5. Quistes de Entamoeba histolytica vistos al microscopio electrónico de barrido (Martínez-Palomo, 1987).

del quiste es la presencia de una capa de recubrimiento de quitina que le confiere al parásito resistencia al medio ambiente y a la acción de los jugos gástricos a su paso por el estómago, dentro de lo que es el ciclo de vida de este parásito.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. histolytica* es sencillo, sin estado sexual ni hospedero intermediario, oscilando entre 2 estados diferentes, el quiste infectante y el trofozoito que es la forma vegetativa (Fig. 6).

El ciclo se inicia con la ingestión del quiste, que es la forma infectiva, a través de alimentos y agua contaminados con materia fecal. Los quistes provienen de personas infectadas ó portadoras asintomáticas que los excretan al medio ambiente donde son capaces de vivir hasta meses en un medio húmedo que evite su desecación (Noble y Noble, 1976). Gracias a su cubierta de quitina, los quistes ingeridos son capaces de resistir al efecto destructivo de los jugos gástricos hasta alcanzar la parte baja del intestino delgado donde ocurre la exquistación. De este proceso es muy poco lo conoce. El núcleo liberado, se divide para formar 8 núcleos, seguido de divisiones citoplasmáticas que dan origen al citoplasma y membrana celular de cada

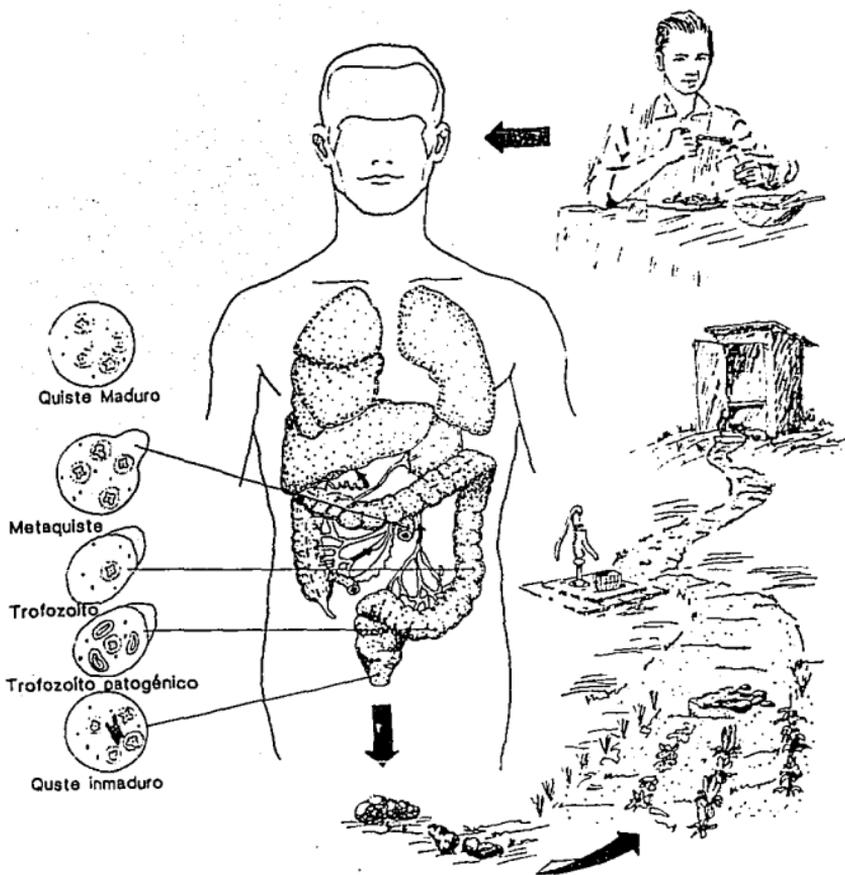


Figura 6. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (Wyler, 1990; Beck y Davies, 1983).

uno de los núcleos divididos, emergiendo finalmente, 8 trofozoitos amibianos que pasan a colonizar el intestino grueso (Barker y Swales, 1972).

Bajo ciertas condiciones aún no muy bien definidas, el trofozoito sufre un proceso activo de enquistamiento con dos divisiones nucleares, glicólisis anaeróbica y síntesis de DNA (Gonzales-Robles y Martínez-Palomo, 1983). Así, un individuo infectado excreta cerca de 45 millones de quistes por día (Barker y Swales, 1972), completando de esta forma el ciclo de vida. Los estudios hasta ahora realizados indican que al parecer, el único huésped definitivo es el ser humano (Martínez-Palomo, 1987).

Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis es una enfermedad cosmopolita, generalmente asociada a países en desarrollo, de condiciones socio-económicas pobres, hábitos poco higiénicos y malnutrición. No es raro que la enfermedad sea considerada como uno de los "síndromes de la pobreza". El parásito infecta a 500 millones de personas en todo el mundo excepto China, de los cuales sólo el 10% resulta en casos de colitis ó absceso extraintestinal provocando entre 50,000 y 60,000 muertes anuales. La

amibiasis ocupa la tercera posición mundial como causa de muerte por parasitosis sólo detrás de la malaria y esquistosomiasis (Walsh, 1986a). Revisiones epidemiológicas de Walsh (1986b) indican, que como resultado del crecimiento poblacional el número actual de infecciones se ha incrementado.

Algunos de los factores más comunes asociados a la transmisión de *E. histolytica* comprenden (Kretschmer, 1990):

- 1) Alimentos contaminados debido al uso de técnicas inadecuadas de fertilización e irrigación.
- 2) Falta de higiene en el procesamiento de los alimentos y en el aseo.
- 3) Eliminación inadecuada de excretas.
- 4) Hábitos sexuales no ortodoxos.
- 5) Tratamiento inadecuado de aguas e insuficiente suministración de la misma.

La amibiasis invasora es uno de los principales problemas de salud pública en ciertas regiones de Africa, Asia y América Latina (Sepúlveda, 1970; Sepúlveda, 1979). La determinación de anticuerpos en México presenta valores que van de 2.3 a 9.95% por contrainmunolectroforesis (CIE) y del 29% en una población rural por hemaglutinación indirecta (IHA). En Asia, Indonesia presenta valores de 7 a 34% en áreas rurales y en Africa, Tanzania presenta valores de 1 a 57%, ambos detectados por IHA (Kretschmer, 1990). México es uno de los países más

afectados por *E. histolytica* a nivel mundial. Se estima que el 27% de la población está infectada con el parásito; y ocupa el quinto lugar como causa de muerte (Soberón y Pelaez, 1964).

En los últimos 20 años, se ha observado un avance importante en el diseño de métodos de muestreo de la población orientados probabilísticamente (Krestchmer, 1990). En México, se han realizado varias encuestas seroepidemiológicas. En 1972 se estudiaron 7,532 sueros de pacientes de hospitales localizados en Ciudad de México y Yucatán detectándose por CIE una seroprevalencia de 5-6% (Landa y col., 1972). Empleando el mismo método de evaluación, en el mismo año, en 766 niños de la Ciudad de México se reportó una seropositividad de 3.9% (Gutierrez y col., 1974) y 5 años más tarde en 519 adultos de la misma ciudad de 6.6% (Crevena, 1977). Este último estudio también arrojó en el área rural una frecuencia de portadores de *E. histolytica* de 55%.

Un amplio estudio seroepidemiológico se realizó en 1974 en 19,442 individuos de 46 regiones urbanas de la República Mexicana, representando todas las áreas geoeconómicas y geomórficas del país; realizado por CIE arrojó un promedio de 5.95% de individuos con anticuerpos anti-*E. histolytica* (Gutierrez y col., 1976). El estudio seroepidemiológico más reciente y completo en su género llevado a cabo en México es el realizado por el grupo del Dr. Ortíz-Ortíz. Se analizaron por IHA

un total de 70,000 sueros del Banco de Suero Nacional, representativos de los 32 estados de la República Mexicana . Se tomaron en cuenta variables biológicas, geográficas, sociales, económicas y educacionales. La seroprevalencia fué de 8,41 % como promedio, con rangos de 9% en zonas del centro sur, pacífico sur y Yucatán y de 8% en los estados del norte, noreste y el Golfo Mexicano. Los resultados por ellos obtenidos, indican una mayor seroprevalencia hacia los estados del sur, en el sexo femenino y en la edad escolar. Por otra parte, se encontró una correlación inversa entre la presencia de anticuerpos y el nivel educacional y/o nivel socio-económico (Caballero y col., 1994).

Estos resultados implican un incremento de la incidencia de anticuerpos anti*Amiba* en los últimos años. Sin embargo, los últimos estudios realizados sobre la incidencia de absceso hepático amibiano en México revelan el efecto contrario. Así, de una incidencia de 5.4% en 5,000 necrópsias realizadas entre 1963 y 1973, se observó una disminución al 2,2% en el mismo número de necrópsias llevadas a cabo entre los años 1973 a 1979 (Ramos-Martínez y col., 1986).

La letalidad del absceso hepático amibiano en adultos disminuyó de 2.0% a 0.2% entre 1975 y 1977; y en casos infantiles de 26.9% a 1.1% entre 1976 y 1985 (González y Gutierrez, 1986). Sin embargo, a nivel mundial la incidencia sigue siendo elevada (Haffar y col., 1982).

Patología de la amibiasis

La patogénesis puede ser definida como el mecanismo de desarrollo de una enfermedad. En el caso de la amibiasis, de acuerdo a los síndromes que presenta el individuo infectado, la enfermedad puede ser dividida en tres renglones (Ortíz-Ortiz, 1994):

- . Asintomática
- . Sintomática sin evidencia de invasión tisular
- . Sintomática con evidencia de invasión tisular

La mayoría de los casos de amibiasis caé dentro del primer grupo (Trissl, 1982) y sólo un 10% de la población infectada presenta amibiasis del tipo invasiva (Walsh, 1986a). En términos generales, el concepto de enfermedad causada por *E. histolytica* incluye (Ravdin, 1986) (Fig. 7):

- 1) La colonización del intestino por una cepa de amiba virulenta.
- 2) Contacto íntimo ó adherencia a la mucosa intestinal.
- 3) Ruptura de las barreras intestinales por enzimas ó productos tóxicos liberados.
- 4) Lisis de las células epiteliales e inflamatorias del hospedero.
- 5) Penetración profunda, alcance de las vías circulatorias mesentéricas sanguíneas y linfáticas e invasión de órganos distantes (Principalmente el

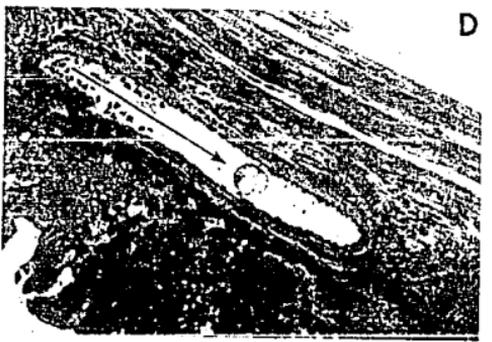


Figura 7. Secuencia en la patogénesis por Entamoeba histolytica. A. Trofozoito de E. histolytica adherido a la mucosa colónica. B. Par de trofozoitos en la parte externa de una glándula colónica. C. Serie de trofozoitos penetrando activamente a través de la glándula colónica. D. Trofozoito en el interior de una arteriola (Wyler, 1990).

hígado).

La enfermedad invasora se inicia a partir del tercer paso y como se mencionó antes, sólo se presenta en el 10% de la población afectada.

Los síntomas de la enfermedad gastrointestinal por *E. histolytica* pueden ir desde ligero dolor abdominal con leve diarrea hasta formas más graves con disentería, moco y sangre en las heces, fiebre, tenesmo, dolor abdominal intenso y a veces en adultos ameboma ó apendicitis. Estos últimos son signos inequívocos de invasión tisular.

El principal órgano blanco de la amibiasis invasora es el hígado, provocando el conocido absceso hepático amibiano, principal causa de muerte por esta parasitosis. Menos frecuentemente, las amibas en calidad de invasoras, pueden afectar otros órganos como pulmón, piel, genitales y cerebro (Treviño, 1990; Reed, 1992).

INMUNIDAD EN LA AMIBIASIS

El hecho de que la mayoría de la población infectada con *E. histolytica* no presente manifestaciones clínicas de enfermedad (portador sano), conviviendo con

el parásito en una relación que no resulta perjudicial para el hospedero y desde el punto de vista de expansión, benéfico para el parásito, habla de por sí de la presencia de mecanismos obviamente locales a nivel intestinal, que pueden estar evitando la invasión del tejido. También puede tratarse de personas infectadas con una cepa que carece de potencial patogénico. Asimismo, se ha hablado de la posible influencia de factores relacionados con el hospedero, como: alimentación, edad, sexo e incluso el estado ecológico del intestino delgado y su potencial de oxidación-reducción (Brown, 1970).

Se ha demostrado en la amibiasis invasora el desarrollo de una respuesta inmune, tanto de tipo celular como humoral, que aunque parece no ser muy efectiva en un principio, si lo es a posteriori, como lo demuestra la ausencia de casos de amibiasis invasora recurrente en pacientes recuperados de absceso hepático amibiano (Knobloch y Mannweiler, 1983).

El interés por el estudio de la respuesta inmune a *E. histolytica* se vio impulsado cuando Diamond logró por primera vez cultivar trofozoítos de *E. histolytica* en un medio axénico (Diamond, 1961). Gracias a esto, se empezaron a realizar estudios inmunológicos más fidedignos sobre los trofozoítos ó más específicamente sobre proteínas del parásito, obtenidas por métodos bioquímicos. Asimismo, se lograron obtener modelos experimentales *in vivo* de absceso hepático amibiano en hamsters

y cobayos, así como de la forma intestinal en el ratón.

Inmunidad celular

Hasta hace poco era tradicionalmente aceptado que las lesiones invasivas causadas por *E. histolytica*, se desarrollaban en ausencia de una reacción inflamatoria (Powell y col., 1959; Pérez-Tamayo, 1986). Sin embargo, un estudio más detallado en fases muy tempranas de la infección reveló la presencia de una reacción inflamatoria, que es enmascarada por la rápida destrucción de las células inflamatorias a causa de la amiba.

Así, una vez que el trofozoito ha invadido la mucosa intestinal, ocurre una respuesta inmune convencional. Células inflamatorias (principalmente macrófagos y polimorfonucleares) acuden al sitio de la invasión, donde ocurre el primer contacto con el antígeno amibiano (Tsutsumi y col, 1984). A pesar del gran número de macrófagos que intentan fagocitar a la amiba, ésta permanece intacta (Sher y col., 1980). Modelos experimentales de absceso hepático *in vivo* demuestran que *E. histolytica* comienza por destruir a las células polimorfonucleares (PMN) en las primeras horas, seguido de destrucción de eosinófilos, los cuales al contacto con la amiba degranulan, sin evidencia de destrucción del parásito (Tsutsumi y

Martínez-Palomo, 1988). La mayoría de los macrófagos al parecer se distribuyen en la periferia de la lesión, fagocitando restos celulares y no son destruidos por las amibas sino hasta etapas más tardías. Se sugiere que este último paso puede desempeñar un papel importante en la extensión del absceso hepático amibiano. Tsutsumi y col. (1984) también demostraron que la extensa destrucción del hígado se debe en buena parte a la lisis de las células inflamatorias.

Se ha observado que los trofozoítos amibianos son capaces de destruir *in vitro* a leucocitos polimorfonucleares (Artigas y col., 1966; Guerrant y col., 1981), células mononucleares de sangre periférica, células esplénicas y macrófagos peritoneales de animales inmunizados (Chadee y col., 1985). También se ha observado que *E. histolytica* es capaz de inhibir el estallido respiratorio de los polimorfonucleares (Arbo, 1990).

