

Amibiasis: Aspectos relevantes de la respuesta inmunitaria y del diagnóstico de laboratorio

Librado Ortiz-Ortiz¹ y Disney M. Rosales-Borjas²

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad de Los Andes Extensión Portuguesa, Guanare, Estado Portuguesa, Venezuela

²Hospital Universitario Dr. Miguel Oraá, Guanare, Estado Portuguesa, Venezuela

Recibido Febrero 15, 2007. Aceptado Marzo 25, 2007.

AMEBIASIS: RELEVANT ASPECTS OF THE IMMUNE RESPONSE AND LABORATORY DIAGNOSIS

Resumen

La amibiasis es una enfermedad producida por *Entamoeba histolytica* que afecta al 10% de la población mundial, particularmente a niños en edad escolar. La transmisión del padecimiento se lleva cabo por contaminación fecal-oral, por medio de los quistes del parásito. La respuesta inicial a la invasión amibiana es la inflamatoria, producida por la adhesión del parásito a las células del epitelio intestinal, seguida de la liberación de enzimas tóxicas que destruyen a las células a las que se unen. Por otra parte, el complemento presente en el suero es capaz de destruir a la amiba en ausencia o presencia de anticuerpo. Sin embargo, la amiba es capaz de evadir el efecto del complemento. La respuesta inmunitaria se caracteriza por la formación de anticuerpos de las clases M, G y A. La IgA secretoria (IgAs) destaca por su capacidad de evitar el efecto citolítico de la amiba, al reaccionar con el parásito e impedir su enlace a la célula diana. La IgAs reacciona con numerosos antígenos de *E. histolytica*, particularmente con una lectina que tiene gran afinidad por la galactosa y que parece ser una de las más importantes en la unión del parásito a la célula diana. Se discute el diagnóstico de la amibiasis, revisando las distintas metodologías y los antígenos específicos que se han aislado por métodos de biología molecular. Los antígenos específicos caracterizados ofrecen la posibilidad de desarrollar una vacuna eficaz en contra de la infección amibiana.

PALABRAS CLAVE: Amibiasis; *Entamoeba histolytica*; Diagnóstico amibiasis; Respuesta inmune en amibiasis

Abstract

Amebiasis caused by Entamoeba histolytica affects 10% of the world population, particularly children at scholar age. The disease transmission is carried out by fecal-oral contamination, by means of cysts of the parasite. The initial response to the amebic invasion is inflammation, produced by the parasite adhesion to the cells of the intestinal epithelium, followed by the release of toxic enzymes that destroy them. On the other hand, serum complement is able to lyse the ameba in absence or presence of antibody. However, the ameba is able to evade this effect. The immune response is characterized by the formation of antibodies of the M, G, and A classes. The secretory IgA (IgAs) stands out for its capacity to avoid the cytolytic effect of the ameba when it combines with the parasite, impeding its binding to target cells. The IgAs reacts with various amebic antigens, particularly with the lectin with affinity for galactose that appears to be the most important in the binding of the parasite to the target cell. We discuss the diagnosis of amebiasis, reviewing the different methodologies and the specific antigens than have been isolated by molecular biology methods. The specific antigens characterized offer the possibility of developing a vaccine that could protect against the amebic infection.

KEY WORDS: Amebiasis; *Entamoeba histolytica*; Immune response to *E. histolytica*; Amebiasis diagnosis

Introducción

El protozooario intestinal *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la amibiasis, una enfermedad de distribución mundial, particularmente en los países en desarrollo donde anualmente cerca de 500 millones de habitantes sufren infecciones intestinales, y de ellos 40 millones desarrollan la forma invasora del padecimiento y 40 000 mueren. La amibiasis invasora prevalece en ciertas áreas del mundo que incluyen Africa, Sudamérica, India y México (1). La exposición al contacto infeccioso con la amiba ocurre en todas las edades, aunque se observa una frecuencia elevada en la edad escolar. Varios factores contribuyen a la difusión de esta enfermedad, donde destaca el marcado retraso socio-económico de la casi totalidad de las regiones donde la amibiasis es endémica, situación que crea las condiciones de insalubridad necesarias para la transmisión fecal-oral de este protozooario, y otros no bien conocidos, relacionados con aspectos biológicos del parásito y su hospedero (2).

El hospedero humano es infectado por los quistes tetranucleados de *E. histolytica* que se transforman en trofozoitos y colonizan el lumen del colon, donde se multiplican y viven como comensales. Los quistes son producidos cuando las condiciones locales se vuelven desfavorables para la viabilidad de los trofozoitos, lo cual ocurre cuando las heces se deshidratan en su pasaje del colon al recto. Los quistes se encuentran usualmente en individuos asintomáticos, cuyas heces están bien formadas. La enfermedad es transmitida por la ingestión de alimentos o agua contaminadas con los quistes (3).

La patogenia de *E. histolytica* resulta de una serie de eventos complejos en el hospedador, que involucran la adhesión de la amiba, destrucción de la célula y proteólisis de la matriz extracelular de la mucosa del colon, causando lesiones ulcerativas características y una diarrea sanguinolenta profusa (disentería amibiana). La infección puede difundirse vía el sistema venoso portal al hígado, ocasionando un absceso hepático amibiano (AHA), que puede presentarse en ausencia de una disentería franca (4).

