

3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

HACIA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA VS. ENTAMOEBA HISTOLYTICA; DOS ACERCAMIENTOS EXPERIMENTALES.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
ANA PAULINA CONTRERAS ROJAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO CESAR CARRERO SANCHEZ

MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Agradezco a todos los integrantes del jurado que me han ayudado, asesorado y que han tenido mucha paciencia. Dra. Gloria Vega Robledo, Dr. Juan Pedro Laclette San Román, Dr. Rafael Camacho Carranza, Dr. Julio César Carrera Sánchez y Mtro. Alfonso Olivos García.

Dedicatoria

A mi madre Lady Naty, quien me ha enseñado la fortaleza del espíritu y el camino hacia el éxito con la tolerancia y la paciencia de lo que puedo llamar "mi madre".

A mi padre José Luis "Fuego", Dios me honró al ser tu hija.

A mi hermano "Picachu", eres el tesoro más grande que he recibido de la vida...no solo hedonista sino también...virtuoso.

A mis abuelos, quienes son la base de todos mis logros.

A mi Hámster, por tu paciencia y tolerancia durante el tiempo que compartimos juntos.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma mater.

A el Instituto de Investigaciones Biomédicas porque me privilegió en la enseñanza.

A el Dr. Juan Pedro Laclette San Román por su gran apoyo y su asesoría.

A el Dr. Julio César Carrero Sánchez por ser un gran tutor y que siga formando excelentes investigadores que serán su gran satisfacción y su retribución.

A el Atro. Alfonso Olivos García y Mario Nequiz Avendaño del Departamento de Medicina Experimental del Hospital General del laboratorio del Dr. Ruy Pérez Tamayo, por proporcionarnos las amibas. Gracias Alfonso por tu ayuda y enseñanza en la metodología de infección en ambos modelos y por tu amistad en todo momento.

A el Dr. Gerardo Arrellín y su equipo por su gran apoyo y toda su gentileza.

A la Dra. Ana María Cevallos Gaos, a quien le debo parte fundamental de las bases de mi formación y sobretodo por su calidad humana.

A el Maestro Don Francisco Trijo por la gran deferencia de brindarme un espacio de su valioso tiempo siempre que se lo solicité.

A la Dra. Robin Hudson, de quien reconozco su gran humanismo.

A los doctores Raúl Mancilla, Javier Espinosa, Karen Manoutcharian y Goar Gervokian, por abrirme las puertas de su laboratorio.

A todos mis profesores, sin excluir a ninguno que han sido, la base de toda mi formación y a los cuales siempre dispensaré mi agradecimiento y que nunca olvidaré: Don Wenceslao, Don Miguel, Don Eduardo, Doña Raquel, Doña Imelida, Don Roberto, Don Rafael, Don Francisco y Don Julio Cesar.

A mi primer tutor del Instituto...Hugo, por recibirme de manera desinteresada antes de pertenecer al instituto y por tu amistad.

A mis amigos de los laboratorios, técnicos (en especial Lorena, Julianita, Don Miguel e Ismael), de intendencia (Angeles y Doña Mago), secretarías y todos aquellos que siempre estuvieron presentes cuando los necesité.

A mis condiscípulos, compañeros de pupitre, en especial mis amigos biomédicos, de los cuales siempre tuve un aliento ante los problemas y que nunca los olvidaré, ya que forman una parte fundamental de mi tiempo al igual que lo formo yo para cada uno de ustedes y que esperamos encontrarnos en la meta del éxito, que creo todos vamos a lograr. Siempre recordaré a Chi, Raúl, Chela, Haydée y Lalo con quienes conviví la rutina y las situaciones especiales.

A Joe, al idealismo y la fantasía.

INDICE

I. Introducción	1
i. Historia de la Amibiasis	1
ii. Taxonomía	2
iii. Morfología	4
a) Trofozoíto	
a.1 Citoplasma del trofozoíto	
a.2 Núcleo del trofozoíto	
b) Quíste	
iv. Ciclo de Vida	6
v. Metabolismo	8
vi. Biología Molecular	8
vi.1. Genoma amibiano	
vi.2. Dos Especies	
vi.3. Proteínas del Citoesqueleto	
vi.4. Moléculas de Superficie	
vi.5. Proteínas con Secuencias Repetidas	
vi.6. Otros Genes	
vii. Proteínas Asociadas a Virulencia	12
viii. Epidemiología	14
ix. Patología	15
ix.1. Infección Asintomática	
x.2. Infección Sintomática	
ix.3. Absceso hepático amibiano	
x. Inmunidad de la Mucosa Intestinal	17
a. Respuesta Inmune Humoral y Celular	
b. Funciones Mayores del Sistema Inmune Intestinal	
c. Absorción de Antígeno	
d. Transporte y Presentación de Antígeno	
e. Procesamiento de Ag y Presentación por Células Epiteliales Intestinales (CEI)	
f. Interacción de las CEI con CD4+	
g. Influencia de la Polaridad de las CEI en la Presentación de Antígenos Mediante Moléculas de MHCII	
h. Respuesta Inmune en Superficie de Mucosa, IgA Secretora, Células T Efectoras	
xi. Vacunas	22