Durante la amibiasis invasora aguda se suprime la respuesta inmune mediada por células específicas para la amiba, como lo demuestra la anergia a las pruebas cutáneas con el antígeno amibiano (Ortíz-Ortíz y col., 1975). Asimismo, se ha encontrado disminución en el número de linfocitos T de ayuda (CD4), incremento en linfocitos T citotóxicos (CD8) y disminución en la respuesta proliferativa de linfocitos T a antígenos amibianos (Salata y col., 1986). Se ha implicado a proteínas amibianas intrínsecas ó secretadas ó ambas, como las responsables de estas disfunciones inmunes (Denis y Chadee, 1988; Salata y col., 1990).

Sin embargo, los estudios en modelos animales experimentales han indicado que los mecanismos inmunes mediados por células pueden limitar ó prevenir la formación de abscesos hepáticos amibianos (Meerovitch y Chadee, 1988). En estos modelos, la inmunización previa con protefnas totales del parásito induce protección contra la inoculación intrahepática de los trofozoítos virulentos de *E. histolytica* y el desarrollo de absceso hepático amibiano (Meerovitch y Chadee, 1988; Salata y Ravdin, 1988).

Hamsters sensibilizados con antígeno amibiano desarrollan una respuesta inmune celular (Haq y col., 1984) y al igual que los humanos con amibiasis invasora, son positivos en las pruebas serológicas. La hipersensibilidad de tipo tardía, ausente en la fase aguda de la amibiasis invasora, se hace positiva durante la recuperación; lo mismo ocurre con la prueba de inhibición de migración de los macrófagos (MIF) (Ortiz-Ortiz y col., 1975).

A pesar de la reducción en el número de células T y linfocitos T activados en pacientes con absceso hepático amibiano (Ahluwalia y col., 1982), la interacción *in vitro* de *E. histolytica* virulenta con linfocitos de pacientes recuperados de absceso hepático amibiano resulta en la lisis del parásito (Landa y col., 1976).

La interacción *in vitro* de una cepa virulenta de *E. histolytica* con células

mononucleares humanas no activadas, ocasiona la muerte de las células humanas sin daño aparente a la amiba. Sin embargo, la activación de los macrófagos con linfocinas, inducidas con antígeno amibiano, Concanavalina A (ConA) ó fitohemaglutinina destruye al parásito, por una vía independiente de anticuerpos, dependiente de contacto y tiempo, en la que participan procesos no oxidativos y oxidativos (Salata y col., 1985). El efecto amebicida se ha observado en macrófagos derivados de médula ósea activados con INF- Γ , TNF- α y/o Factor Estimulante de Colonias-1 (CSF-1) (Denis y Chadee, 1989).

En general, la mayoría de los estudios realizados en amibiasis consideran a la inmunidad celular como la más representativa de la protección adquirida (Kretschmer, 1986) y a los macrófagos activados como la célula efectora más eficiente contra los trofozoítos de *E. histolytica*.

Inmunidad humoral

La infección por *E. histolytica* conlleva a la aparición primaria de una respuesta local de anticuerpos específicos, aunque se desconoce el tiempo en que se desarrolla; sin embargo, los coproanticuerpos se han detectado en 80% de los pacientes con disentería amibiana. En contraste, menos del 4% de pacientes infectados con otros parásitos y sujetos sanos presentan una respuesta similar

(Sharma y col., 1978).

La determinación de coproanticuerpos por hemaglutinación indirecta (IHA) en niños con amibiasis intestinal mostró resultados similares (80%) (Martínez-Cairo y col., 1979). Sin embargo, tres semanas más tarde, sólo 55% de los pacientes se mantenían positivos, mientras que los anticuerpos séricos anti-*E. histolytica* ensayados por el mismo método se incrementaban significativamente. Los resultados sugieren que el curso habitual de la amibiasis invasora podría consistir de una respuesta secretora local pasajera seguida de la invasión y destrucción de la mucosa intestinal por amibas virulentas y la subsecuente producción de anticuerpos circulantes (Trissl, 1982; Harries, 1982).

Varios estudios han demostrado que los coproanticuerpos anti-*E. histolytica* parecen pertenecer principalmente a la clase IgA (Merino y col., 1990). Se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgA secretorios anti-*E. histolytica* en bilis de ratas inmunizadas intracecalmente (Acosta y col., 1983), en secreciones de fleon, colon y materia fecal de pacientes con absceso hepático amibiano (O'Shea-Alvarez y col., 1985) y en leche (Grundy y col., 1983), calostro (Acosta y col., 1985) y saliva humana (Del Muro y col., 1989).

Siendo la respuesta IgA secretoria local la directamente comprometida espacial y

temporalmente, con el inicio de la infección por *E. histolytica*, podría ser de suma importancia en el control de la misma. Así, en un amplio estudio realizado en Bangladesh, la prevalencia de *E. histolytica* en infantes de 6 a 10 meses de edad amamantados por madres infectadas con el parásito fué prácticamente nula sugiriendo protección contra el parásito gracias a la presencia de IgA en la leche materna (Islam y col., 1988). Sin embargo, los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar anticuerpos IgA secretorios seguramente a través de las proteinasas que contienen (Quezada-Calvillo y col., 1987).

La invasión del tejido intestinal por *E. histolytica* genera una respuesta inmune humoral con producción de anticuerpos específicos circulantes (Sepúlveda, 1979), que generalmente son detectados hasta una semana después de la aparición de los síntomas (Kagan, 1973; Sepúlveda, 1980). Es de hacer notar que el título de anticuerpos persiste aún después de que la amibiasis invasora ha sido curada ó controlada (Knobloch y Mannweiler, 1983). Tales anticuerpos específicos anti-amiba pueden permanecer por años debido probablemente a la presencia de antígeno amibiano secuestrado en el tejido linfoide (Krupp y Powell, 1971).

Aunque el 95% de los pacientes con absceso hepático amibiano producen anticuerpos específicos anti-amiba, el título de estos no correlaciona con el curso clínico de la infección (Krupp, 1970). Se ha demostrado que la inmunoglobulina de

clase G es la que se encuentra en mayor concentración durante la amibiasis invasora (Healy y col., 1974) y que la subclase predominante es IgG2 (Arellano y Ortíz-Ortíz, 1983). La IgM se presenta durante el contacto inicial con la amiba (Capín y col., 1973) y aún se discute la presencia de IgE. La presencia de IgA se ha reportado en amibiasis invasora en áreas endémicas y sus niveles en suero (ELISA) son de significado diagnóstico en el absceso hepático amibiano (Shetty y col., 1990).

La respuesta inmune que se presenta durante la invasión amibiana no parece ayudar al paciente a mejorar, ni confiere resistencia a reinfecciones subsecuentes (Krupp y Powell, 1971; Chacín-Bonilla y Bonpart, 1981). Por el contrario, estudios realizados *in vitro* demuestran que en presencia ó en ausencia del complemento, los anticuerpos anti-amiba tienen una serie de efectos comprometedores para la amiba. Anticuerpos purificados ó suero inmune inactivado por el calor actúan sobre *E. histolytica* inhibiendo el crecimiento. (de la Torre y col., 1973), su capacidad eritrofagocitaria (Shaffer y col., 1956) ó neutralizando su virulencia (Sepúlveda y col., 1974).

Estos efectos dañinos para la amiba pueden ser eliminados al incubar el suero ó la fracción de la inmunoglobulina con trofozoítos totales ó extractos homogenados a 4°C (Ortíz-Ortíz y Avella, 1984). Es interesante observar que tanto el suero

normal como el inmune presentan un efecto citopatogénico que persiste aún después de que el suero ha sido absorbido con trofozoítos a 4°C. Este efecto al parecer involucra ambas vías del complemento: la alterna y la clásica, y no requiere de anticuerpos (Ortíz-Ortiz y col., 1978; Calderón y Schreiber, 1985). Sin embargo, se ha reportado que amibas aisladas de pacientes con absceso hepático amibiano son resistentes a la lisis mediada por complemento (Reed y col., 1983). De acuerdo con lo anterior, un estudio reciente demostró que una lectina de superficie de *E. histolytica*, con afinidad por galactosa y que esta involucrada en la adherencia amibiana a células epiteliales y mucosa colónica humana, inhibe la formación del complejo de ataque del complemento a la membrana (Braga y col., 1992).

La amiba también es capaz de redistribuir en su superficie a los anticuerpos y complemento unidos a ella, en un fenómeno conocido como formación de casquetes polares ("capping"). Estos casquetes pueden ser liberados al medio ó internalizados protegiendo a la amiba del daño que estos componentes puedan causarle (Pinto da Silva y col., 1975; Calderon y col., 1980; Reed y Gigli, 1990). A pesar de estas observaciones, la inmunización experimental de animales de laboratorio con extracto amibiano axénico (Tanimoto-Weki y col., 1973; Ghadirian y Meerovitch, 1978), fracciones purificadas (Ghadirian y col., 1980) e incluso con la lectina de superficie que une galactosa (Petri y Ravdin, 1991), los protege del desafío con *E. histolytica*.

Sin embargo, estos resultados no pueden ser extrapolados a los seres humanos y más aún si se considera que la infección persiste a pesar de los altos títulos de anticuerpos (Krupp y Powell, 1971). Es posible que la IgA secretora y tal vez la IgE demuestren ser factores realmente protectivos en amibiasis invasora aunque sólo temporalmente y por un corto tiempo (Kretschmer, 1984). Se requieren de más estudios para determinar si una vacuna puede proteger a los humanos en contra de este protozoario.

ADHERENCIA AMIBIANA

Un aspecto que ha merecido particular atención en el pasado es el conocer como *E. histolytica* se establece y ejerce su efecto patogénico. En este sentido, se han llevado a cabo trabajos sobre la patogénesis de la amibiasis invasora usando modelos *in vitro* con diversas líneas celulares de tejido, los cuales indican que la amiba ejerce un rápido efecto citoletal dependiente del contacto (Ravdin, 1986) (Fig. 8).

Los estudios realizados indican que *E. histolytica* coloniza inicialmente el intestino grueso del hombre, a través de un proceso activo de adhesión a la mucosa colónica. Este primer paso es esencial para la invasión que la amiba lleva a cabo por medio de enzimas ó productos tóxicos, lisis de las células del epitelio intestinal y penetración del tejido, que le permiten flanquear las barreras intestinales. Este tipo de amibiasis invasora se observa sólo en el 10% de los casos, produciendo colitis ulcerativa y absceso hepático amibiano (Walsh, 1986).

Debido a las implicaciones de la adherencia en los procesos amibianos de destrucción tisular, se le ha estudiado ampliamente en la última década. Sin embargo, aún se desconocen los eventos que conllevan a la destrucción de las células del hospedero después de la adherencia (Bailey y col., 1990).

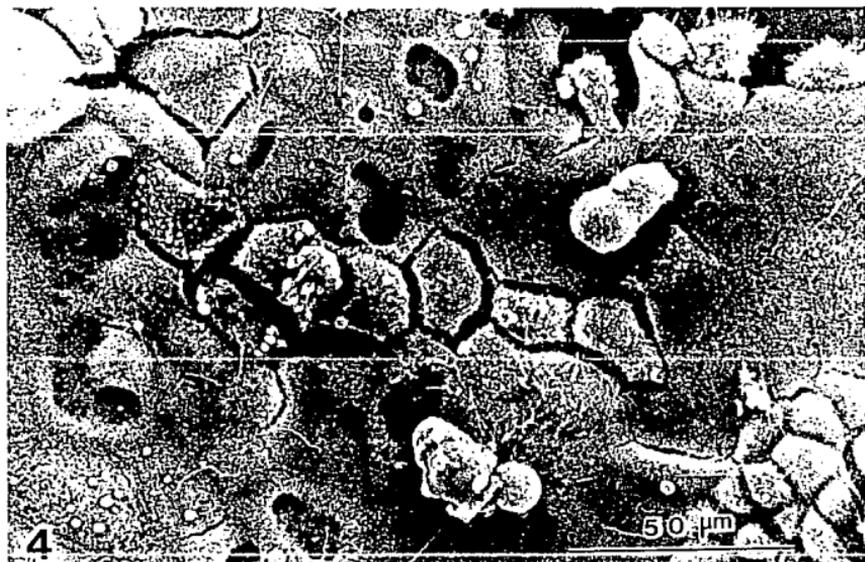


Figura 8. Micrografía electrónica de una monocapa de células MDCK
10 min después de su interacción con trofozoítos de Entamoeba
histolytica. Es evidente una separación en los sitios de contacto
entre las células epiteliales (Kretschmer, 1990).

La adhesión es un proceso activo que combina la habilidad de la amiba para ponerse en contacto físico con la célula blanco y la presencia de moléculas de superficie que estabilizan la interacción entre ellas, en la amiba principalmente lectinas y receptores del tipo carbohidrato en la célula blanco (Ravdin, 1986., Bailey y col., 1990., Saffer y Petri, 1991b., Mann y Petri, 1991a., Ravdin y col., 1989). Por lo menos se han reportado dos lectinas de 260 y 220 KDa, una adhesina de 112 KDa y recientemente una proteína de membrana inmunogénica de 46-52 kDa con múltiples secuencias repetidas una tras otra, que participan en el fenómeno de la adhesión de trofozoítos a diferentes líneas celulares cultivadas *in vitro*. Además, han sido identificadas otras 4 moléculas protéicas que participan en la interacción de la amiba con eritrocitos humanos pero que se desconoce si son adhesinas.

A continuación se discuten algunos aspectos físicos, químicos y principalmente moleculares que participan directamente en el proceso de adhesión de *E. histolytica* a la célula blanco.

Aspectos Físicos y Químicos de la adherencia amibiana

Como se mencionó anteriormente la adhesión es un proceso que en la amiba está muy relacionado con su motilidad. Observaciones al microscopio electrónico de amibas

adheridas a monocapas de células epiteliales del intestino humano (Henle 407) muestran la presencia de invaginaciones endocíticas, pseudópodos, protuberancias vesiculares y filopodios que al parecer ayudan a la amiba a estabilizar la adhesión (Kobiler y Mirelman, 1981).

Los autores arriba citados encontraron que la adhesión es dependiente de la formación de microfilamentos (filopodios), ya que la incubación previa de los trofozoítos con citocalacina B reduce su capacidad de adherirse a una monocapa de células. Asimismo, agentes quelantes como el EDTA también bloquean la adhesión. Por otra parte, colchicina no tiene efecto sobre la adhesión, confirmando la ausencia de tubulina en *E. histolytica* (Kobiler y Mirelman, 1981). Estudios de Ravdin y col. (1982, 1985b) en los que bloquean la adhesión utilizando inhibidores del flujo de calcio intracelular (TMB-8) y bloqueadores de canales de calcio (Bepedril), confirman lo anterior. Probablemente estos agentes impidan la participación del calcio en la función de los microfilamentos.

La adhesión amibiana a monocapas de células fijadas (Henle 407 y MDCK) es dependiente de la temperatura, el tiempo, el pH y la relación amiba:célula (Kobiler y Mirelman, 1981). De esta manera se determinó que la adhesión es óptima a temperaturas entre 35 y 37 °C y disminuye a temperaturas inferiores en que la amiba pierde actividad y tiende a redondearse. La adhesión máxima se alcanza en un tiempo

de 15 min, cuando los trofozoítos se incuban con la monocapa de células en una relación 1:1. En estas condiciones el 80% de los trofozoítos se adhieren a las células.