La adhesión de los trofozoitos de *E. histolytica* al epitelio del colon parece ser acompañado por la formación de filopodia (elementos filamentosos largos que se extienden hacia el exterior de la superficie de la membrana de la amiba). La

inhibición de éste proceso por condiciones que previenen la formación de microfilamentos ocasiona una reducción marcada de la adherencia amibiana. La unión del parásito es también dependiente de una proteína (lectina) localizada sobre su superficie. La lectina parece enlazarse preferentemente a polisacáridos y glucoconjugados que contienen N-acetilgalactosamina. La adhesión a las células del epitelio intestinal es también dependiente de la temperatura, el tiempo de incubación, y el pH (5).

Los trofozoitos de *E. histolytica* son letales para numerosos cultivos de líneas celulares, y la adhesión es seguida rápidamente por la destrucción de la monocapa celular. Aunque la amiba produce numerosas proteasas, hialuronidasa, y otras enzimas hidrolíticas, no se ha demostrado in vitro que éste efecto lítico tenga lugar en presencia de extractos amibianos; es decir, se requiere de un contacto directo entre la célula diana y el trofozoito intacto. Al mismo tiempo que ocurre la destrucción celular, se observa la fagocitosis de las células diana viables o muertas. Esto podría explicar porque los exámenes de las biopsias tisulares obtenidas de pacientes revelan la presencia de leucocitos solamente en la periferia de las lesiones establecidas (6).

La característica más relevante de este parásito es su capacidad citolítica extensa, la que constituye su función patogénica principal. Se ha reportado que después del contacto trofozoito-célula diana, la amiba libera una proteína dentro del espacio intercelular la cual se inserta en la membrana, formando un canal iónico similar al que producen los linfocitos citotóxicos (7). Este evento es iniciado por el contacto íntimo entre el parásito y la célula diana que se establece principalmente a través de una molécula de tipo lectina (8). En unos cuantos minutos, se observan cambios importantes en la célula diana, como hinchazón y alteraciones de la superficie que finalmente ocasionan que la membrana pierda sus funciones y muera. El factor que produce el canal o poro se denomina amebaporo (9). Se conocen isoformas que constituyen una familia con una secuencia similar a la que presentan los polipéptidos encontrados en las células T citotóxicas y asesinas naturales (NK). Otros candidatos mediadores de la citólisis observada son los gránulos de la amiba que contienen una batería de enzimas hidrolíticas, entre ellas la fosfolipasa ácida A2, que lisa

membranas artificiales, y cuya actividad aumenta en presencia del amebaporo. Además, tiene una cisteína proteasa, cuya secreción puede contribuir al daño de las células y tejidos del hospedero. Se ha observado que antes de la invasión intestinal, esta cisteína proteasa degrada la matriz extracelular, las mucoproteínas, la membrana basal epitelial y la inmunoglobulina (Ig) A e IgG del hospedero, desplazando las células epiteliales e interfiriendo con la respuesta inmunitaria (RI). Asimismo, activan la vía alterna del complemento y evaden la respuesta inflamatoria al inactivar los productos de degradación del complemento, específicamente, las anafilatoxinas C3a y C5a (10).

Se ha reconocido que diferentes cepas de *E. histolytica* varían en su patogenia. En relación a esta propiedad, se ha reportado que las amibas aisladas de pacientes con amibiasis invasora exhiben distintos zymodemos que las amibas aisladas de portadores asintomáticos. Asimismo, se ha reconocido que existen disparidades entre el ADN genómico de cepas patogénicas y aquellas no patogénicas (11)

Respuesta inmunitaria

Al parecer, la RI contra *E. histolytica* ocurre solamente cuando el trofozoito invade los tejidos del hospedero, y al hacerlo sobreviene una RI convencional. En esta primera fase tal vez participan las células inflamatorias alistadas en el lugar de la invasión, especialmente las que se encuentran en el margen de las úlceras amibianas, en donde se presenta de manera inevitable el primer contacto entre los antígenos amibianos y el sistema inmunológico. Resulta interesante observar que, cuando las amibas procedentes de las úlceras intestinales penetran en el hígado a través de la vena porta, no logran, por lo menos al comienzo, inducir una RI celular. En el humano, se desconoce si la ausencia de reacción inflamatoria en el AHA es característica de todas las fases de esta enfermedad o sólo de las etapas iniciales, ya que en los estudios postmortem de biopsias hepáticas no se identifica (12). Sin embargo, las investigaciones respecto del AHA en hámsters han puesto en claro los procesos morfológicos implicados en el AHA experimental, desde el hospedaje de las amibas en los sinusoides hepáticos hasta el desarrollo de necrosis extensa del hígado. La formación de AHA posterior a la inoculación intraportal de amibas virulentas en

hámsters comprende tres etapas: inflamación aguda, formación de granuloma y necrosis progresiva. El contacto directo entre las amibas y las células hepáticas se observa muy rara vez. Esto hace pensar que los trofozoitos de *E. histolytica* no producen AHA en los hámsters mediante lisis directa de los hepatocitos, sino por medio de la acumulación y la subsecuente lisis de leucocitos y macrófagos que rodean a las amibas, lo que produce en consecuencia, necrosis hepática. Al sanar, las secreciones amibianas de colon, hígado o piel no dejan virtualmente tejido cicatrizal (13). Esto podría ser el resultado del efecto antiinflamatorio de por lo menos algunas amibas, y podría constituir un mecanismo de evasión de la RI del hospedero, en este caso en particular de la inmunidad mediada por células (IMC) (14). No obstante, los pacientes con diferentes formas de esta enfermedad presentan eventualmente una IMC, fenómeno que se observa in vivo como in vitro.