	Vacuna	
	Clasificación y tipos de vacunas	
	Adyuvantes	
	Vacunas de Mucosa	
	Actividad Adyuvante de la Toxina del Cólera	
	Tolerancia vs regulación cruzada	
	Plantas Transgénicas	
	Tolerancia Oral	
	Vacuna vs Amibiasis	
	Inmunidad vs <i>Entamoeba histolytica</i>	
	Respuesta Secretora en la Amibiasis Intestinal	
	Candidatos a Vacuna	
	a) SREHP	
	b) Lectina de unión a Gal/GalNAC	
	c) CREHP	
	d) Otras Proteínas	
xii.	Phage Display	34
	1) Características generales	
	2) Bibliotecas de fagos para el mapeo de epítomos y el desarrollo de vacunas	
	3) Fagos como acarreadores inmunogénicos para vacunación	
II.	Hipótesis	37
III.	Objetivos	38
	General	
	Específicos	
IV.	Materiales y Métodos	39
	• Elaboración de la construcción para expresión	
	• Inducción de la proteína recombinante	
	• Purificación de la Proteína Recombinante CREHP-CtxB	
	• Funcionalidad de la subunidad B de la toxina del cólera	
	• Cultivo y Cosechamiento de <i>E. histolytica</i>	
	• Ratones	
	• Modelo de Amibiasis Intestinal Experimental en Ratones C3H/HeJ	
	• Inmunización de Ratones con CREHP-CtxB	
	• Infección Intracecal de los Ratones con Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y Análisis Histopatológico de los Ciegos	
	• Ensayos de ELISA	
	• Ensayos de Proliferación Celular	

- ♦ Antígeno Total de Amiba
- ♦ Sueros de Pacientes con Absceso Hepático Amibiano (AHA)
- ♦ Western blot de Sueros de Pacientes con AHA contra Antígeno Total de *E. histolytica*
- ♦ Bioselección
 - Titulación de los Fagos
 - Amplificación de los Fagos
- ♦ Caracterización de las Clonas Obtenidas por Bioselección
 - A. Amplificación de las Placas
 - B. Purificación de ADN de Cadena Sencilla y Secuenciación
 - C. Análisis Computacional de Secuencias de ADN de Cadena Sencilla

V. Resultados

48

- ♦ Elaboración de la Construcción para Expresión
- ♦ Purificación de la Proteína Recombinante CREHP-CtxB
- ♦ Funcionalidad de la Subunidad B de la Toxina del Cólera (CtxB)
- ♦ Modelo de Amibiasis Intestinal Experimental en Ratones C3H-HeJ
- ♦ Evaluación de la Respuesta Inmune Secretora (IgA) por Ensayos de ELISA
- ♦ Evaluación de la Respuesta Sistémica (Inmunoglobulinas Totales, IgG e IgM) por Ensayos de ELISA
- ♦ Ensayos de protección de ratones con CREHP-CtxB
- ♦ Ensayos de proliferación celular
- ♦ Selección de Sueros de Pacientes con AHA por Western blot para Phage Display
- ♦ Aislamiento e Identificación de Posibles Péptidos Protectores por Phage Display Utilizando Sueros de Pacientes con AHA
- ♦ Caracterización de las Clonas de Fagos a través de la Secuenciación de ADN de Cadena Sencilla

VI. Discusión y Conclusiones

65

VII. Referencias

70

I. INTRODUCCIÓN

I. HISTORIA DE LA AMIBIASIS

En 1875¹ en la ciudad de San Petersburgo, Fedor Löch describió por primera vez a través de una autopsia un caso de fatal disentería humana en el que se identificó a la amiba. Löch pudo infectar a un perro con este organismo, sin embargo al no lograr reproducir la enfermedad no pudo relacionarla con la amiba.