Aún cuando se ha tendido a optimizar el pH para la adhesión de trofozoítos a una monocapa de células, se observa que cuando se usa un amortiguador de corriente iónica baja ó media (fosfatos 0.2 y 2 mM) es similar entre pH 5.7 y 7.4. Sin embargo, cuando se usa un amortiguador de corriente iónica alta (fosfatos 20 mM), la adhesión es dependiente del pH, ya que se mantiene al mismo nivel a pH 5.7, pero disminuye dramáticamente a pH 7.4. Probablemente esto se debe a la presencia de un micromedio ácido en la superficie amibiana, que es abatido por el amortiguador de corriente iónica alta y que al parecer es necesario para la activación de moléculas de superficie amibiana que participan en la adherencia, principalmente lectinas (Kobiler y Mirelman, 1981).

Lectina con afinidad por N-acetyl-D-galactosamina

Ravdin y Petri han aislado una lectina que es sensible a la inhibición por N-acetyl-D-galactosamina (NacGal) y moléculas con residuos terminales de galactosa

en unión β 1-4, como sialofetina y sialo-orosomucoide. Esta lectina se encuentra en la superficie de los trofozoitos amibianos y se libera al medio de cultivo como lectina soluble (Ravdin y col.,1985c). La lectina aislada por cromatografía de afinidad a carbohidratos y anticuerpos monoclonales específicos anti-lectina es un heterodímero de 260 kDa consistente de una subunidad de 170 kDa y otra de 35 kDa unidas por puentes disulfuro (Saffer y Petri, 1991a; Mann y col.,1991b; Ravdin y col.,1989; Petri y col.,1990b) y con un punto isoeléctrico de pH 6.2 (Petri y col.,1989).

La lectina fué descrita por Ravdin y Guerrant (1981) cuando estudiaban el papel de la adherencia en la citopatogenicidad a células de ovario de hamster chinos (CHO) y eritrocitos humanos (Grupo O). N-acetyl-D-galactosamina y galactosa inhiben la adhesión de trofozoitos cultivados en medio axénico a células CHO, eritrocitos y neutrófilos humanos (Ravdin y Guerrant,1981). De igual forma, concentraciones milimolares de NacGal, galactosa y sialofetina inhiben la adhesión de trofozoitos a la mucosa humana y de rata fijada con glutaraldehído. La mucosa humana y de rata son ricas en NacGal (Podolsky y Isselbacher,1983). Es interesante observar que NacGal no inhibe la adhesión de amibas a mucosa de rata sin fijar (viable), lo que indica la presencia de un receptor sobre la mucosa independiente del receptor para NacGal susceptible a la fijación con glutaraldehído ó tratamiento con tripsina (Ravdin y col.,1985a). De este resultado se desprende la presencia de otra u otras adhesinas.

Las investigaciones realizadas indican que la lectina que se inhibe con NacGal es responsable, al menos en parte, de la adhesión amibiana a cultivos de células de mamífero, eritrocitos y leucocitos humanos, mucosa y submucosa colónica de mamíferos, mucosa colónica humana y bacterias (Ravdin, 1986). NacGal inhibe la citolisis de células blanco por trofozoítos amibianos al impedir su adherencia (Ravdin y Gerrant, 1981). Por otra parte, la caracterización del receptor para la lectina con afinidad por NacGal, mediante el uso de células CHO mutantes en glicosilación, indica que la lectina se puede unir a carbohidratos de superficie en unión N u O, aunque la unión es más estable al N con ramificaciones β 1-6 y que carecen de residuos terminales de fucosa y ácido siálico (Ravdin y col., 1989). Por otra parte, Bailey y col. (1990) usando liposomas con glicoesfingolípidos, encuentran que los trofozoítos reconocen tanto la configuración α como la β , pero preferencialmente a glicanos con puentes glucosídicos terminales β 1-4 ó β 1-3. También observaron que los residuos terminales de fucosa reducen la capacidad de adhesión. Trabajos recientes de Saffer y Petri (1991a) respaldan estos resultados.

Estudios de inmunogenicidad indican que la subunidad de 170 kDa de la lectina es altamente inmunogénica, no así la subunidad de 35 kDa, cuya función aún se desconoce. El 100% de los sueros de pacientes convalescentes de absceso hepático amibiano reconocen por Western blot la banda de 170 kDa (Petri y col., 1987). La inmunización de cerdos por vía intraperitoneal y subcutánea con la lectina purificada

por cromatografía de afinidad induce un alto nivel de anticuerpos que a una dilución 1:10 inhiben la adhesión amibiana en un 100% y los protege del absceso hepático amibiano en un 67% (Petri y Ravdin, 1991). Suero inmune de conejo preparado por la inyección de una fracción semipura de la lectina inhibible por NacGal y suero de pacientes con amibiasis invasora, inhiben la adhesión amibiana a mucosa colónica de rata fijada con glutaraldehído, lo que sugiere un papel importante de los anticuerpos en la inhibición de la adhesión a la mucosa colónica y en la amibiasis recurrente (Ravdin y col., 1985a). Sin embargo, los mismos anticuerpos policlonales antilectina a diluciones de 1:1000, aumentan la adherencia; resultados similares se observan con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano a bajas concentraciones (Petri y Ravdin, 1991), complicando la interpretación de los estudios obtenidos *in vivo*.

Por otra parte, la cepa HM1:IMSS que es la más virulenta, es más sensible a la inhibición de la adherencia por NacGal que las cepas menos virulentas, indicando una mayor actividad de lectina en la primera que en la última (Ravdin y col., 1985c). Estos resultados indican que la subunidad de 170 kDa de la lectina susceptible a inhibición por NacGal es uno de los antígenos amibianos inmunodominantes reconocidos por suero inmune. Es posible que estos anticuerpos, junto con la respuesta celular, sean responsables de la ausencia casi total de amibiasis recurrente.

Anticuerpos monoclonales contra la subunidad de 170 kDa mapearon 6 epítopes

diferentes tanto funcional como antigénicamente. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los epítopes 4, 5 y 6 inhibieron la adhesión en diferentes proporciones, poniendo de manifiesto la participación de estos epítopes en favor del proceso de adherencia amibiana. Anticuerpos monoclonales contra el epítotope 3 no presentaron efecto sobre la adhesión, mientras anticuerpos monoclonales dirigidos a los epítopes 1 y 2 aumentaron la adhesión en lugar de inhibirla (Petri y col., 1990b). Lo anterior correlaciona con el hallazgo ya mencionado de sueros de pacientes y sueros policlonales contra la lectina que a determinadas concentraciones inhiben ó incrementan la adherencia.

Este resultado sirvió de marco a un estudio reciente de diferenciación de cepas patógenas y no patógenas (Petri y col., 1990a), donde se observó que la lectina con afinidad por NacGal de las cepas no patógenas parece carecer de los epítopes 3 al 6, a diferencia de la lectina de las cepas patógenas que presenta todos los epítopes (1 al 6). Las cepas no patógenas que contienen los epítopes 1 y 2 parecen actuar en contra de la adhesión, por lo que dichas cepas no son capaces de adherirse a la mucosa colónica y de causar daño. Con base en lo anterior, ellos proponen un método efectivo y rápido para diferenciar cepas de amibas patógenas de no patógenas usando un radioinmunoensayo con anticuerpos monoclonales contra los epítopes 1 y 3 de la subunidad de 170 kDa . La importancia de la lectina como mecanismo de evasión inmune se ha puesto de manifiesto al demostrarse que inhibe la formación del complejo

de ataque del complemento a la membrana (Braga y col., 1992).

La lectina obtenida en condiciones no reductoras por filtración en Sephacryl S-300 revela un peso molecular de 440-600 kDa, lo que indica que en la forma nativa se encuentra como dímero ó trímero. La determinación de la secuencia de aminoácidos de ambas subunidades (170 y 35 kDa) confirma sus diferencias. La secuencia de aminoácidos en el lado aminoterminal es única para cada subunidad. En la subunidad ligera la secuencia es heterogénea planteando la posibilidad de otro gen (Petri y col., 1989).

La hibridación de RNAm de *E. histolytica* con un oligonucleótido sintético obtenido de la secuencia aminoterminal de la subunidad pesada revela un segmento de 4.4 kilobases (Tannich y col., 1991). La complejidad y el tamaño poco usual de una molécula de este tipo, lo asemeja a otras moléculas de adhesión celular, como el receptor Mo 1 de los linfocitos (Petri y col., 1989).

El grupo de Tannich y el de Petri reportaron casi simultáneamente la secuencia del gen que codifica la subunidad pesada de la lectina. Aún cuando ambos grupos trabajaron con la cepa HM1:IMSS, encuentran diferencias en el tamaño y la secuencia del gen. Tannich y col. (1991) la describen como una proteína de 1270 aminoácidos con 3 dominios y un pequeño tallo citoplasmático de 38 residuos (Fig. 9). El primer

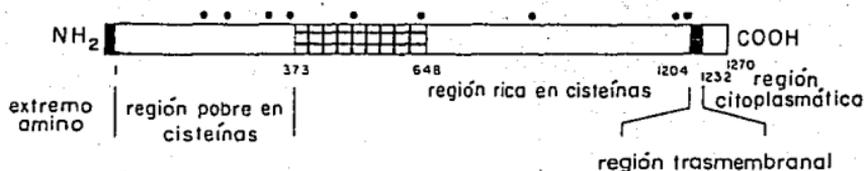


Figura 9. Dominios estructurales de la subunidad de 170 kDa de la lectina de superficie de *Entamoeba histolytica*. La región sombreada representa pseudorepeticiones de 30 aminoácidos. Los puntos indican los sitios potenciales de glicosilación. (Tannich y col., 1991).

dominio se extiende del aminoácido 1 al 373 y es pobre en cisteína. El segundo dominio que comprende el resto de la región extracitoplasmática, va del aminoácido 373 al 1204 y al contrario del anterior es rico en cisteína. Entre los aminoácidos 373 y 648 hay nueve segmentos repetitivos de 30 aminoácidos con cuatro cisteínas cada uno. A lo largo de toda la región extracelular se observan nueve sitios potenciales de glicosilación unidos a asparragina. El tercer dominio de aproximadamente 30 aminoácidos, es una región transmembranal con aminoácidos hidrofóbicos. La presencia en el tallo citoplasmático de 11 aminoácidos con grupos hidroxilo, sugieren que la molécula puede enviar señales al interior de la célula vía fosforilación.

Por su parte, Mann y col. del grupo de Petri (1991b), describen la subunidad pesada como una proteína de 1276 aminoácidos distribuidos en 3 dominios. Un dominio extracelular de 1209 aminoácidos, con 16 sitios potenciales de N-glicosilación; una región hidrofóbica de 26 aminoácidos y un tallo citoplasmático de 41 aminoácidos. Al igual que Tannich, encuentran que el dominio extracelular es rico en cisteína, lo que al parecer le confiere a esta subunidad resistencia a proteasas.

Recientemente, el mismo grupo de Tannich y col. (1992) clonó un cDNA que codifica la subunidad ligera de la lectina. El análisis de la secuencia de aminoácidos indica que la mayoría de los residuos de aminoácidos N-terminales son hidrofóbicos, sugiriendo una función de péptido señal. La secuencia completa indica que se trata de

una proteína de 275 aminoácidos con una masa molecular de 32 kDa, con 2 sitios potenciales de glicosilación unidos a asparragina. El hallazgo de 2 genes estrechamente relacionados, potencialmente codificantes de esta subunidad de 35 kDa, sugiere la presencia de 2 proteínas isomorfas en las cepas de *E. histolytica* patógenas. Los análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos deducida, revela la presencia de una secuencia hidrofóbica en el extremo C terminal, similar a la encontrada en los precursores de proteínas de membrana ancladas por GPI. Lo anterior sugiere que la subunidad de 35 kDa puede estar unida a la membrana por un motivo GPI y participar en la transducción de señales al interior de la célula.

En la actualidad, con el propósito de obtener una vacuna eficaz, se está trabajando en la determinación de los epítopes de la subunidad pesada de la lectina que reconocen las células T Y B y los fragmentos de la proteína que puedan inducir protección (Ravdin y col., 1993).

Inmunoglobulina A secretoria

La inmunoglobulina A presente en mayor cantidad en las secreciones externas, es probablemente la primera defensa específica contra la infección natural (Tomasi y Bienenstock, 1968) y también la segunda inmunoglobulina más importante del suero (Mestecky y col., 1971).

La IgA sérica es esencialmente monómera mientras la forma secretoria es predominantemente dimérica. La IgA como otras inmunoglobulinas, es una glicoproteína compuesta de aproximadamente 90% de aminoácidos y 10% de carbohidratos. Tiene un coeficiente de sedimentación de 7S con un peso molecular que oscila entre 162 y 165 kDa. Estructuralmente es una unidad monomérica con simetría bilateral, que comprende dos pares de cadenas polipeptídicas: dos cadenas H y dos cadenas L, con pesos moleculares de 56-58 kDa y 23 kDa respectivamente (Fig. 10).

La IgA secretoria que comúnmente se presenta como dímero (también se han detectado trímeros, tetrámeros y pentámeros) tiene un coeficiente de sedimentación de 11S (Fig. 11). El conjunto cuenta con dos cadenas polipeptídicas adicionales: la cadena J y el componente secretor (Halpern y Koshland, 1973; Heremans, 1974;

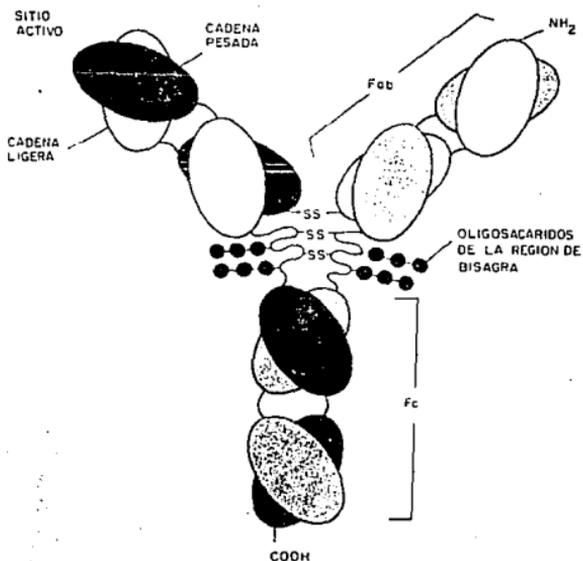


Figura 10. Estructura de la IgA monomérica y su región de bisagra. La molécula representada es la A2m la cual característicamente presenta un enlace disulfuro intercadenas ligeras. (Acosta y Lascurain, 1992)

Lamm, 1976).

La cadena J es una glicoproteína muy hidrofóbica con peso molecular de 15 kDa, que también se encuentra asociada a la IgM pentamérica. El componente secretor es una glicoproteína de 70 kDa sintetizada por las células epiteliales, que actúa como receptor específico para el transporte de la IgA dimérica a través de las células epiteliales hacia fluidos secretorios (Brandtzaeg, 1974) (Fig 12).

La cadena J al parecer desempeña un papel importante en la dimerización de la IgA producida por las células plasmáticas locales (Della Corte y Parkhouse, 1973). Por otra parte, el ensamblaje de la IgA secretoria ocurre en el epitelio de la mucosa, donde se sintetiza el componente secretor (Poger y Lamm, 1974; Brandtzaeg, 1974; Brown y col., 1976). Aunque no hay interacción covalente entre la cadena J y el componente secretor (Mestecky y col., 1974), se cree que la cadena J es importante en la unión de la IgA al componente secretor al inducir una conformación óptima (Brandtzaeg, 1976).

La IgA dimérica forma con el componente secretor una macromolécula que adquiere mayor resistencia a la acción de las proteasas, acorde con el microambiente donde ejerce su acción. Esta inmunoglobulina constituye aproximadamente el 90% de los anticuerpos en secreciones (Fig. 13).