El estudio de la inmunología de la amibiasis avanzó de manera significativa gracias al desarrollo de los cultivos axénicos de *E. histolytica* (15) y la producción de antígeno a partir de los mismos (16). Lo anterior ha permitido realizar ensayos de vacunación a nivel experimental, utilizando antígenos crudos o sus fracciones, con resultados que indican la posibilidad de inducir protección en contra de la amibiasis invasora. Actualmente, gracias al advenimiento de la biología molecular se han conseguido por diferentes métodos, antígenos recombinantes que han sido probados en animales de laboratorio, mostrando ser útiles en protección en contra del padecimiento que nos ocupa (17, 18). Asimismo, con los antígenos obtenidos se ha demostrado la presencia de reacciones inmunitarias de tipo humoral y celular al parásito, como se observa en otros procesos infecciosos.

Respuesta humoral

La RI humoral frente a *E. histolytica* se caracteriza por la participación del complemento sérico y de las Igs. La amiba es destruída cuando se expone únicamente al complemento sérico por la activación de la vía alterna, o en presencia de anticuerpos IgM e IgG específicos, ocasionado por la vía clásica dependiente de anticuerpo. La activación de la vía alterna por la amiba se conoce desde hace más de tres décadas (19), aunque su activación todavía se discute. Sin embargo, en un

estudio realizado en 21 pacientes donde se aisló la *E. histolytica* y se caracterizó por técnicas de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y tipificación de isoenzimas de hexokinasa, se encontró que 90% de los trofozoitos eran lisados por la vía alterna del complemento durante los primeros 30 minutos de exposición a suero humano obtenido de sujetos sintomáticos o asintomáticos (20). Sin embargo, la amiba escapa el efecto lítico del complemento cuando invade los tejidos del hospedero. No se descarta que la amiba adquiera resistencia a este factor humoral in vivo y que su sensibilidad a los efectos de la vía alterna solamente tenga lugar durante su fase dentro del intestino; cuando el parásito coloniza el epitelio intestinal no requiere ser protegida de los efectos del complemento. Por otra parte, cuando el protozooario invade al hospedero y se expone a los efectos del complemento necesita ser protegido y es cuando se adapta a la presencia del factor sérico (21). Se ha propuesto que la resistencia de *E. histolytica* a la lisis por el complemento se lleve a cabo principalmente por la adquisición de moléculas reguladoras (20).

Los anticuerpos IgM e IgG, como ya se mencionó, también activan al complemento cuando se combinan con la amiba y al hacerlo destruyen al trofozoito. No obstante, el parásito una vez más evade los efectos del anticuerpo a través de un mecanismo que le permite polarizar los anticuerpos depositados sobre su superficie hacia la región uroide, donde la globulina es eliminada espontáneamente por el trofozoito como agregados supramoleculares o capuchones, sin causarle daño alguno (22).

En las mucosas, las Igs de secreción constituyen la primera línea de defensa contra agentes patógenos. En la materia fecal de individuos con amibiasis intestinal se han encontrado coproanticuerpos anti-amiba (23). En leche y calostro humano se ha determinado IgA secretoria (IgAs) con especificidad para el antígeno amibiano total y una lipopeptidofosfoglucona, respectivamente. En modelos experimentales con ratas inmunizadas intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* se ha demostrado la elaboración de IgA anti-amibiana (24).

La IgAs se ha estudiado en la saliva de pacientes con amibiasis intestinal, encontrando que reacciona con diferentes antígenos amibianos; sin embargo, es característica su combinación con una lectina

que enlaza galactosa (lectina-Gal) y al hacerlo inhibe la adhesión de *E. histolytica* a un cultivo de células MDCK, impidiendo su actividad citolítica (25). Esta propiedad de la IgAs se ha utilizado en la identificación de clonas y caracterización de antígenos amibianos, usando una biblioteca de expresión de ADN complementario de la cepa HM1:IMSS, e investigando que antígenos reconoce la IgAs de pacientes con amibiasis intestinal y con AHA. Las clonas identificadas por la IgAs de pacientes con amibiasis intestinal corresponden a una isoforma de una proteína rica en serina, otra rica en cisteína de 29 kDa, y a un factor de elongación 1- α (26). Por otra parte, la IgAs de pacientes con AHA reacciona con clonas que pertenecen a enolasa, ciclofilina, proteína ribosomal L23a, y una proteína de choque térmico de la familia Hsp70, así como a un péptido rico en ácido glutámico. Estos antígenos son potencialmente útiles en el desarrollo de vacunas orales o el diagnóstico de la amibiasis. Así, se ha reportado que la inmunización de roedores por vía oral con la lectina-Gal (17) y una proteína rica en serina (18), los protege en contra de la inducción de AHA. Además, en un estudio muy interesante, se ha identificado a los determinantes antigénicos o epitopos potencialmente protectores de la lectina-Gal de *E. histolytica*. El examen se realizó con una proteína rica en cisteína que incluye los aminoácidos 758 a 1134 de la lectina-Gal de 170 kDa. La inmunización de gerbos con esta proteína los protegió contra la inducción de AHA, con una eficacia de 70% (27). Además, se encontraron anticuerpos IgA e IgG contra esta proteína en el suero de más de 90% de pacientes con amibiasis invasora y en la mayoría de sujetos con infección intestinal asintomática (27, 28). La identificación de los epitopos de la lectina por la IgA proporciona una nueva oportunidad para diseñar una vacuna para prevenir la infección amibiana intestinal.