En 1890, William Osler² reportó un caso letal de un hombre joven que desarrolló tanto disentería como absceso hepático. Un año más tarde, Councilman y Lafleur³ dirigieron un estudio detallado de pacientes que sufrían disentería amibiana y absceso hepático. Ambos confirmaron el papel de la amiba e introdujeron los términos "**disentería amibiana**" y "**absceso hepático amibiano**"

En 1905, Schaudinn logró diferenciar *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba coli*.⁴ En 1913, Walker y Sellards establecieron definitivamente la patogenicidad de *E. histolytica* por experimentos realizados en humanos voluntarios, a los cuales se les daban quistes en el alimento⁵. En 1925, Brumpt sugiere por primera vez que las diferencias en la sintomatología y la distribución global de la amibiasis invasiva se debía a la existencia de dos especies de amiba, las cuales eran morfológicamente indistinguibles, pero cada una tenía un potencial patogénico diferente. Él sugirió que la amiba patógena fuera denominada *Entamoeba dysenteriae* y la amiba no patógena *Entamoeba dispar*. Sin embargo, la propuesta de Brumpt tuvo poco soporte ya que no pudo distinguir morfológicamente a ambas especies además de que existían evidencias de que quistes provenientes de portadores asintomáticos podían producir la infección experimentalmente. Pero cobró fuerza en el momento en el que Sargeant y colaboradores^{6,7} pudieron distinguir las cepas patógenas de amiba de las no patógenas con base en la clasificación de isoenzimas. A partir de entonces se han encontrado otros marcadores para lograr distinguir las cepas como la expresión diferencial de algunos factores de virulencia y la amplificación de secuencias específicas.

En 1993⁸, Diamond y Clark utilizaron toda la evidencia bioquímica, inmunológica y genética para distinguir a las cepas patógenas y no patógenas de la amiba, separando formalmente a *E. histolytica*, la patógena⁴, de *E. dispar*, la comensal⁹.

Finalmente en 1997, el comité de La Organización Mundial de la Salud (WHO) reunido en la ciudad de México respaldó la separación de las cepas patogénicas de las no patogénicas en dos especies diferentes.^{11,12}

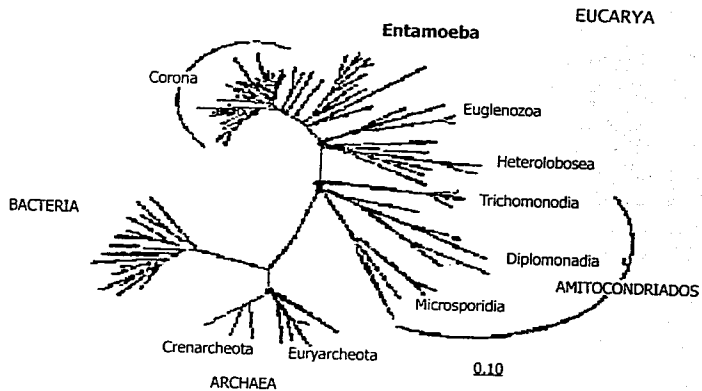
II. TAXONOMÍA

E. histolytica era considerada por algunos autores como un eucarionte de evolución temprana ya que aparentemente carece de mitocondria, peroxisomas, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi además de un metabolismo glicolítico típico. Muchas de estas características se asemejan a las de otros protistas amitocntrados conocidos como Archezoa¹⁰. Sin embargo, árboles filogenéticos basados en la subunidad pequeña del RNA ribosomal ubicaron a la amiba como un organismo más reciente a otros que tienen organelos y metabolismo típicos de eucariontes^{10,11} (Fig. a). En el mismo sentido, recientemente se ha demostrado la existencia de organelos que parecen corresponder a una mitocondria rudimentaria, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, así como genes involucrados en el transporte vesicular,¹² lo que hace dudar acerca de la veracidad de su agrupación dentro de los eucariontes de evolución temprana.

En 1998, Cavalier-Smith revisaron la posición de *E. histolytica* y la colocaron de la siguiente forma¹³:

Reino	Protozoa
Subreino	Neozoa
Superclase	Sarcomastigota
Phylum	Amoebozoa
Subphylum	Conosa

**Figura a. Arbol Filogenético
basado en ADN tipo 16S**



III. MORFOLOGÍA

Durante el ciclo de vida de *E. histolytica* se observan dos formas: trofozoíto y quiste.

a) Trofozoíto

Es la forma móvil e invasora del parásito con tamaño que varía desde 12 a 60 μm de diámetro.

Motilidad. En aislados frescos, *E. histolytica* se mueve a una velocidad de 5 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Los trofozoítos se mueven mediante la emisión de pseudópodos, protusiones citoplasmáticas que se pueden formar en cualquier punto de la superficie del organismo.