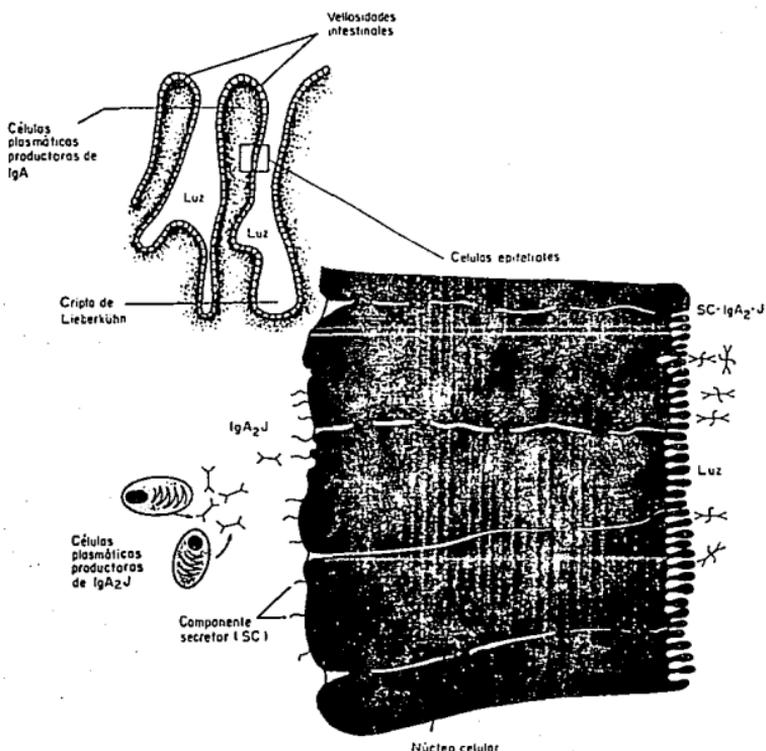


Figura 12. Esquema del trayecto transepitelial de la IgA dimerica. La IgA sintetizada y secretada por células plasmáticas, es captada por el componente secretor e internalizada en vesículas que se dirigen a la luz intestinal donde son liberadas en unión covalente con el componente secretor. (Acosta y Lascu-rain, 1992)

Las inmunoglobulinas en secreciones tienen aparentemente un amplio espectro de actividades contra virus, bacterias, parásitos, antígenos alimentarios y del medio ambiente (Bienenstock y Befus, 1985). Así, la IgA secretoria bloquea la absorción de antígenos llevados por alimentos ó drogas que pueden ser alérgicos potenciales. La IgA es un anticuerpo neutralizante de antígenos biológicamente activos tales como toxinas, enzimas y virus, realzando la eficiencia de los sistemas inmunes efectores (Bienenstock y Befus, 1985).

La afinidad específica de patógenos por el moco y sus componentes se debe principalmente a mucinas e IgA secretoria, que retiene específicamente al organismo dentro de la capa de moco, retardando la invasión y eliminándolo a través de procesos naturales de remoción (Tse y Chadee, 1991).

Varios estudios han demostrado la capacidad de la IgA secretoria de la saliva para agregar, inhibir la adherencia (Liljemark y col., 1979) y conferir inmunidad (Morisaki y col., 1983) contra agentes bacterianos causantes de la placa y de las caries dentales humanas. También se ha observado la capacidad de la IgA secretoria de aglutinar algunos protozoarios (Miller, 1987) y de otorgar inmunidad contra *Trichuris muris* en ratones inmunizados pasivamente con anticuerpos monoclonales del tipo IgA anti-*T. muris* (Roach y col., 1991).

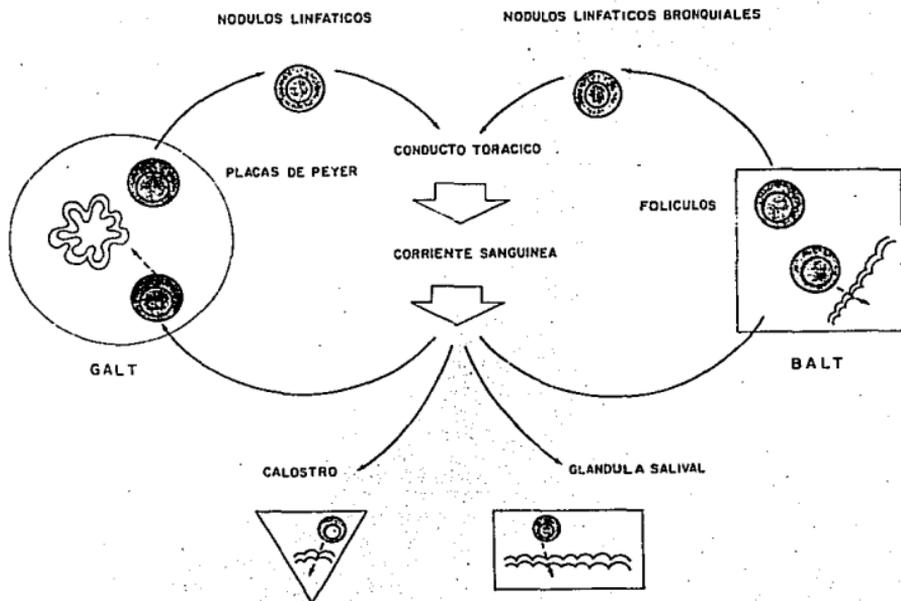


Figura 13. Retorno de las células inmunocompetentes a varias mucosas. Las células precursoras del tejido linfóide asociado al intestino (GALT) y asociado a bronquios (BALT), migran al torrente sanguíneo a través de placas de Peyer y nódulos linfáticos, llegando al conducto torácico para ser recirculadas nuevamente a diferentes mucosas (glandula salival y mamaria) y constituir lo que se conoce como sistema común de las mucosas. (Rocha Ramirez y col., 1992)

Estudios sobre la respuesta inmune secretora local en la amibiasis y su papel como mecanismo protector son escasos. La presencia de antígeno amibiano en la mucosa intestinal de personas infectadas induce una respuesta inmune local con producción de IgA secretoria específica contra *E. histolytica*. Se ha demostrado su presencia en la bilis de ratas inmunizadas con trofozoítos de *E. histolytica* (Acosta y col., 1982), y en secreciones intestinales y suero de pacientes con absceso hepático amibiano (O'Shea-Alvarez y Treviño, 1985; O'Shea-Alvarez y col., 1987; Grundy y col., 1983; Berber y col., 1990).

Así mismo, se ha detectado la presencia de anticuerpos IgA secretorios anti-amiba en el calostro humano (Acosta-Altamirano y col., 1986; Berber y col., 1990), en leche humana (Grundy y col., 1983) y más recientemente en la saliva de pacientes con amibiasis intestinal (Rubén del Muro y col., 1990). Se ha observado que los niños alimentados con leche materna están protegidos contra varios agentes patógenos incluyendo a *E. histolytica* (Gerrard, 1974; Mata y Urrutia, 1971; Islam y col., 1988).

Los anticuerpos IgA secretorios anti-amiba, tanto de humanos como de rata, impiden la interacción de trofozoítos con eritrocitos humanos (Barranco-Tovar y col., 1986). Al parecer el calostro humano y la IgA secretoria no específica, también impiden, en una menor proporción, la unión a eritrocitos humanos.

Ya que el paso esencial en la patogenicidad de la mayoría de organismos invasores es la adherencia a superficies epiteliales, es posible que complejos de antígeno con moléculas de IgA secretoria inhiban la motilidad e invasión del agente patógeno (Tse y Chadee, 1991). Es probable que la IgA secretoria anti- *E. histolytica* presente en la luz intestinal desempeñe un papel muy importante contra la amebiasis invasora al interferir con la adherencia de la ameba a las células epiteliales.

Planteamiento del problema

Mucho se ha hablado acerca del posible papel de la respuesta inmune secretora en los mecanismos de defensa local contra agentes patógenos que penetran por la cavidad oronasal. Así mismo, se ha descrito su participación en la regulación de la flora bacteriana intestinal. Sin embargo, son escasos los trabajos que demuestran la presencia de anticuerpos secretorios específicos y su acción sobre los principales mecanismos asociados al potencial patogénico de un agente.

En el caso de la amibiasis como en otras parasitosis intestinales, se ha demostrado el desarrollo de una respuesta inmune secretora con producción de anticuerpos de clase IgA secretores específicos anti-*E. histolytica*. Estos anticuerpos IgA específicos anti-amiba se han detectado en suero, calostro, leche y recientemente en saliva (Grundy y col., 1983; Islam y col., 1988; Acosta y col., 1985; Del Muro y col., 1990). Sin embargo, se desconoce el papel de estos anticuerpos en la amibiasis y particularmente el mecanismo ó los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos IgA secretorios podrían estar actuando sobre *E. histolytica*.

Los anticuerpos secretados tienen un amplio espectro de actividades en infecciones virales, bacterianas y parasitarias (Bienenstock y Befus, 1985). Estos anticuerpos son

neutralizantes, agutinan bacterias e impiden la adherencia a células epiteliales *in vitro* (Liljemark y col., 1979). La mayoría de los agentes infecciosos inician la secuencia patológica con la adherencia a las células blanco. El efecto citotetal ejercido por *E. histolytica* es dependiente del contacto y mediado por moléculas de superficie del tipo lectinas (Ravdin, 1986). De ellas, se demostró que la lectina que se une a galactosa es la principal molécula responsable de la adherencia de *E. histolytica* a células epiteliales y mucosa colónica de rata y humana (Ravdin y Guerrant, 1981; Ravdin y col., 1985a).

En base a lo anterior, en el presente trabajo se decidió analizar el papel de los anticuerpos IgA secretores anti-amiba y en particular anti-lectina que se une a galactosa en la adherencia de trofozoítos de *E. histolytica* a células epiteliales *in vitro*. Con ese fin, se utilizaron muestras de saliva de pacientes con amibiasis intestinal y los anticuerpos IgA purificados a partir de ellas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar *in vitro* el papel de la respuesta inmune secretora como posible mecanismo protector en amibiasis intestinal.

Objetivos específicos

- Identificar antígenos amibianos reconocidos por anticuerpos de la clase IgA secretorios de salivas de pacientes con amibiasis intestinal.
- Purificar la lectina de superficie de *Entamoeba histolytica* que se une a galactosa.
- Determinar el nivel de anticuerpos IgA secretores específicos contra la lectina que se une a galactosa.
- Analizar la capacidad de los anticuerpos IgA secretores anti-*E. histolytica* presentes en las muestras de saliva de los pacientes, de inhibir la adherencia amibiana a monocapas de células epiteliales MDCK.

PUBLICACION

Carrero, J. C., Díaz, M. Y., Viveros, M., Espinoza, B., Acosta, E., y L. Ortíz-Ortíz. Anticuerpos de la clase IgA secretorios humanos anti-Entamoeba histolytica inhiben la adherencia de la amiba a células MDCK. Infect. Immun., 62:764-767.

Human Secretory Immunoglobulin A Anti-*Entamoeba histolytica* Antibodies Inhibit Adherence of Amebae to MDCK Cells

JULIO CÉSAR CARRERO, MARTHA YADIRA DÍAZ, MÓNICA VIVEROS, BERTHA ESPINOZA, ENRIQUE ACOSTA, AND LIBRADO ORTIZ-ORTIZ*

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 0-4510 México, D.F., México

Received 20 August 1993/Returned for modification 15 October 1993/Accepted 26 November 1993

The presence of secretory immunoglobulin A (IgA) anti-*Entamoeba histolytica* antibodies in the saliva of patients with intestinal amebiasis was demonstrated by immunoblot assay, and the capacity of these antibodies to inhibit amebic adherence to a monolayer of MDCK cells was analyzed. Inhibition was due to IgA antiamebic antibodies and in part to anti-Gal-binding-lectin antibodies, as demonstrated by absorption experiments with total amebic extract and with the fraction of Gal-binding lectin. These results emphasize the relevance of secretory IgA antibodies in the phenomenon of *E. histolytica* adherence to epithelial cells.

Amebiasis due to *Entamoeba histolytica* is an infectious disease of worldwide distribution which affects 500 million people and is responsible for approximately 50 million cases of tissue invasion and approximately 60,000 deaths per year (22). In many developing countries, amebiasis is one of the main medical problems, affecting all socioeconomic levels of the population (6).

Tissue damage by *E. histolytica* is contact dependent, resulting in lysis of the cells to which amebae adhere (3, 18). The molecules which mediate adhesion are lectins located on the amebic surface (17), of which several have been described previously (1, 15, 19). Among them, an amebic lectin with affinity for galactose (Gal) has been proposed as the main molecule responsible for the adhesion of trophozoites to colonic mucin and epithelial cells (3, 13).

The role of secretory immunoglobulin A (IgA) antibodies against surface molecules of *E. histolytica*, including the Gal-binding lectin that participates in adherence, has not been studied in depth. It is believed that the secretory immune response against amebic surface molecules plays an important role when it comes to parasite colonization of the intestine, since one of the protective mechanisms mediated by IgA is the inhibition of microorganism adherence to and colonization of this tissue (9, 10). It was therefore interesting to determine whether anti-*E. histolytica* IgA antibodies and specifically those to the Gal-binding lectin are present in the saliva of patients with amebiasis and to determine whether these antibodies are able to inhibit adherence of amebae to MDCK cells *in vitro*.

Axenic cultures of *E. histolytica*, HM1:IMSS strain, were grown in TYI-S-33 medium with 100 U of penicillin per ml—100 µg of streptomycin sulfate per ml—0.25 µg of amphotericin B per ml at 37°C in culture flasks (5). Trophozoites were harvested after 72 h of growth by chilling the flasks on ice for 10 min and centrifuging at 150 × g for 10 min at 4°C. The parasites were then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, by centrifugation as described above. The viability of parasites was assayed by exclusion of trypan blue, and it was about 91%.

MDCK cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO Laboratories, Life Technologies, Grand Island, N.Y.) at pH 6.8, supplemented with 5% fetal bovine

serum—100 U of penicillin per ml—100 µg of streptomycin per ml—2.4% sodium bicarbonate, in culture flasks at 37°C and in a humid atmosphere with 5% CO₂. Monolayers of MDCK cells were obtained in 96-well culture plates (50,000 cells per well). The monolayer was washed with 0.15 M NaCl and fixed with 0.25% glutaraldehyde for 10 min. Then, the plates were washed with a solution of 0.1 M glycine and finally with 0.15 M NaCl and stored at 4°C until used (8).

Optimal conditions for adherence of amebae to an MDCK cell monolayer were obtained with 50,000 amebae per micro-well, in 2 mM PBS, pH 5.7, by coinoculating them for 15 min at 37°C with gentle shaking (75 rpm). These conditions were applied to all experiments reported herein. The trophozoites adhering to the cells were then fixed with 0.25% glutaraldehyde in 0.15 M NaCl for 10 min at room temperature. The next step was to block the plates with 200 µl of 1% bovine serum albumin for 1 h at room temperature. The plates were washed with 0.05% Tween 20—1% BSA in PBS, pH 7.4 (T-BSA-PBS). Subsequently, 50 µl of biotinylated monoclonal anti-*E. histolytica* antibody to a surface molecule of *E. histolytica* (11) diluted 1:400 was added and the plate was incubated for 1 h at 37°C. The plates were then washed as described above. A streptavidin-peroxidase conjugate (1:2,000) was added and incubated for 1 h at 37°C. Then, the plates were washed again as described above. Finally, *o*-phenylenediamine was used as a substrate; the reaction was stopped with 2.5 N H₂SO₄ and measured at 490 nm in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)—Processor M. A positive correlation was found between the number of amebae binding to the MDCK cells and optical density at 490 nm.