La participación de la IgE en amibiasis es controversial. En investigaciones realizadas en sueros de pacientes con amibiasis invasora, se encontró que éstos no sensibilizaban fragmentos de pulmón humano y, por tanto, no contenían IgE anti-amibiana (29). Sin embargo, otros grupos han demostrado su presencia en una población Africana infectada con la amiba (30), y también en leucocitos polimorfonucleares de pacientes con AHA agudo o curado, aunque las células del primer grupo liberaban el 50% de histamina con una cantidad de

antígeno amibiano significativamente menor que la requerida por el segundo grupo o los controles sin enfermedad amibiana. Si la IgE participa, se desconoce el papel que tiene en este padecimiento (31).

La mayoría de los anticuerpos anti-amibianos esta formada por IgG, probablemente de la subclase 2 (29). La amibiasis invasora casi siempre produce respuestas rápidas de inmunidad humoral; así, en individuos infectados, los anticuerpos circulantes específicos, sobre todo los de tipo IgG, generalmente se detectan una semana después de la aparición de los síntomas.

La determinación de anticuerpos circulantes es de utilidad en estudios seroepidemiológicos, ya que los anticuerpos persisten en el suero por meses o años después del tratamiento de la amibiasis invasora. Es posible que tales anticuerpos también aparezcan después de infecciones subclínicas, como se observa en otras enfermedades infecciosas. Estos factores deben ser tomados en consideración en la interpretación de resultados serológicos, ya que una reacción positiva puede reflejar una infección previa más que una actual. Aprovechando estas características, se estudió en México la seroprevalencia de la amibiasis, la cual se estimó en el 8.41% de muestras representativas de las 32 entidades examinadas, la enfermedad mostró ser endémica, con áreas de predominio elevado no relacionadas con las condiciones climáticas (32).

Respuesta celular

En relación a la inmunidad celular dependiente de linfocitos T o IMC, existen varios estudios en individuos infectados con *E. histolytica* que indican una elevada incidencia de reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío (HTT) (33), la cual permanece positiva por largo tiempo después de la recuperación de la enfermedad amibiana (34). Es interesante mencionar que, los pacientes con AHA agudo que ingresan al hospital y no han recibido tratamiento, presentan una menor frecuencia de reacciones de HTT hacia el antígeno amibiano que cuando se recuperan del padecimiento, momento en que todos presentan una reacción de HTT. Este hallazgo contrasta con la reacción intradérmica positiva de HTT en los mismos pacientes, contra un antígeno no relacionado con la amiba, la estreptodornasa-estreptoquinasa, un antígeno al

cual la población estudiada resulta positiva en por lo menos un 70%. Lo anterior indica que la falta de respuesta o anergia es específica para el antígeno amibiano (35). La anergia observada durante el AHA agudo puede ser causada por una desensibilización temporal debida a la presencia de antígeno en circulación, fenómeno que sabemos se presenta en otros sistemas donde la HTT ha sido estudiada (36). La alteración de la IMC al antígeno amibiano no es debida a una disminución en linfocitos T, ya que su cuantificación en la sangre de pacientes con AHA agudo es normal (37). Con base en estas investigaciones podemos decir que la positividad de la prueba cutánea está relacionada con la evolución clínica de la enfermedad.

El descenso de la inmunidad celular en pacientes con amibiasis invasora es relevante si consideramos que, cuando los mecanismos de defensa se tornan insuficientes, los hongos oportunistas pueden instalarse en el cuerpo humano y producir enfermedad. En este aspecto, se encontró que las infecciones por *Candida albicans* se desarrollaban con cierta frecuencia en individuos con amibiasis invasora. Los estudios realizados en 3,000 autopsias, en el Departamento de Patología del Hospital General del Centro Médico Nacional, revelaron 175 casos de amibiasis, en 34 de los cuales había micosis por oportunistas (38). Estos hallazgos y los anteriormente citados de la anergia en el AHA sugieren que la depresión de la IMC sea la responsable de las infecciones por *C. albicans*, sobre todo si consideramos que este tipo de inmunidad desempeña un papel fundamental en la evolución de las infecciones por hongos (39). En apoyo de lo anterior, se ha demostrado experimentalmente que animales infectados con la amiba son incapaces de eliminar a *C. albicans*, microorganismo que animales normales no infectados eliminan con gran eficacia (40). Asimismo, se ha reportado que la supresión de la actividad del macrófago durante la amibiasis es principalmente debida a un efecto local causado por la exposición directa a la amiba y sus productos (41). Estos eventos pueden influir en la presentación del antígeno por el macrófago a las células T, disminuyendo así la IMC y la secreción de citocinas, algunas de las cuales son necesarias para la activación del macrófago. En este sentido, se ha informado que el tratamiento de macrófagos de ratón con antígenos amibianos reduce in vitro la expresión de moléculas de clase I del MHC (Ia)

inducidas por interferon (IFN)- γ . Este efecto se considera es ocasionado parcialmente por la prostaglandina E2 (PGE2), ya que se puede bloquear con inhibidores de la ciclooxigenasa (indometacina) (42, 43).

La habilidad de los macrófagos y de los linfocitos T activados para resistir y destruir trofozoitos de *E. histolytica* se ha demostrado en experimentos in vitro (44). Además, esta noción se apoya en modelos experimentales in vivo, ya que los procedimientos que deprimen la actividad de estas células hacen que el hospedero se vuelva más susceptible a las infecciones amibianas. Esto se ha observado incluso en ratones genéticamente resistentes a infecciones intestinales (45), así como indirectamente por observaciones en individuos sometidos a tratamiento con inmunosupresores o suero antitímocítico, que deprimen fundamentalmente las funciones de los linfocitos T (46, 47). Este hallazgo es importante si consideramos que las células CD8 pueden ser responsables tanto de la inmunosupresión como de la citotoxicidad sobre los trofozoitos de *E. histolytica*, producidas por los linfocitos T activados en diferentes etapas de la amibiasis invasora.

E. histolytica puede causar inmunosupresión mediante citotoxicidad y sus actividades fagocíticas (48), y mitógenas (49). La activación policlonal de los linfocitos efectuada por las amibas se ha señalado como un factor depresor de la RI. Existen datos preliminares de inmunosupresión tanto de la respuesta de inmunidad celular como de la humoral por acción de extractos amibianos (50). Es posible que la sustancia o sustancias mitógenas de la amiba afecte la actividad y la regulación de las diferentes poblaciones celulares linfoides (49). El efecto supresor también puede estar mediado por el deterioro en la captación de antígenos por los macrófagos, debido a las propiedades citotóxicas o citopáticas de los componentes amibianos (51), o a efectos inhibitorios de la amiba sobre las células fagocíticas (52, 53).

El parásito parece ejercer un efecto modulador sobre los macrófagos y las células T, lo que seguramente favorece su supervivencia en el hospedero. Así, se ha demostrado experimentalmente, que inducen una depresión cíclica en la síntesis de ADN de células de bazo de individuos infectados, así como de la interleucina (IL)-2. Estas alteraciones celulares pueden facilitar

que el protozario invada al hospedero (54).

En apoyo de la participación de la IMC en amibiasis se ha demostrado que la activación de macrófagos requiere tanto de la célula T de ayuda de tipo 1 (Th1), como de IFN- γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral (TNF)- β , necesarios para una IMC efectiva contra la amiba. El papel de las citocinas producidas durante la infección amibiana ha sido abordado y se ha determinado que el TNF- α juega también un papel relevante, ya que su aumento promueve la actividad del macrófago para destruir a las amibas, mientras que los niveles reducidos pueden favorecer el desarrollo de granulomas amibianos. El estímulo que la amiba ejerce sobre el macrófago resulta en la producción de PGE2, que ejerce un efecto supresor sobre la producción de TNF- α (55).

Algunas moléculas amibianas han manifestado efectos sobre la síntesis de las citocinas. Así, la proteína de superficie amibiana de 220 kDa inhibe la proliferación de células de bazo, aunque estimula la secreción de IL-4 e IL-10 (56). Estas interleucinas pueden también suprimir la función de los macrófagos. Asimismo, la infección amibiana además de producir citocinas derivadas de células T de ayuda de tipo 2 (Th2), también se asocia con supresión de un citocina derivada de células Th1, el IFN- γ que activa macrófagos (57).

Todos estos factores pueden participar en la supresión de la IMC durante el AHA. En la amibiasis invasora, la producción de PGE2 puede regular a las células T inhibiendo su proliferación (43) y la producción de las citocinas derivadas de Th1, específicamente, IL-2 e IFN- γ (58). Es decir, el parásito manipula la función de las células T y macrófagos con el objeto de aumentar su supervivencia dentro del granuloma hepático. Además, como se mencionó, las amibas son capaces de afectar negativamente la expresión de moléculas del MHC de tipo I (Ia) en el macrófago, inhibiendo posiblemente su actividad de célula presentadora de antígeno y la activación de las células T (44).

A pesar de no contar con el modelo experimental adecuado, se han realizado algunos experimentos de transferencia de células (transferencia adoptiva) que han contribuido a la comprensión de la IMC en amibiasis. Desde los estudios iniciales de Swartzwalder y Avant (59), donde se advirtió que la infección amibiana confería a los perros un alto grado de inmunidad, y que este se podía transferir a otros perros a

través de sangre completa. Sin embargo, no era posible precisar si la protección observada se debía a la presencia de anticuerpos o células sensibilizadas en la sangre transferida. Se han efectuado ensayos similares en otros animales de experimentación, transfiriendo células de exudado peritoneal obtenidas de hámsters infectados o vacunados contra antígenos amibianos a animales normales, percibiéndose cierto grado de protección. Al parecer, es el linfocito T la célula implicada en la transferencia de resistencia, como lo indica su respuesta al tratamiento con suero antitímocito y complemento. Es necesario llevar a cabo más investigaciones sobre transferencia adoptiva para establecer claramente el papel de los linfocitos T y el anticuerpo en protección, usando modelos de amibiasis intestinal en ratones, donde es posible contar con cepas susceptibles genéticamente puras (C3H/HeJ) (60).

Por todo lo anterior, es factible que la protección se pueda adquirir por medio de vacunación con antígenos amibianos solos o asociados a adyuvantes inocuos que incrementen la IMC. En la actualidad no se sabe si la IMC adquirida protege sólo contra la amibiasis extraintestinal o si también proporciona resistencia sobre la amibiasis intestinal. La recurrencia de la amibiasis intestinal sintomática en áreas endémicas parece indicar que este tipo de inmunidad no es particularmente efectivo para la prevención consistente de la reinvasión intestinal por *E. histolytica*.