Saliva was collected from 24 patients with a diagnosis of intestinal amebiasis confirmed by stool examination and by salivary IgA anti-*E. histolytica* antibody detection (4). These saliva samples were kindly provided by Edmundo Godínez Camacho from the Hospital General de México. Control samples were obtained from 16 healthy individuals with no clinical symptoms of amebiasis and from 9 patients with nonamebic parasitic diseases. For both control groups, stool examination (three samples, obtained on three consecutive days) and salivary anti-*E. histolytica* antibody assay were performed; they were negative, indicating the absence of amebae or their antibody, respectively. However, the control group of patients with other parasitic diseases yielded at least one of the following parasites: *Hymenolepis nana*, *Entamoeba coli*, *Giar-*

* Corresponding author.

dia lambia, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Chilomastix mesnili*, and *Ascaris lumbricoides*. The saliva samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min, and the supernatant was frozen at -20°C until used.

Amebae (50,000 parasites) were preincubated with 1 ml of saliva from patients or controls previously diluted 1:1 with a mucolytic agent (Mucosil-20; Dey Laboratories Inc., Napa, Calif.) for 1 h at 37°C . These immunoglobulin-treated trophozoites were washed and used in the adherence ELISA described above. For all saliva samples, a control of possible interference due to competition between the monoclonal antibody and IgA from the saliva was run in parallel in the following way: after amebae were fixed, 200 μl of saliva was added and incubated for 1 h at 37°C ; afterwards, the plates were washed; and finally, the biotinylated monoclonal anti-*E. histolytica* antibody was added. The reading was subtracted from the ELISA results.

IgA from the saliva samples was purified by affinity chromatography on a jacalin-agarose column (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) (2). Fractions of 1 ml were collected, and the protein content was determined at 280 nm in a spectrophotometer. The purified IgA was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing conditions (sodium dodecyl sulfate [SDS]-PAGE). The characteristic three bands of the secretory IgA were observed: 70, 56, and 23 kDa (12). One hundred fifty micrograms of purified IgA was used in the inhibition assay described above; this amount was the average value of purified IgA from 1 ml of patient's saliva.

Saliva samples were preabsorbed with 150 μg of the Gal-binding lectin or with 150 μg of a total amebic extract for 2 h at 37°C . This amount of antigen was previously known to abolish the reactivity of the saliva IgA with either the total amebic extract or Gal-binding lectin by immunoblot. Then, the saliva samples were used in the adherence ELISA.

The purification of the Gal-binding lectin was performed as reported previously (15). In brief, 5 ml of immobilized D-Gal (Pierce, Rockford, Ill.) was incubated with 20 ml of a 10-times-concentrated supernatant culture medium from amebae (previously dialyzed against 10 mM HEPES [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid]-0.14 M NaCl [pH 7.5] for 18 h at 4°C) with gentle agitation. Then the column was washed with HEPES-NaCl. The bound proteins were eluted with 0.8 M Gal, and protein was detected at 280 nm. Positive fractions were analyzed by SDS-PAGE. A Western blot (immunoblot) of the Gal-binding lectin with either a polyclonal anti-*E. histolytica* antiserum (11) or the 3F4 monoclonal anti-Gal-binding-lectin antibody (kindly provided by W. A. Petri, School of Medicine, University of Virginia, Charlottesville) was also performed.

Trophozoites (3×10^6) were metabolically labeled with 600 μCi of [^{35}S]methionine (specific activity, 1,200 Ci/mmol) in TYI-S-33 medium without cysteine for 12 h at 37°C . Then, the parasites were harvested by being chilled on ice for 10 min and centrifuged at $150 \times g$ for 5 min at 4°C , washed with PBS containing 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM p -hydroxymercuribenzoate, and finally lysed by freezing and thawing. The labeled supernatant and the parasites were applied to the immobilized D-Gal column.

Both the total *E. histolytica* extract (800 μg) and the Gal-binding lectin (100 μg) were electrophoresed on SDS-10% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose paper as described by Towbin et al. (20). Saliva samples from patients and controls were diluted (1:8) in 0.3% Tween-PBS and incubated with the paper strips for 2 h at room temperature. After extensive washing with T-PBS, a goat anti-human IgA antibody conjugated to peroxidase (1:2,000) (Zymed Lab-

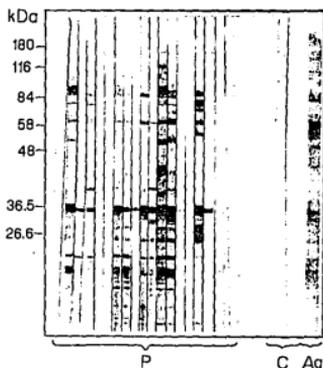


FIG. 1. Immunoblot of amebic antigens recognized by secretory IgA antibodies in saliva (1:8 dilution) of patients with intestinal amebiasis. P, patients with intestinal amebiasis; C, healthy controls; Ag, control of total amebic antigen stained with Coomassie blue.

oratories, Inc., San Francisco, Calif.) was added. Finally 3',3'-diaminobenzidine was used as a substrate.

The results indicate that 85% of the saliva samples from patients recognized various amebic antigens when a total amebic extract was used. Thus, IgA antibodies from patient saliva recognized proteins of 36 kDa (84%), 23 kDa (79%), 59 kDa (68%), 87 kDa (58%), and 26 kDa (50%) (Fig. 1). In addition, 42% of the same samples presented specific IgA antibodies against a protein of 170 kDa. On the other hand, saliva from normal individuals was generally negative and only occasionally showed some 21-, 23-, and 109-kDa bands.

An attempt to purify the lectin of 260 kDa from the supernatant culture medium with affinity to Gal was done by affinity chromatography in an immobilized D-Gal column. A single protein peak was obtained. SDS-PAGE under nonreducing conditions of the pooled peak showed only a band of 260 kDa (Fig. 2, lane B). On the other hand, SDS-PAGE performed under reducing conditions showed four bands of 170, 100, 68, and 30 kDa (Fig. 2, lane C). The bands of 170 and 30 kDa seem to correspond to the molecular mass previously reported for the Gal-binding lectin. Similar results were obtained when the parasites were metabolically labeled with [^{35}S]methionine (Fig. 2, lane D). When this fraction was tested by immunoblot with a hyperimmune anti-*E. histolytica* antiserum, the same four bands were recognized (Fig. 2, lane E). Furthermore, three (170, 68, and 30 kDa) of the four above-mentioned bands were recognized when tested with the 3F4 monoclonal anti-Gal-binding-lectin antibody, which recognizes the 170-kDa subunit epitope 1 of the Gal-binding lectin (14, 16) (Fig. 2, lane F). When this fraction was used as antigen in an immunoblot assay with the saliva described above, 61% of the samples showed a positive reaction with the protein of 170 kDa (Fig. 3). The bands of 68 and 30 kDa were also recognized by 52 and 43% of the saliva samples, respectively. However, the 100-kDa band was not recognized by any of the patient saliva samples. In contrast, saliva from the healthy groups did not show reactivity with the Gal-binding lectin (Fig. 3).

nitrocellulose paper, the proteins of 170, 68, and 30 kDa were recognized by the 3F4 monoclonal anti-Gal-binding-lectin antibody, suggesting that the lectin was being degraded. One possibility for the proteolytic breakdown observed is that we used a mild protease inhibitor cocktail not containing diisopropyl fluorophosphate, a potent serine protease inhibitor. It was of interest to investigate whether these saliva antibodies inhibit the adhesion of amebae to epithelial cells. For this purpose, we developed an ELISA with MDCK cells and a monoclonal antibody produced against a surface protein of *E. histolytica* (11). The assay showed a direct correlation between the number of adherent amebae and the absorbance reading of the substrate.

Saliva or IgA purified from patients with intestinal amebiasis inhibited adherence of *E. histolytica* to MDCK cells to the same extent (Fig. 4), indicating a direct role of the secretory IgA anti-*E. histolytica* immunoglobulins in the inhibition of adherence phenomenon. The IgA specific to the Gal-binding lectin from *E. histolytica* very likely prevents the attachment of the parasite to the target cell, retaining the microorganisms within the mucus layer and reducing their motility; in addition, they became susceptible to the natural renewal process of the mucus layer (21). Interestingly, saliva obtained from individuals infected with other parasites, including *Entamoeba coli* and *E. lamblia*, did not inhibit amebic adherence to MDCK cells.

The absorption experiments showed that the IgA antibodies to the lectin of 260 kDa with affinity for Gal were in part responsible for the inhibition observed. On the other hand, absorption experiments with the total amebic extract showed that the saliva thus absorbed lost the capacity to inhibit amebic adherence. These results are in agreement with the notion that there must be a group of lectins and adhesins participating in the adhesion of *E. histolytica* to epithelial cells. Several of these lectins have been reported elsewhere (1, 7, 19), but information about their role in the *in vivo* phenomenon of adherence is limited. It would be of interest to study the secretory response against the other lectins with the adherence ELISA described here.

This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México, grant IN-205989.

We thank Edmundo Godínez Camacho for providing saliva samples and William Petri, Jr., for the generous gift of the 3F4 monoclonal antibody. We also thank Enrique Ortega and Edmundo Lamoyi for critical review of the manuscript, Isabel Pérez-Montfort for editing of the manuscript, and Esperanza Ruiz-García for its final preparation.

REFERENCES

- Arroyo, R., and E. Orozco. 1987. Localization and identification of an *E. histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23:151-158.
- Barreira, M. A., and A. Campos-Neto. 1985. Jacalin: an IgA-binding lectin. *J. Immunol.* 134:1740-1743.
- Chadee, K., W. A. Petri, J. D. Innes, and J. I. Ravdin. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80:1245-1254.
- Del Muro, R., E. Acosta, E. Merino, W. Glender, and L. Ortiz-Ortiz. 1989. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *J. Infect. Dis.* 162:1360-1364.
- Diamond, L. S., D. R. Harlow, and C. C. Cumick. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *E. histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:431-432.
- Gutiérrez, G., A. Ludlow, G. Espinoza, S. Herrera, O. Muñoz, N. Rattóni, and B. Sepúlveda. 1976. National serologic survey. Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico, p. 609-618. In B. Sepúlveda and L. S. Diamond (ed.), *Proceedings of the International Conference on Amebiasis*. Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City.
- Kohler, D., and D. Mirelman. 1980. Lectin activity in *E. histolytica* trophozoites to human erythrocytes. *Infect. Immun.* 27:281-285.
- Kohler, D., and D. Mirelman. 1981. Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to monolayers of human cells. *J. Infect. Dis.* 144:539-546.
- Leyva, G. R., P. R. Ramos, E. I. Melendro, and C. Ximénez. 1992. Inhibition of adhesion process mediated by anti-*E. histolytica* specific monoclonal IgA antibodies. *Arch. Med. Res.* 23:227-229.
- Liljemark, W. F., C. G. Bloomquist, and J. C. Ofstehage. 1979. Aggregation and adherence of *Streptococcus sanguis*: role of human salivary immunoglobulin A. *Infect. Immun.* 26:1104-1110.
- Ortiz-Ortiz, L., C. Ximénez, F. Mendoza, C. Michelak, E. I. Melendro, and A. Oliva. 1986. *Entamoeba histolytica*: specific antigen recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 61:390-397.
- Pardo, A. G., M. E. Lamm, A. G. Plaut, and B. Frangione. 1981. J chain is covalently bound to both monomer subunit in human secretory IgA. *J. Biol. Chem.* 256:11734-11738.
- Petri, W. A., Jr., M. D. Chapman, T. Snodgrass, B. J. Mann, J. Brnman, and J. I. Ravdin. 1989. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *E. histolytica*. *J. Biol. Chem.* 264:3007-3012.
- Petri, W. A., Jr., T. F. H. G. Jackson, V. Gathiram, K. Kress, L. D. Saffer, T. L. Snodgrass, M. D. Chapman, Z. Keren, and D. Mirelman. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect. Immun.* 58:1802-1806.
- Petri, W. A., Jr., R. D. Smith, P. H. Schlesinger, C. F. Murphy, and J. I. Ravdin. 1987. Isolation of the galactose binding lectin that mediates the *in vitro* adherence of *E. histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80:1238-1244.
- Petri, W. A., Jr., T. L. Snodgrass, T. F. Jackson, V. Gathiram, A. E. Simjee, K. Chadee, and M. D. Chapman. 1990. Monoclonal antibodies directed against the galactose binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *J. Immunol.* 144:4803-4809.
- Ravdin, J. I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytotoxicity. *Rev. Infect. Dis.* 8:247-260.
- Ravdin, J. I., and R. L. Guerrant. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 68:1305-1313.
- Rosales, J. L., I. Meza, A. L. De-León, P. Talamas, and M. Rojkind. 1987. Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *E. histolytica*. *J. Infect. Dis.* 156:790-797.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Tse, S. K., and K. Chadee. 1991. The interaction between intestinal mucus glycoproteins and enteric infections. *Parasitol. Today* 7:163-172.
- Walsh, J. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8:228-238.

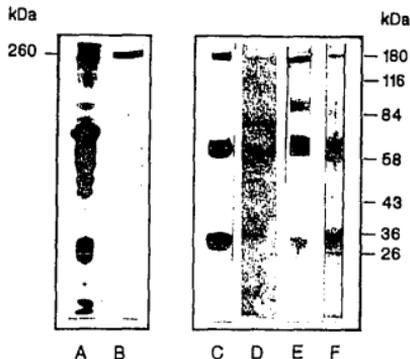


FIG. 2. Purification of lectin by affinity chromatography in an immobilized α -Gal column. The proteins were eluted, pooled, and analyzed by SDS-PAGE. Lanes: A, SDS-PAGE pattern of supernatant applied to column; B, purified fraction analyzed by SDS-7.5% PAGE under nonreducing conditions and stained with Coomassie blue; C, purified fraction analyzed by SDS-10% PAGE under reducing conditions and stained with Coomassie blue; D, purified fraction obtained from parasite metabolically labeled with [35 S]methionine; E, purified fraction analyzed by immunoblot with a hyperimmune anti-*E. histolytica* antiserum; F, immunoblot assay with 3F4 monoclonal anti-Gal-binding-lectin antibody.

Considering that the phenomenon of adherence may be mediated by adhesins or lectins and particularly by those with affinity for galactose, we decided to test whether IgA antibodies to amebic proteins and particularly to the Gal-binding lectin could block the adherence of trophozoites to MDCK cells. For this purpose, 24 saliva samples of patients with intestinal amebiasis were tested for inhibition of amebic adherence to a monolayer of MDCK cells. Amebic adhesion was monitored by the ELISA described above. Eighty-five percent of the saliva samples from patients with amebiasis significantly ($P < 0.01$) inhibited the adherence of trophozoites to MDCK cells by more than 20% (mean \pm standard error [SE] = 35%

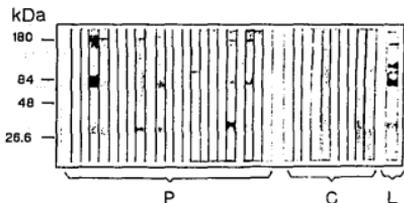


FIG. 3. Immunoblot of purified Gal-binding lectin recognized by secretory IgA antibodies in saliva (1:8) of patients with intestinal amebiasis. P, patients with intestinal amebiasis; C, healthy controls; L, Gal-binding lectin obtained from the immobilized α -Gal column.