Diagnóstico de laboratorio

En el laboratorio el diagnóstico de la amibiasis aguda, se lleva a cabo por la observación microscópica de extensiones de moco sanguinolento teñido, o el examen directo de raspados de áreas ulceradas en el colon. En aspirados de absceso hepático es posible apreciar trofozoitos típicos. El pus frecuentemente tiene una apariencia típica rojiza-café que semeja una "salsa de anchoas". El cultivo de *E. histolytica* no es de ayuda en el diagnóstico, debido particularmente al tiempo que toma el aislamiento y caracterización del protozoario. Asimismo, en las heces es posible identificar a la amiba por medio de PCR (61); sin embargo, la técnica es compleja y accesible solamente a laboratorios de investigación o especializados.

En el estado de portador intestinal, el trofozoito

activo generalmente se encuentra ausente, pero se presenta la forma enquistada que facilita la transmisión de la enfermedad. Aunque la demostración de la amiba activa o de los quistes es la mejor forma de hacer el diagnóstico definitivo, la determinación de antígeno en heces es de gran ayuda. En el siglo pasado se desarrolló un método de ELISA para demostrar la presencia de antígeno amibiano en heces, usando para tal propósito anticuerpos monoclonales con especificidad para un antígeno de *E. histolytica*. (62). El método usa placas sensibilizadas con un anticuerpo policlonal anti-*E. histolytica* que atrapa los antígenos de la amiba presentes en las heces. En una segunda fase, se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-*E. histolytica* con especificidad para un antígeno exclusivo de este protozoario, el cual se encuentra marcado con una enzima. En la fase final, se adiciona el sustrato correspondiente que, en casos positivos, al encontrarse con el anticuerpo monoclonal forma una solución colorida. La intensidad de color, dependiente de la cantidad de antígeno amibiano, se evalúa por espectrofotometría. Asimismo, por una metodología similar se ha desarrollado un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que utiliza anticuerpos monoclonales contra la lectina-Gal y que es capaz de distinguir cepas patógenas de no patógenas (63).

En la amibiasis invasora el reconocimiento de anticuerpos circulantes es importante para el diagnóstico. En casos de AHA y otras formas severas de infección por *E. histolytica*, la frecuencia de reacciones positivas usualmente excede el 90%. Las técnicas empleadas para la determinación de anticuerpos IgM e IgG específicos en el suero de pacientes son: inmunodifusión en gel, fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, aglutinación de látex, contraelectroforesis, y ELISA (64). De estas, la de ELISA es de gran utilidad ya que, si se cuenta con el antígeno amibiano apropiado, puede llevarse a cabo con gran rapidez con resultados específicos y sensibles.

La determinación de IgAs en saliva de individuos con amibiasis intestinal ha mostrado ser de gran ayuda, desafortunadamente no se ha popularizado debido a que no existen equipos comerciales. El primer reporte se llevó a cabo en 233 niños escolares, usando el método de ELISA con un antígeno de membrana de *E. histolytica*. El ensayo mostró una gran sensibilidad (85%) y

especificidad (98%) (65). La técnica ha sido de gran utilidad y se ha innovado con antígenos purificados de *E. histolytica* (66, 67).

La IgAs de saliva de pacientes con amibiasis intestinal también se ha investigado por medio de técnicas especializadas de inmunotransferencia (*Western blot*); por esta razón no se encuentra accesible a laboratorios clínicos. El método permite determinar las masas moleculares de los antígenos que reaccionan con las muestras en estudio. La saliva de pacientes con amibiasis intestinal identifica antígenos de *E. histolytica* con masas moleculares que oscilan entre 170 y 24 kDa, algunos de las cuales son reconocidos también por la de sujetos sanos. Sin embargo, la saliva de pacientes con amibiasis intestinal distingue con mayor frecuencia (>90%) moléculas de 170, 125, 46 y 37 kDa. La reactividad hacia la molécula de 170 kDa corresponde a la lectina-Gal, específica de *E. histolytica* (68).

En resumen, los avances en el conocimiento de la RI en individuos infectados con *E. histolytica* ha facilitado la identificación de antígenos relevantes tanto en la estimulación de la RI, en particular la secretoria, como en la inducción de la enfermedad. Los hallazgos obtenidos han facilitado información que seguramente permitirá el desarrollo, en un futuro mediato, de una vacuna en contra de la amibiasis, enfermedad que como ya mencionamos afecta a una parte importante de la población mundial.

Correspondencia: Dr. Librado Ortiz-Ortiz, ULA-Extensión Portuguesa. Tel: 0414 577 1121; telefax: (0257) 253 4126; e-mail: libradis1@cantv.net

Referencias

- Walsh, J.A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8:228-238.
- Kretschmer, R.R. 1990. History of amebiasis. En *Amebiasis: Infection and Disease by Entamoeba histolytica*. R.R. Kretschmer, editor. CRC Press, Boca Raton, FL, 2-10.
- Bogitsh, B.J., Chang, T.C. eds. 1990. *Human Parasitology*. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Adams, E.B., MacLeod, I.N. 1977. Invasive amebiasis. II. Amebic liver abscess and its complications. *Medicine* 56:325-334.
- Ravdin, J.I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: Studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8:247-260.
- Espinosa-Castellano, M., Martínez-Palomo, A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:318-331.
- Tschopp, J., Nabholz, M. 1990. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8:279-302.
- Petri, W.A., Smith, R. D., Schlesinger, P.H., Murphy, C.F., Ravdin, J.I. 1987. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80:1238-1244.
- Leippe, M. 1997. Amoebapores. *Parasitol. Today* 13:178-183.
- Que, X., Reed, S.L. 1997. The role of extracellular cysteine proteinases in patogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol. Today* 13:190-194.
- Tannich, E., Horstmann, R.D., Knobloch, J., Arnold, H.H. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5118-5122.
- Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F., Martínez-Palomo, A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117:81-88.
- Sepúlveda, B., Martínez-Palomo, A. 1982. Immunology of amebiasis by *Entamoeba histolytica*. En *Immunology of parasitic infections*. S. Cohen, K.S. Warren, eds. 2a. ed. Blackwell, Oxford, 170-178.
- Kretschmer, R. R. 1984. Immune phenomena in amebiasis. *Surv. Immunol. Res.* 3:1-6.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnuck, C.C. 1978. A new medium of the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:431-432.
- Thompson, P.E., Graedel, S.K., Schneider, C.R., Stucki, W.P., Gordon, R.M. Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. *Bull. WHO* 39:349-352.
- Mann, B.J., Burkholder, B.V., Lockhart, L.A. 1997. Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with *Salmonella* expressing the galactose N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* 15:659-663.
- Zhang, T., Stanley, S.L. 1996. Oral immunization with an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* expressing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein induces an antiamebic immune response and protects gerbils from amebic liver abscess. *Infect. Immun.* 64:1526-1531.
- Ortiz-Ortiz, L., Capín, R., Capín, N.R., Sepúlveda, B., Zamacona, G. 1978. Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. *Clin. Exp. Immunol.* 34:10-18.
- Gutiérrez-Kobeh, L., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R. 1997. A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 83:234-241.
- Walderich, B., Weber, A., Knobloch, J. 1997. Sensitivity of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* patient isolates to human complement. *Parasite Immunol.* 19:265-271.
- Calderon, J., Avila, E.E. 1986. Antibody-induced caps in *Entamoeba histolytica*: isolation and electrophoretic análisis. *J. Infect. Dis.* 153:927-932.
- Martínez-Cairo, S., Gorab, M., Muñoz, O., Reyes, M.

1979. Coproantibodies in intestinal amebiasis. Arch. Invest. Méd. México. 10:121-125.
24. Acosta, G., Campos, R., Barranco, C., Isibasi, A., Kumate, J. 1983. Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *E. histolytica*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 409:760-765.
25. Carrero, J.C., Díaz, M.Y., Viveros, M., Espinoza, B., Acosta, E., Ortiz-Ortiz, L. 1994. Human secretory immunoglobulin A anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. Infect. Immun. 62:764-767.
26. Carrero, J.C., Petrossian, P., Acosta, E., Sánchez-Zerpa, M., Ortiz-Ortiz, L., Laclette, J.P. 2000. Cloning and characterization of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by human secretory IgA antibodies. Parasitol. Res. 86:330-334.
27. Soong, G., Kain, K., Abd-Alla, M., Jackson, T.F.H.G., Ravdin, J.I. 1995. A recombinant cysteine-rich section of *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin in efficacious as a subunit vaccine in the gerbil model of amebic liver abscess. J. Infect. Dis. 171:645-651.
28. Ravdin, J.I., Abd-Alla, M., Welles, S.L., Reddy, S., Jackson, T.F.H.G. 2003. Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. Infect. Immun. 71:6899-6905.
29. Arellano, M.T., Ortiz-Ortiz, L. 1974. Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Méd. México 5:487-490.
30. Harris, W.G., Friedman, M.J., Bray R.S. 1978. Serial measurement of total and parasite-specific IgE in an African population infected with *E. histolytica*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:427-430.
31. Gil-Recasens, M.E., Cats, S., López-Osuna, M., Rosenstein, Y.J., Romo, R., Cervera, J., Kretschmer, R.R. 1984. Increased leukocyte histamine release by *E. histolytica* antigens in patients with amoebic abscess of the liver. Parasite Immunol. 6:211-216.
32. Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor, J., Gutiérrez, G., Ortiz-Ortiz, L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 50:412-419.
33. Kretschmer, R.R., Sepúlveda, B., Almazán, A., Gamboa, F. 1972. Intradermal reactions to an antigen (histolyticin) obtained from axenically cultivated *E. histolytica*. Trop. Geog. Med. 24:275-281.
34. Miller, M.J., Scott, F. 1970. The intradermal reaction in amebiasis. Can. Med. Assoc. J. 103:253.
35. Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B., Capín, N.R. 1975. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin. Immunol. Immunopathol. 4: 127-134.
36. Cantor, F.S. 1975. Infection, anergy and cell-mediated immunity. N. Engl. J. Med. 292:629-633.
37. Landa, L., Capín, R., Guerrero, M. 1976. Estudios sobre inmunidad celular en la amebiasis invasora. En Proceedings of the International Conference on Amebiasis. B. Sepúlveda, L.S. Diamond, eds. IMSS, México. 654-660.
38. González-Mendoza, A., Aguirre, García, J. 1971. Micosis oportunistas en amebiasis invasora. Arch. Invest. Méd. México 2:321-326.
39. Chappel, H., Haeney, M., Misbah, S., Snowden, N. 2006. Clinical Immunology. Blackwell, Malden, Massachusetts, 47.
40. Capín, R., González-Mendoza, A., Ortiz-Ortiz, L. 1980. Disminución de la actividad del sistema fagocítico mononuclear en hámsters infectados con *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. México 11:235-240.
41. Denis, M., Chadee, K. 1988. In vitro and in vivo studies of macrophage function in amebiasis. Infect. Immun. 56:3126-3131.
42. Wang, W., Chadee, K. 1995. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-Ab mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. Infect. Immun. 63:1089-1094.
43. Belley, A., Chadee, K. 1995. Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation. Parasitol. Today 11:327-334.
44. Salata, R.A., Pearson, R.D., Ravdin, J.I. 1985. Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoeba by activated macrophage. J. Clin. Invest. 76:491-499.
45. Ghadirian, E., Kongshavn, P.A.L. 1984. Effect of silica on resistance of mice to *Entamoeba histolytica* infection. Infect. Immun. 45:399-405.
46. Stulver, P.C., Goud, T.J.L.M. 1978. Corticosteroids and liver amoebiasis. Br. Med. J. 2:394-398.
47. Ghadirian, E., Meerovitch, E. 1981. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscess and metastatic foci in hamsters. Parasite Immunol. 3:329-338.
48. Jarumilinta, R., Kradolfer, F. 1964. The toxic effect of *Entamoeba histolytica* on leukocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58:375-380.
49. Capron, A., Camus, D. 1979. Immunoregulation by parasite extracts. Springer Semin. Immunopathol. 2:69-74.
50. Carvajal, R., Ruiz, B., Barjau, E. 1983. Immunosuppressive effect of *Entamoeba histolytica* extract on hamsters. Z. parasitenkd. 69:183-188.
51. López-Revilla, R., Said-Fernández, S. 1980. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: hemolytic activity of trophozoites homogenates. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 29:209-215.
52. Capín, R., González-Mendoza, A., Ortiz-Ortiz, L. 1980. Disminución de la actividad del sistema fagocítico mononuclear en hámsters infectados con *Entamoeba histolytica*. Arch. Inv. Méd. México 11:235-240.
53. Kretschmer, R.R., Collado, M.L., Pacheco, M.G., Salinas, M.C., López-Osuna, M., Lecuona, M., Castro, E.M., Arellano, J. 1985. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. Parasite Immunol. 7:527-531.
54. Ghosh, P.K., Castellanos-Barba, C., Ortiz-Ortiz, L. 1995. Intestinal amebiasis: cyclic supresión of the immune response. Parasitol. Res. 81:475-480.
55. Campbell, D., Chadee, K. 1997. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune responses. Parasitol. Today 13:184-190.
56. Talamas-Rohana, P., Schlie-Guzmán, M.A. Hernández-Ramírez, V.I., Rosales-Encinas, J.L. 1995. T-cell suppression and selective in vivo activation of Th2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. Infect. Immun.