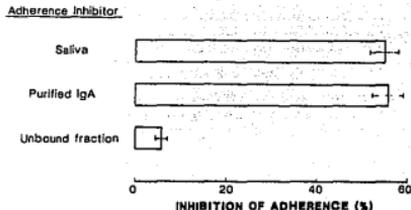


FIG. 4. Inhibition of adherence by patient's saliva and by its purified IgA antibodies. Amebic trophozoites (50,000) were incubated with 150 μ g of pure IgA obtained from 1 ml of patient's saliva or with 1 ml of total saliva for 1 h at 37°C and added to an MDCK cell monolayer. The immunoenzymatic assay was monitored as previously described. Both total saliva and pure IgA showed the same inhibitory levels. On the other hand, the unbound fraction obtained during the IgA purification showed a very low inhibitory capacity. Shown are the means \pm SEs of four saliva samples.

\pm 2.6%). Saliva samples from patients with other parasitic diseases (13.5% \pm 2.5%) and from healthy people (9% \pm 1.4%) inhibited adhesion more weakly. The adhesion values of the last two groups are significantly ($P < 0.01$) lower than those for saliva from patients with amebiasis.

IgA anti-*E. histolytica* antibodies were purified from four saliva samples by means of minicolumns of jaculin-agarose and examined by SDS-PAGE. Three bands corresponding to the subunits of IgA were observed (data not shown). The pure IgA antibodies were used in the same assay of inhibition of amebic adhesion to MDCK cells as previously described. The results showed that total saliva (1 ml) from amebic patients as well as the IgA purified from them at similar IgA concentrations (150 μ g of IgA purified from 1 ml of saliva) inhibited amebic adherence to the same extent (Fig. 4), suggesting that the inhibitory capacity of patient saliva is due to the presence of antiamebic IgA. On the other hand, the material not bound to the same column did not inhibit the amebic adherence to MDCK cells.

An experiment on adsorption was conducted to determine whether the inhibition of adherence by antibodies was specific to *E. histolytica* as well as to the Gal-binding lectin. For this purpose, the saliva of five patients was absorbed with total *E. histolytica* extract or with the Gal-binding lectin from the *E. histolytica* trophozoites and then used in the adherence assay. The results showed that the adherence inhibition was reduced by 80% when the saliva samples were previously absorbed with total amebic extract (inhibition mean \pm SE = 11.2% \pm 3.6%) compared with inhibition with nonabsorbed saliva samples (inhibition mean \pm SE = 56.1% \pm 2.9%). On the other hand, adherence inhibition was reduced by only 32.7% (inhibition mean \pm SE = 37.8% \pm 2.7%) when the Gal-binding lectin was used.

The data presented here indicate that saliva from patients with intestinal amebiasis presents secretory antibodies directed against several proteins from an extract of *E. histolytica* and also against the Gal-binding lectin. The Gal-binding lectin obtained in our laboratory when analyzed by SDS-PAGE under nonreducing conditions showed one band of 260 kDa. However, three main bands, 170, 68, and 30 kDa, and a faint band of 100 kDa were observed when analyzed under reducing conditions. When this Gal-binding lectin was transferred to

OTROS RESULTADOS Y COMENTARIOS FINALES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo avalan un papel protector para la respuesta inmune secretora en la amibiasis intestinal, a través de la inhibición de la adherencia a las células epiteliales del intestino. Es probable que la respuesta secretora detectable en pacientes infectados con *E. histolytica* sea responsable, al menos en parte, de la ausencia de amibiasis invasiva en el 90% de la población infectada a nivel mundial o que esa población está infectada por una cepa no patógena.

Se han propuesto una serie de eventos que participan en la patogénesis de la amibiasis invasiva. La secuencia se inicia con la colonización del tracto intestinal gracias a la adherencia de los trofozoítos a la mucina colónica y las células epiteliales, que depende de moléculas de superficie celular, seguido de penetración y destrucción de esas células (Kobiler y Mirelman, 1980; Ravdin y col., 1985a; Ravdin, 1986). Entre estas moléculas, la lectina de superficie amibiana que se une a galactosa parece ser importante para que la amiba colonice el intestino e invada los tejidos (Chadee y col., 1987).

La IgA secretora, particularmente la específica de *E. histolytica*, puede desempeñar

un papel importante en este esquema, ya que la IgA es la inmunoglobulina predominante a lo largo del colon y es parte integral de la defensa del hospedero (Killian y col., 1988). Las inmunoglobulinas de las secreciones tienen un amplio espectro de actividades contra bacterias, virus, parásitos, antígenos de la dieta, y productos del medio ambiente (Michalek y col., 1983). La aglutinación de bacterias y otros antígenos extraños impide su adherencia a células epiteliales. Esto puede deberse al recubrimiento de los microorganismos con IgA, la cual evita la adhesión por impedimento estérico. La IgA unida también puede retener al microorganismo en la capa de moco evitando de esta manera su movimiento de penetración a las capas más profundas (Tse y Chadee, 1991).

La producción de anticuerpos IgA específicos contra trofozoítos de *E. histolytica* ha sido demostrada en las secreciones de animales inmunizados (Acosta y col., 1983), leche y suero de mujeres lactantes (Grundy y col., 1983; Islam y col., 1988), en muestras de calostro (Acosta y col., 1985), y más recientemente en muestras de saliva de pacientes con amebiasis (Del Muro y col., 1990). Sin embargo, no se ha aclarado el papel de estos anticuerpos en la protección. Un reporte reciente describe la propiedad de un anticuerpo monoclonal IgA anti-*E. histolytica* de inhibir la adherencia de este protozooario a líneas celulares MDCK y HT-29, aunque no se demostró la especificidad de este anticuerpo monoclonal (Leyva y col., 1992).

En este trabajo se demuestra la presencia de anticuerpos IgA específicos anti-*E. histolytica* en la saliva de pacientes con amibiasis intestinal, capaces de inhibir la adhesión de la amiba a una monocapa de células MDCK. El análisis por inmunoelectrotransferencia mostró que esas muestras de saliva contienen IgA que reconoce varias proteínas de un extracto total de *E. histolytica*. Los componentes reconocidos con mayor frecuencia por los anticuerpos de las muestras de saliva fueron de 23, 26, 36, 59, 87, y 170 kDa (Fig. 1 del artículo). La banda de 170 kDa podría corresponder a la subunidad pesada de la lectina que se une a galactosa (Petri y col., 1987; Petri y col., 1989). Se ha propuesto que esta lectina desempeña un papel primordial en la adhesión de *E. histolytica* a la mucina colónica y a las células epiteliales (Ravdin y col., 1985a; Chadee y col., 1987) y que protege específicamente a gerbos inmunizados contra el desafío intrahepático con *E. histolytica* (Petri y Ravdin, 1991).

La lectina purificada se obtuvo por cromatografía de afinidad en una columna de galactosa-agarosa a partir de sobrenadantes de cultivo amibiano (Fig. 2 del artículo). Cuando la lectina se analizó por inmunoelectrotransferencia con las salivas de los pacientes, la IgA reconoció predominantemente (62%) a la banda de 170 kDa (Fig. 3 del artículo).

Una vez determinada la presencia de anticuerpos IgA anti-amiba en la saliva de

pacientes con amibiasis intestinal, se procedió a determinar el efecto de los mismos sobre la adherencia amibiana. La capacidad de inhibición de la adherencia se ensayó por un método inmunoenzimático desarrollado en el laboratorio (Díaz, Tesis 1992) (Fig. 14). El ensayo se calibró con números variables de trofozoítos (5,000 a 50,000) adicionados a pozos de placas de ELISA que contenían las monocapas de células MDCK, encontrándose una correlación lineal con las densidades ópticas obtenidas (Fig. 15). Un número de trofozoítos superior a 50,000 satura el sistema y se obtiene una meseta.

En otros estudios se ha demostrado la capacidad de ciertos azúcares de inhibir la adherencia amibiana a diferentes tipos celulares (Mirelman y Ravdin, 1986; Cano-Mancera y López-Revilla, 1987; Ravdin y Guerrant, 1981; Ravdin y col., 1985a). Aunque la mayoría de los azúcares probados son capaces de inhibir la adherencia, algunos suelen hacerlo con más eficiencia que otros; los monómeros de N-acetilgalactosamina han demostrado ser los más eficaces en esta inhibición (Ravdin y Guerrant, 1981; Li y col., 1988).

En este trabajo también se determinó la capacidad de diversos azúcares de inhibir la adherencia amibiana a células MDCK, en un esfuerzo por evaluar el ensayo inmunoenzimático aquí descrito. Los azúcares N-acetil-D-galactosamina, lactosa, glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, glucosa y galactosa se probaron a

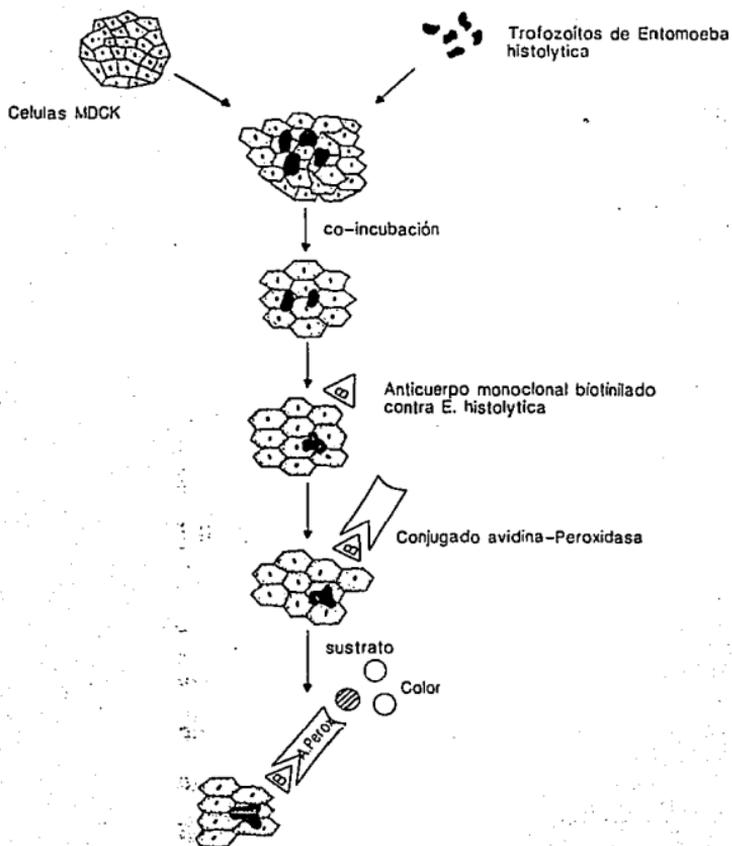


Figura 14. Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de adherencia amibiana a monocapas de células epiteliales MDCK.

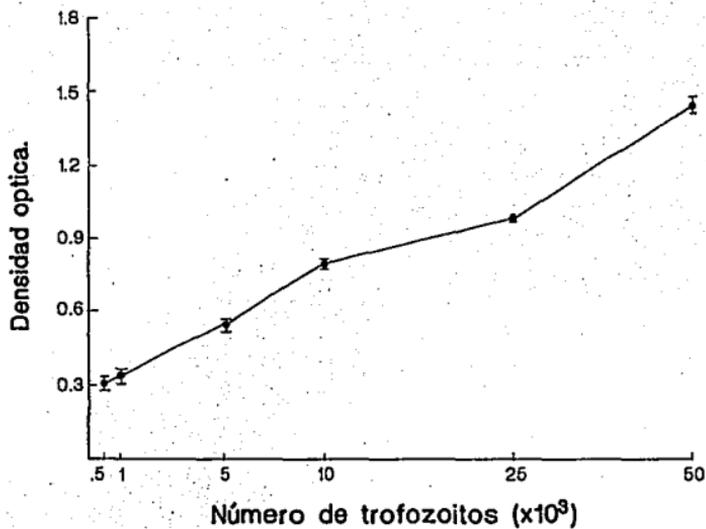


Figura 15. Correlación entre número de amibas y densidad óptica en el ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de adherencia a monocapas de células MDCK.

concentraciones de 10, 50, 100 y 200 mM. Los trofozoítos amibianos (50,000/micropozo de placa de ELISA) se preincubaron con los azúcares a las concentraciones mencionadas por 1h a 37°C, se centrifugaron y la pastilla se resuspendió en el amortiguador de fosfatos usado en el ensayo de adherencia. El ensayo inmunoenzimático se continuó como se describió en el artículo. De acuerdo con otros informes, la N-acetil-D-galactosamina fué el mayor inhibidor a todas las concentraciones ensayadas, seguido de la N-acetil-D-galactosamina y la lactosa (Fig. 16). A una concentración de 200 mM la inhibición por N-acetil-D-galactosamina fué de casi el 90%, mientras que los demás azúcares inhibieron entre 50 y 70%.

Los resultados obtenidos apoyan la capacidad del ensayo inmunoenzimático para evaluar adherencia amibiana, con las ventajas que aporta un ensayo de ELISA: rapidez, sencillez, sensibilidad, y a diferencia de los métodos hasta ahora empleados, no se requiere de la enumeración microscópica de células adheridas en suspensión, ni el uso de material radiactivo.

El ensayo inmunoenzimático se utilizó para evaluar el potencial inhibitorio de muestras de saliva de pacientes con amibiasis intestinal comprobada. El 80% de las muestras de saliva analizadas inhibieron la adherencia amibiana a las monocapas de células MDCK en más del 20%, con una media de 35%. Por el contrario, las muestras de saliva de pacientes con otras parasitosis intestinales y de sujetos controles

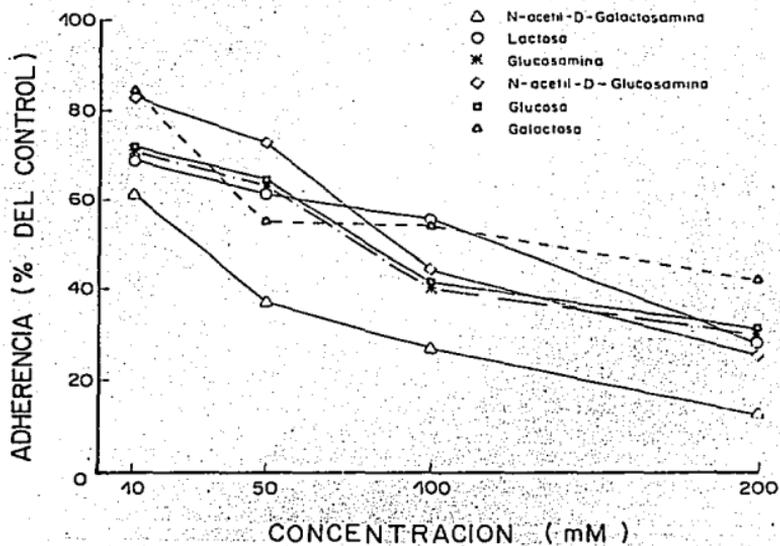


Figura 16. Inhibición de la adherencia de trofozoitos amibianos a monocapas de células MDCK por diversos azúcares.

sanos inhibieron la adhesión en un promedio de solamente 13% y 9%, respectivamente (Fig. 17).

Los ensayos de inhibición con la inmunoglobulina IgA purificada de las salivas de pacientes con amibiasis demostró que el efecto inhibitor era debido a este anticuerpo, ya que ambos, la saliva total y la IgA purificada de la misma, inhibieron la adherencia en la misma proporción (Fig. 4 del artículo). El material que no retuvo la columna de Jacalina-agarosa no inhibió la adhesión, indicando que otros elementos de la saliva, entre ellos anticuerpos IgG e IgM, al menos en las concentraciones en que están presentes, son incapaces de inhibir la adherencia. Esto no elimina la posibilidad de que estos anticuerpos, a concentraciones mayores, no puedan ejercer ese efecto.

En un reporte previo se demostró que los anticuerpos IgA inespecíficos interfieren en la interacción de los trofozoítos amibianos con eritrocitos humanos (Barranco y col., 1986). Con el propósito de determinar la especificidad de la inhibición debida a los anticuerpos IgA secretorios anti-*E. histolytica* y el debido a IgA anti-lectina que se une a galactosa, se desarrolló un experimento de absorción de muestras de saliva de pacientes empleando un extracto amibiano total y la lectina purificada. La absorción fue total como lo demostró la ausencia de reactividad de las muestras de saliva contra un extracto amibiano y la fracción de la lectina purificada, ensayadas por inmunoelectrotransferencia. Las salivas absorbidas con extracto amibiano vieron

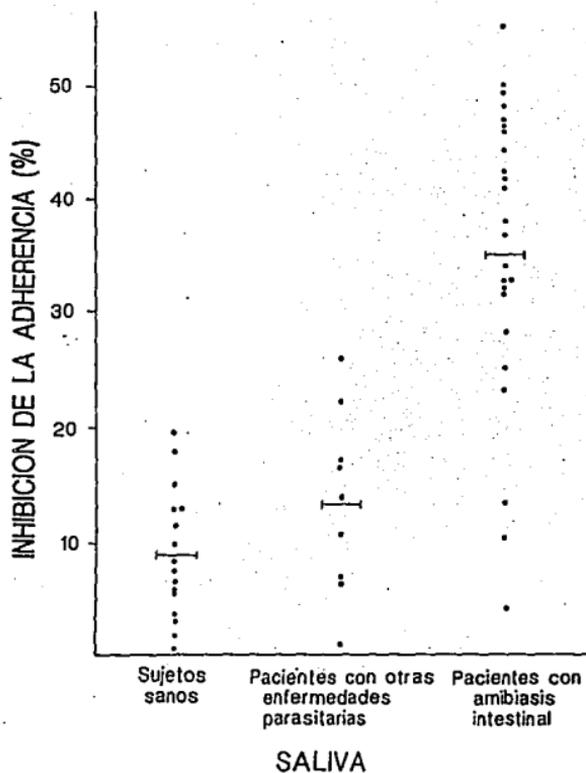


Figura 17. Inhibición de la adherencia de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* a células MDCK por saliva de pacientes con amebiasis intestinal, pacientes con otras enfermedades parasitarias y de sujetos controles sanos.

reducida su capacidad de inhibición en un promedio de 80%, mientras las absorbidas con la lectina sólo en un 32% (Fig. 18).

Esto implica que la inhibición observada con las muestras de saliva de pacientes con amibiasis intestinal se debe a anticuerpos IgA secretorios específicos para *E. histolytica* y que aproximadamente un 32% de ellos están dirigidos contra la lectina que se une a galactosa. Sólo una pequeña parte del efecto inhibitorio pudiera deberse a anticuerpos inespecíficos, lo que podría explicar los bajos pero aún detectables niveles de inhibición que mostraron las salivas de sujetos sanos y de los pacientes con otras parasitosis intestinales (Fig. 17).

En conclusión nuestros resultados sugieren que la respuesta inmune secretora intestinal que se desarrolla en la presencia del antígeno amibiano, constituye un mecanismo importante de defensa contra la amibiasis invasora, a través del bloqueo de las moléculas de superficie implicadas en adherencia, que son necesarias para que la amiba inicie su proceso de invasión tisular.

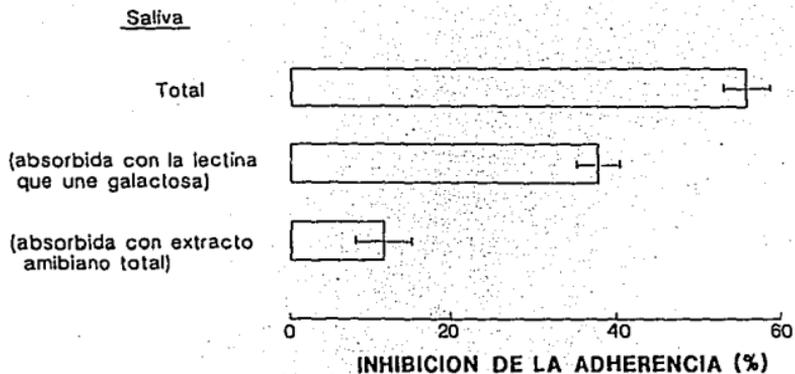


Figura 18. Inhibición de la adherencia amibiana a células MDCK por la saliva de pacientes con amibiasis intestinal previamente absorbidas con extracto amibiano total y con la lectina que une galactosa.

BIBLIOGRAFIA

Acosta, G., Barranco, C., Isibasi, A., Campos, R., y Kumate, J. (1982). Excreción de anticuerpos de la clase IgA específicos anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cultivados en medio axénico. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 13: (supl.3): 255-259.

Acosta, G., Campos, R., y Barranco, C. (1983). Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 409:760-765.

Acosta, G., Cote, V., Isibasi, A., y Kumate, J. (1985). Anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. Immunol., 4:24-27.

Acosta, G., Torres, E., Meraz, E., Isibasi, A., y Kumate, J. (1986). Detección de anticuerpos de clase IgA dirigidos contra una lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* en muestras de calostro humano. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 17:(supl.1):291-295.

Acosta, G., y Lascurain, R. (1992). Estructura y propiedades biológicas de la IgA. En Inmunología de las mucosas (G. Acosta y M. Caruz, eds). Distribuidora y Editora Mexicana,

Ahluwalia, N., Misra, R.C., Saha, K., Agarwal, S.K., y Gupta, P.S. (1982). Depression of jejunal IgA and peripheral T-cells counts in patients with amebic liver abscess Indian. J. Med. Res., 75:734-738.

Annesley, J. (1828). Research into the cause, nature and treatment of the more prevalent diseases in India and of warm climates generally, Longman, Rees, Orme, Brown and Green, London.

Arbo, A., Hoefsloot, M., Ramírez, A., y Santos, J. I. (1990). Entamoeba histolytica inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. Arch. Invest. Méd. (Méx)., 21:(supl.1):57-61.

Arellano, M.T., y Ortíz-Ortíz, L. (1974). Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Méd.(Méx)., 5:487-490

Arroyo, R., y Orozco, E. (1987). Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. Mol. biochem. Parasitol., 23:151-158

Artigas, J., Otto, I., y Kawada, M.E. (1966). Acción de Entamoeba histolytica sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. Bol. Chil. Parasitol., 21:114-118.

Bailey, G.B., Nudelman, E.D., Day, D.B., Harper, C.F., y Gilmour, J.R. (1990).

Specificity of glycosphingolipid recognition by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.*, 58:43-47

Barker, D.C., y Swales, L.S. (1972). Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoite to cyst in axenic *Entamoeba histolytica* sp. *Cell Differ*, 1:297-306.

Barranco, C., Acosta, G., Campos, R., Isibasi, A., y Kumate, J. (1986). Inhibición por anticuerpos de la adherencia de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 17:(supl.):237-241.

Beck, J.W., Davies, J.E. (1983). *Parasitología Médica*. 3 ed. Interamericana, México, D.F., pp 16.

Berber, A.C., Escobar, A., Zamora, M., y Acosta, G. (1990). Identification of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by IgA class human antibodies in sera and calostras of puerperal women using immunoblotting techniques. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 21:(supl.1):97-101.

Bienestock, J., y Befus, A.D. (1985). In gastrointestinal immunity for the clinician (R.G. Shorter y J.B. Kirsner, eds), Grune & Stratton, pp 1-22.

Boeck, W.C. y Drbohlav, J. (1925). The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am. J.*

Hyg. 5,371.

Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., C., Wood, S., Sims, P.J., y Petri, W.A. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.*, 90:1131-1137.

Brandtzaeg, P. (1974). Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components: differential localization of free and bound SC in secretory epithelial cells. *J. Immunol.*, 112:1553-1559.

Brandtzaeg, P. (1976). Complex formation between secretory component and human immunoglobulins related to their content of J chain. *Scand. J. Immunol.*, 5:411-419.

Brown, W.H. (1970). *Parasitología clínica*. 3ed. Interamericana, México. pp 25.

Brown, W.R., Yoskinari, I., y Nakame, P.K. (1976). Studies in translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium II. Immunoelectron-microscopic localization of immunoglobulins and secretory component in human intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 71:985-995.

Caballero, A., Viveros, M., Salvatierra, B., Tapia, R., Sepúlveda, J., Gutiérrez, G. y

Ortíz-Ortíz, L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50:en prensa.

Calderón, J., Muñoz, M.L., y Acosta, H.M. (1980). Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J. Exp. Med.*, 151:184-193.

Calderón, J., y Schreiber, R.D., (1985). Activation of the alternative and classical complement pathway by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, 50:560-565.

Cano-Mancera, R., y López-Revilla, R. (1987). Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. *Parasitol. Res.*, 74:18-22.

Capín, N.R., Ortíz-Ortíz, L., Zamacona-Ravelo, G., y Aubanel, M. (1973). Efecto del mercaptoetanol en las reacciones serológicas de la amebiasis invasora. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 4:177-180.

Councilman, W.T., y La Fleur, H.A. (1981). Amebic dysenterie, *Johns Hopkins Hosp. Rep.*, 2, 393.

Crevenna, P.B. (1977). Epidemiología de la amebiasis. *Salud Pública Mex.*, 19:411-420.

Chacún Bonilla, L., y Bonpart, D. (1981). Seroepidemiological study of amebiasis in adults

in Maracaibo, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30:1202-1205.

Chadee, K., Meeroovitch, E., y Moreau, F. (1985). *In vitro* and *in vivo* interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and gerbil lymphoid cells. *Infect. Immun.*, 49:828-832.

Chadee, K., Petri, W. A., Innes, D.J., y Ravdin, J.I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.*, 80:1245-1254.

Della-Corte, E., y Parkhouse, R.M. (1973). Biosynthesis of immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin M (IgM). Requirement for J chain and a disulphide-exchanging enzyme for polymerization. *Biochem. J.*, 136:597-606.

De la Torre, M., Ortíz-Ortiz, L., De la Hoz, R., y Sepúlveda, B. (1973). Acción del suero humano inmune y de la gammaglobulina antiamebiana sobre cultivos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 4:(supl.1):s67-70.

DeLeón, A. (1970). Prognóstico tardío en el absceso hepático amebiano. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 1:205-206.

Del Muro, R., Acosta, E., Merino, E., Glender, W., y Ortíz-Ortiz, L. (1990). Diagnosis

of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *J. Infect. Dis.*, 162:1360-1364.

Denis, M., y Chadee, K. (1988). *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage function in amebiasis. *Infect. Immun.*, 56:3126-3131.

Denis, M., y Chadee, K. (1989). Cytokine activation of murine macrophages for *in vitro* killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.*, 57:1750-1756.

Diamond, L.S. (1961). Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*, 134, 336.

Díaz, M.Y. (1992). Tesis de Licenciatura en Biología.

Fourmer, R. (1956). Bibliografía Mexicana del absceso hepático amibiano. La Prensa Médica Mexicana, México.

Gerrard, J.W. (1974). Breast feeding: second thoughts. *Pediatrics*, 54:575-764.

Ghadirian, E., y Meerovitch, E. (1978). Vaccination against hepatic amebiasis in hamsters. *J. Parasitol.*, 64:742-743.

Ghadirian, E., Meerovitch, E., y Hartmann, D.F. (1980). Protection against amebic liver abscess in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 29:779-784.

Gonzales-Galnares, M., y Gutierrez, G. (1986). Reducción de la letalidad por absceso hepático amibiano. Experiencia de un Hospital Pediátrico Mexicano. Arch. Invest. Méd. (Méx)., 17:(supl.1):341-349.

Gonzales-Robles, A., y Martínez-Palomo, A. (1983). Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic *Entamoeba histolytica*. J. Protozool., 30:692-700.

Grundy, M.S., Cartwright-Taylor, L., Lundin, L., Thors, C., y Hult, G. (1983). Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. J. Clin. Microbiol., 17:753-758.

Guerrant, R. L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sullivan, J.A., y Mandell, G.L. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis., 143:83-93.

Gutierrez, G., Margain, J., Castañeda, R., Enrique, O., Aubanel, M., y Sepúlveda, B. (1974). Encuesta Serológica Nacional. I. Investigación de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* en una localidad semirural de la costa del golfo de México. Arch. Invest. Méd. (Méx)., 5:s475-480.

Gutierrez, G., Ludlow, A., Espinoza, G., Herrera, S., Muñoz, N., Rattoni, N., y Sepúlveda, B. (1976). National Serologic Survey. II. Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in México. (Sepúlveda, B. y Diamond, L.S. eds.). Proceedings of the International Conference on Amebiasis. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 609-618.

Haffar, A., Boland, J., Morren, S., y Edwards, S. (1982). Amebic liver abscess in children. *Pediatr. Infect. Dis.*, 1:322.

Halpern, M.S., y Koshland, M.E. (1973). The stoichiometry of J chain in human secretory IgA. *J. Immunol.*, 111:1653-1660.

Harries, J. (1982). Amoebiasis: A review. *J. R., Soc. Med.*, 75:190-197.

Haq, A., Sharma, A., y Ahmad, S. (1984). Increased macrophage migration inhibition factor production in hamsters sensitized by amoebic antigen and glucan. *Parasite Immunol.*, 6:369-396.

Healy, G.R., Visveswara, G.S., y Kagan, I.G. (1974). Observations on the persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 5:495-500.

Heremans, J.F. (1974). In the antigens (M. Sela, ed.), Academic Press, New York, 2:365-

Islam, A., Stoll, B.J., Ljungstrom, I., Biswas, J., Nazrul, H., y Huldtt, G. (1988). The prevalence of *Entamoeba histolytica* in lactating women and their infants in Bangladesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82:99-103.

Jiménez, M. (1856). Lecciones dadas en la Escuela de Medicina, Imprenta Murguía, México.

Kngan, I.G. (1973). The immunology of amebiasis. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 4:s169-176.

Kartulis, S. (1886). Zur Aetiologie der Dysenterie in Aegypten, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Klin. Med.*, 105, 521.

Killian, M., Mestecky, J., y Russel, M.V. (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Revs.*, 52:296-303.

Knobloch, J., y Mannweiler, E. (1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32:727-732.

Kobiler, D., y Mirelman, D. (1980). Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites

to human erythrocytes. *Infect. Immun.*, 37:281-285.

Kobiler, D., y Mirelman, D. (1981). Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to monolayers of human cells. *J. Infect. Dis.*, 144:539-547.

Koch, R., y Grasffky, G. (1887). Bericht über die Tätigkeit der zur Erforschung der Chloera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandten Kommission, *Arb. Kaiserl. Ges.*, 31, 1.

Kretschmer, R.R. (1984). Immune phenomena in amebiasis, *Surv. Immunol. Res.*, 3:1.

Kretschmer, R.R. (1986). Immunology of amebiasis. In "Amebiasis" (A. Martínez-Palomo, ed), pp 95-167. Elsevier, Amsterdam.

Kretschmer, R.R. (1990). Amebiasis: infection and disease by *Entamoeba histolytica* (Kretschmer, R.R. ed.). CRC Press, Boston, pp 19-42.

Kretschmer, R.R. (1990). Epidemiology of amebiasis. (R.R. Kretschmer, ed). In *Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica*. CRC Press, Boston, pp 174-189.

Krupp, I.M. (1970). Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19:57-62.

Krupp, I.M., y Powell, S.J. (1971). Comparative study of the antibody response in amebiasis. Persistence after succesful treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20:421-424.

Kuenen, N.A., y Swellingrebel, N. (1913). Die Entamoeba der menschen und praktische Bedeutung, *Zeitsch. Bakt.*, 71, 378.

Lamm, M.E. (1976). Cellular aspect of immunoglobulin A. *Adv. Immunol.*, 22:223-290.