63:3953-3958.

57. Salata, R.A., Martínez-Palomo, A., Canales, L., Murria, H.W., Treviño, N., Ravdin, J.I. 1990. Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune serum. *Infect. Immun.* 58:3941-3946.
58. Betz, M., Fox, B.S. 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th1 lymphokines. *J. Immunol.* 146:108-113.
59. Swartzwelder, J.C., Avant, W.H. 1952. Immunity to amebic infection in dogs. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1:567-572.
60. Ghosh, P.K., Mancilla, R., Ortiz-Ortiz, L. 1994. Intestinal amebiasis: histopathological features in experimentally infected mice. *Arch. Med. Res. México.* 25:297-302.
61. Abd Alla, M.D., Jackson, T.F.G.H., Soong, G.C., Mazanec, M., Ravdin, J. 2004. Identification of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin epitopes recognized by human immunoglobulin A antibodies following cure of amebic liver abscess. *Infect. Immun.* 72:3974-3980.
62. Merino E., Glender, W., Del Muro, R., Ortiz-Ortiz, L. 1990. Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. *J. Clin. Lab. Anal.* 4:39-42.
63. Petri, W.A., Jackson, T.F.G.H., Gatheram, V., Kress, K., Saffer, L.D., Snodgrass, T.I., Chapman, M.D., Keren, Z., Mirelman, D., et al. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to galactose-specific adherence lectin. *Infect. Immun.* 58:1802-1806.
64. Sepúlveda, B. 1980. Immunology of amebiasis. *En, Molecules, Cells, and Parasites in Immunology.* C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz-Ortiz y M. Sela., eds. Academic Press, New York, 163-177.
65. Del Muro, R., Acosta, E., Merino, E., Glender, W., Ortiz-Ortiz, L. 1990. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *J. Infect. Dis.* 162:1360-1364.
66. Kelsall, B.L., Jackson, T.F.G.H., Gatheram, V., Sails, S.B., Vaithilingum, M., Pearson, R.D., Ravdin, J.I. 1994. Secretory immunoglobulin A antibodies to galactose-inhibitable adherence protein in the saliva of patients with amebic liver disease. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 51:454-459.
67. Barbosa-Sabanero, G., Avila, E.E. 2004. Recognition of *Entamoeba histolytica* 115-kDa surface protein by human secretory immunoglobulin A antibodies from asymptomatic carriers. *J. Parasitol.* 90:373-378.
68. Ortiz-Ortiz, L., Mora, N., Zambrano-Villa, S.A., Carrero, J.C., Sánchez-Zerpa, M., Osuna, A. y Rosales-Borjas, D.M. 1998. Secretory immune response in patients with intestinal amoebiasis. *Parasite Immunol.* 20:503-507.