Landa, L., Aubanel, M., Segovia, E., y Sepúlveda, B. (1972). Seroepidemiología de la amibiasis en adultos. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*, 3:s377-380.

Landa, L., Capín, R., y Guerrero, M. (1976). Estudios sobre la inmunidad celular en la amibiasis invasora. In "Amebiasis" (B. Sepúlveda y L.S. Diamond, eds.), pp 654-660. Instituto Mexicano del Seguro Social, México City.

Li, E., Becker, A., y Stanley, S.L. (1988). Use of chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of *Entamoeba histolytica* adhesion. *J. Exp. Med.*, 167:1735-1730.

Liljemark, W.F., Bloomquist, C.G., y Ofstehage, J.C. (1979). Aggregation and adherence of *Streptococcus sanguis*: role of human salivary immunoglobulin A. *Infect. Immun.*, 26:1104-1110.

Losch, F.A. (1875). Maussenhafte Entwicklung Von Amoeben im Dickdarm, Virchows Arch., Pathol. Anat. Klin. Med., 65, 196.

Lushbaugh, W.B., y Miller, J.H. (1974). Fine structural topochemistry of *Entamoeba histolytica* schaudinn 1903. J. Parasitol., 60:421-433.

Mann, B.J., y Petri, W.A. Jr. (1991a). Cells Surface proteins of *Entamoeba histolytica*. Parasitol. Today, 7:173-177.

Mann, B.J., Torian, B.E., Vedvick, T.S., y Petri, W.A. Jr. (1991b). Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Sci. USA., 88:3248-3252.

Martínez-Cairo, S., Gorab, M., Muñoz, O., y Reyes, M. (1979). Coproantibodies in intestinal amebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx)., 10:121-126.

Martínez-Palomo, A. (1987). Las amibas, enemigos invisibles. SEP. 2 ed. México, pp 46-68.

Mata, L.J., y Urrutia, J.J. (1971). Intestinal colonization of breast-fed children in a rural area of low socioeconomic level. Ann. N. Y. Acad. Sci., 16:93-109.

Meerovitch, E., y Chadee, K. (1988). In vivo models of immunity in amebiasis, pp 425-437. In Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. (J.I. Ravdin ed.), Jhon Wiley & Sons, Inc., New York.

Mestecky, J., Kulhavy, R., y Kraus, F.W. (1971). Method of serum IgA isolation. *J. Immunol.*, 107:605.

Mestecky, J., Kulhavy, R., Wright, G.P., y Tomana, M. (1974). Studies on human secretory immunoglobulin A. VI. Cyanogen bromide cleavage. *J. Immunol.*, 113:404-412.

Merino, E., Glender, W., Del Muro, R., y Ortíz-Ortíz, L. (1990). Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. *J. Clin. Lab. Analysis*, 4:39-42.

Meza, I., Sabaness, M., Cazares, F., y Bryan, J. (1983). Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 258:3936-3941.

Michalek, S. M., McGhee, J. R., Kiyono, H., Colwell, D.E., Eldridge, J.H., Wannemuehler, M.J., y Koopman, W.J. (1983). The IgA response: inductive aspects, regulatory cells, and effector functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 409:48-71.

Michel, R., y Schupp, E. (1976). Cytoplasmatic fibrils and their relation to amoeboid movement of *Entamoeba histolytica* In: Sepúlveda, B., Diamond, L.S., eds. *Memorias de*

la Conferencia Internacional sobre Amibiasis, México city: Instituto Mexicano del Seguro Social, 300-310.

Miller, H.R.P. (1987). Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology*, 94:77-100.

Mirelman, D., y Ravidin, J.I. (1986). Lectins in *Entamoeba histolytica*. In microbial lectins and agglutinins: properties and biological activity. (D. Mirelman, ed). John Wiley and Sons, New York, 319-334.

Morisaki, I., Michalek, S.M., Harmon, C.C., Torii, M., Hamada, S., y McGhee, J.R. (1983). Effective immunity to dental caries: enhancement of salivary anti-*Streptococcus* mutants antibody responses with oral adjuvants. *Infect. Immun.*, 40:577-591.

Noble, E.R., y Noble, G.A. (1976). *Parasitology: the biology of animal parasites*. 4 ed. Philadelphia: Lea y Febiger.

Ortíz-Ortíz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B., y Capín, N.R. (1975). Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 4:127-134.

Ortíz-Ortíz, L., Capín, R., Capín, N.R., Sepúlveda, B., y Zamacona, G. (1978).

Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. *Chn. Exp. Immunol.*, 34:10-18.

Ortiz-Ortiz, L., y Avella, L.M. (1984). Respuesta inmune en infección por *Entamoeba histolytica*. *Inmunología*, 3,5.

Ortiz-Ortiz, L. (1994). Amebiasis, In *Parasitic Infections and the Immune System*. Academic Press, Inc., pp 145-162.

O'Shea-Alvarez, M. S., y Treviño, N. (1985). Presencia de anticuerpos anti-amiba en secreciones de fleon, colon y material fecal de pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*., 16: 401-409.

O'Shea-Alvarez, M.S., Treviño, N., y López, A. (1987). Antígenos de superficie para *Entamoeba histolytica* que interaccionan con la IgA específica de suero inmune. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*., 18:229-233.

Parkes, E.A. (1846). *Remarks on dysentery and hepatitis in India*, Longman, Rees, Orme, Brown and Green, London.

Pérez-Tamayo, R. (1986). *Pathology of amebiasis*. Edited by A. Martínez-Palomo. Amsterdam, Elsevier Biomedical, pp 45-94.

Petri, W.A. Jr., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, C.F., y Ravdin, J.I. (1987). Recognition of the galactose or N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infect. Immun.*, 55:2327-2331.

Petri, W.A. Jr., Chapman, M.D., Snodgrass, T., Mann, B.J., Broman, J., y Ravdin, J.I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 264:3007-3012.

Petri, W.A. Jr., Jackson, T.F.H.G., Gathiram, V., Kress, K., Saffer, L.D., Snodgrass, T.L., Chapman, M.D., Keren, Z., y Mirelman, D. (1990a). Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect. Immun.*, 58:1802-1806.

Petri, W.A. Jr., Snodgrass, T.L., Jackson, T.F.H.G., Gathiram, V., Sinjee, A.E., Chadee, K., y Chapman, M.D. (1990b). Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *J. Immunol.*, 144:4803-4809.

Petri, W.A. Jr., y Ravdin, J.I. (1991). Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, 59:97-101.

Pinto da Silva, P., Martínez=Palomo, A., y González-Robles, A. (1975). Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate. *J. Cell. Biol.*, 64:538-550.

Pittman, F.E., El-Hashimi, W.K., y Pittman, J.C. (1973). Studies of human amebiasis. II. Light and electron-microscopic observations of colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis. *Gastroenterology*, 65:588-603.

Podolsky, D.K., y Isselbacher, K.I. (1983). Composition of human colonic mucin. Selective alteration in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.*, 72:142-153.

Poger, M.E., Y Lamm, M.E. (1974). Localization of free and bound secretory component in human intestinal epithelial cells. A model for the assembly of secretory IgA. *J. Exp. Med.*, 139:629-642.

Powell, J.S., Wilmot, A.J., y Elsond-Dew, S. (1959). Hepatic amoebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 53:190-195.

Quezada-Calvillo, R., y López-Revilla, R. (1987). Proteólisis de inmunoglobulinas por *Entamoeba histolytica*, in *Proc. 7th Natl. Congr. Immunology (Méx)*, Abstr. #7.

Quincke, H., y Ross, E. (1893). *Über Amoeben-enteritis*, *Berl. Klin. Wchschr.*, 30, 1089.

Ramos-Martínez, E., Martínez, F.M., Velasco, A.F., Flores, B.F., y Aguirre-García, J. (1986). Amibiasis: estudio comparativo de dos grupos de 5,000 necropsias del Hospital General "Dr. Bernardo Sepúlveda" del Centro Médico Nacional. Arch. Invest. Med. (Méx)., 17:(supl.1):351-357.

Ravdin, J.I., y Guerrant, R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest., 68:1305-1313.

Ravdin, J.I., Sperelakis, N., y Guerrant, L. (1982). Effect of ion channels inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J. Infect. Dis., 146:335-340.

Ravdin, J.I., John, J.E., Johnston, L.I., Innes, D.J., y Guerrant, R.L. (1985a). Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. Infect. Immun., 48:292-297.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L., y Long-Krug, S.A. (1985b). Effect of calcium and phospholipase A antagonist in the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J. Infect. Dis., 152:542-549.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L., y Hewlett, E.L. (1985c). N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial

purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J. Infect. Dis.*, 151:804-815.

Ravdin, J.I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Revs. Infect. Dis.*, 8:247-260.

Ravdin, J.I., Stanley, P., Murphy, C.F., y Petri, W.A. Jr. (1989). Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. *Infect. Immun.*, 57:2179-2186.

Ravdin, J.I., Shain, D.C., y Kelsall, B.L. (1993). Antigenicity, immunogenicity and vaccine efficacy of the galactose-specific adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine*, 11:241-246.

Reed, S.L., y Gigli, I. (1990). Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. *J. Clin. Invest.*, 86:1815-1822.

Reed, S.L. (1992). Amebiasis: An update. *Clin. Infect. Dis.*, 14:1185-1207.

Rees, C.W., Bozicevich, J., Reardon, L.W., y Jones, F.A. (1942). A preliminary note on the complement fixation test for amebiasis with antigen prepared from *Entamoeba histolytica* grown with a large single species of bacteria. *Am. J. Trop. Med.*, 22, 581.

Rigothier, M.C., Coconnier, M.H., Servin, A.L., y Gayral, P. (1991). A new in vitro model of *Entamoeba histolytica* adhesion, using the human colon carcinoma cell line Caco-2: scanning electron microscopy study. *Infect. Immun.*, 59:4142-4146.

Roach, T.I.A., Else, K.J., Wakelin, D., McLaren, D.F., y Grecis, R.K. (1991). *Trichuris muris*: antigen recognition and transfer of immunity in mice by IgA monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, 13:1-12.

Rocha, L.M., Cruz, A.L., y García, M.R. (1992). Inmunología del calostro y la leche humana. In *Inmunología de las mucosas* (G. Acosta y M. Cruz, eds.). Distribuidora y Editora Mexicana, S.A. de C.V., pp 141.

Saffer, L.D., y Petri, W.A. Jr. (1991a). *Entamoeba histolytica*: recognition of α and β -galactose by the 260 kDa adherence lectin. *Exp. Parasitol.*, 72:106-108.

Saffer, L.D., y Petri, W.A. Jr. (1991b). Role of galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. *Infect. Immun.*, 59:4681-4683.

Salata, R.A., Pearson, R.D., y Ravdin J.I. (1985). Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica* killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J. Clin. Invest.*, 76:491-499.

Salata, R.A., Martínez-Palomo, A., Murray, H.W., Canales, L., Treviño, N., Segovia, E., Murphy, C.F., y Ravdin J.I. (1986a). Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune response effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.*, 136:2633-2639.

Salata, R.A., y Ravdin, J.I. (1986b). Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. *Rev. Infect. Dis.*, 8:261-271.

Salata, R.A., y Ravdin, J.I. (1988). Immunoprophylaxis, pp 785-792. In J.I. Ravdin (ed), *Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York.

Salata, R.A., Martínez-Palomo, A., Canales, L., Murray, H.W., Treviño, N., y Ravdin, J.I. (1990). Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. *Infect. Immun.*, 58:3941-3946.

Sargueant, P.G., Williams, J.E., y Grene, J.D. (1978). The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72:519-521.

Sepúlveda, B. (1970). La amibiasis invasora por *Entamoeba histolytica*. *Gac. Méd. Méx.*, 100:201-213.

Sepúlveda, B., Tanimoto-Weiki, M., Calderón, P., y de la Torre, M. (1974). Neutralización de la virulencia en cultivos de *Entamoeba histolytica* con suero inmune. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 5:447-450.

Sepúlveda, B. (1979). Inmunología de la amebiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 5:447-454.

Sepúlveda, B. (1980). Immunology of amebiasis. In "Molecules, cells and parasites in immunology" (C. Larralde, K. Willms, L. Ortíz-Ortiz, y M. Sela, eds.), pp 163-177. Academic Press, New York.

Shaffer, J.G., y Ausfield, I. (1956). The effect of antisera on the ability of *Entamoeba histolytica* to phagocytize red blood cells. Am. J. Trop. Med. Hyg., 5:53-61.

Sharma, P., Krishna-Prasad, B.N., y Dutta, G.P. (1978). Coproantibodies in intestinal amoebiasis using axenic *Entamoeba histolytica* antigen. Indian J. Med. Res., 68:423-427.

Sher, A., Ahmad, S., y Muller-Berat, C. (1980). Cell mediated immune response in experimental amebiasis. Arch. Invest. Méd., 11:201-208.

Shetty, N., Nagpal, S., Subba-Rao, P.V., y Schoder, H. (1990). Detection of IgG, IgA, IgM and IgE in antibodies in invasive amoebiasis in endemic areas. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 21:(supl. 1):41-46.

Smith, J.W., McQuay, R.M., Ash, R.L., Melvin, D.M., Orihel, T.C., Thompson, J.H., eds. (1979). Diagnostic Medical Parasitology: intestinal protozoa. American Society of Clinical Pathologists, Education Products Division, USA.

Soberón, P.G., y Peláez, F.D. (1964). Parasitología Médica y etiología tropical. 1ra ed. Librería Médica, México. pp 29.

Stillwell, G. (1955). Amebiasis. Its early history. Gastroenterology, 28, 606.

Tanimoto-Weki, M., Vázquez-Snavedra, J.A., Calderón-Lara, P., y Aguirre-García, J. (1973). Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amibiano axénico en el hamster. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 4:s147-154.

Tannich, E., Ebert, F., y Horstmann, R.D. (1991). Primary structure of the 170 kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88:1849-1853.

Tannich, E., Ebert, F., y Horstmann, R.D. (1992). Molecular cloning of cDNA and genomic sequences coding for the 35 kilodalton subunit of the galactose-inhibitable lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol., 55:225-228.

Tornasi, T.B., y Bienenstock, J. (1968). Secretory immunoglobulins. Adv. Immuns., 9:1.

Treviño, N. (1990). Clinical spectrum of amebiasis in adults. In "Amebiasis: Infection and disease by *Entamoeba histolytica*" (Kretschmer, R.R. ed.), pp 191-208. CRC Press, Boston.

Trissl, D. (1982). Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal host. *Rev. Infect. Dis.*, 4:1154-1184.

Tse, S.K., y Chadee, K. (1991). The interaction between intestinal mucus glycoproteins and enteric infections. *Parasitol. Today*, 7:163-172.

Tsutsumi, V., Mena, R., y Martínez-Palomo, A. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J. Pathol.*, 117:81-89.

Tsutsumi, V., y Martínez-Palomo, A. (1988). Inflammatory reaction in experimntal hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.*, 30:112-119.

Vaidya, A.B., y Ray, D.K. (1982). Amebiasis. *The Tropical Scourge. Sci. Today (India)*, 21, 26.

Walsh, J.A. (1986a). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.*, 8:228-238.

Walsh, J.A. (1986b). Amebiasis in the world. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 17:s385-389.

World Health Organization Expert Committee. (1969). "Amoebiasis" WHO Technical Report Series, 421:1-52.

Wyler, C. (1990). Modern Parasitol. Cell biology of *Entamoeba histolytica* and immunology of amebiasis. Center. 5 ed. USA.

Zaman-Vigar, C. (1979). Atlas of Medical Parasitology. American, 4 ed. USA. pp 234.