Los trofozoítos que se mueven de manera activa, tienen una polaridad o dirección bien definida. El ectoplasma fluye para formar el pseudópodo, seguido del endoplasma. Las extensiones del pseudópodo van acompañadas de reciclamiento del citoplasma y la formación de un apéndice posterior, llamado uroide. El uroide, por algún mecanismo todavía no conocido, acumula ligandos como bacterias, lectinas o anticuerpos para después desprenderlos de la amiba sin causarle a ésta algún problema. Fenómeno conocido como camping.

a.1) Citoplasma del trofozoíto

En el citoplasma se puede diferenciar al ectoplasma, que es claro y refráctil, separado del endoplasma que contiene abundantes vacuolas, lo que le confiere una apariencia granular y oscura.

Las vacuolas contienen bacterias o detritos que fueron ingeridos por la amiba y en el caso de organismos provenientes de pacientes con disentería se pueden observar además eritrocitos.

Cuando se utilizan tinciones específicas para ADN, es posible identificar un cuerpo de 2 μm de diámetro que contiene ADN y que corresponde a la mitocondria rudimentaria o mitocondrion¹⁹, los ribosomas parecen estar ordenados en arreglos de hélice.

El citoesqueleto está constituido por microfilamentos que generalmente se localizan adyacentes a la membrana plasmática en los sitios de unión de la amiba con el sustrato y en donde se forman canales fagocíticos.

La presencia de genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte vesicular y maquinaria para trasladarse así como imágenes de ultraestructura sugieren la existencia del retículo endoplásmico y aparato de Golgi.¹²

a.2) Núcleo del trofozoíto

El núcleo no es visible del todo, a penas se logra observar un anillo granular en las amibas no teñidas. Cuando se tiñen con hematoxilina, tricromo o la tinción de Lawless se observan detalles de la estructura nuclear. El núcleo es esférico de 4 a 7 μm de diámetro. La membrana nuclear se puede definir nítidamente y su cara interna está rodeada por cromatina empaquetada formando gránulos. En la parte central del núcleo hay una pequeña masa de cromatina, el cariosoma (fig. b).

b) Quiste

Por mecanismos aún desconocidos los trofozoítos se pueden condensar y formar masas redondas u ovaladas con una pared muy delgada denominados quistes inmaduros o prequistes. Los prequistes de la amiba son incoloros, más pequeños que los trofozoítos y más grandes que los quistes. Se pueden distinguir porque presentan un solo un núcleo y carecen de la pared característica del quiste. El citoplasma generalmente contiene depósitos de glicógeno y ocasionalmente se observan cuerpos de cromatina. La morfología nuclear generalmente es confusa en ésta etapa.

Cuando los quistes maduran siguen siendo redondos u ovalados (metaquistes) con una pared refractil lisa de aproximadamente 0.5 μm de grosor. Los prequistes tienen un par de divisiones nucleares con la producción de cuatro núcleos (fig. c), en raras ocasiones se producen ocho núcleos y el tamaño de los quistes puede variar de 10 a 20 μm . de diámetro. Conforme el quiste madura, los cuerpos cromatoides que contienen ácidos ribonucleicos, ácidos deoxiribonucleicos y fosfatasas van desaparecen.

Cuando se tiñe el quiste con yodo, el citoplasma se observa desde amarillo verdoso hasta amarillo café mientras la membrana nuclear y el cariosoma se observan de color café claro. Las barras cromatoidales no se tiñen y aparecen como espacios claros en el citoplasma.

IV. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *E. histolytica* presenta ciertas peculiaridades entre las que cabe destacar: i) el hombre es el único hospedero conocido, ii) no existen reservorios ni hospederos intermedios, iii) no existen vectores, iv) se inicia con la ingesta de agua y alimentos contaminados con quistes y v) comprende cuatro etapas:

- Quiste
- Metaquiste
- Trofozoito
- Prequiste

La infección se inicia cuando el hombre ingiere alimentos o agua contaminada con quistes. El quiste, resistente a los ácidos gástricos cuando se ingiere y logra pasar hasta el intestino delgado. Algunos quistes se activan en el ambiente neutro o alcalino del intestino delgado. La pared de los quistes es digerida probablemente por las enzimas que se encuentran en el lumen del intestino. Cada uno de los núcleos del quiste se divide, dando origen a ocho amibas que siguen su camino al ciego, en donde completan su maduración y se multiplican por fisión binaria.

Cuando la amiba llega al colon, por mecanismos no muy claros, cambia su forma a esférica formando así el prequiste. La aparición de una membrana bien formada de quitina y la división nuclear da origen al quiste maduro el cual se secreta en las heces. Los quistes permanecen viables e infectivos por varios meses en el medio ambiente hasta ser consumidos por el hombre cerrando el ciclo de vida. Sin embargo, algunas veces la amiba es capaz de dañar la mucosa intestinal, perforarla y a través de circulación llegar a invadir casi cualquier órgano del ser humano (fig. d).

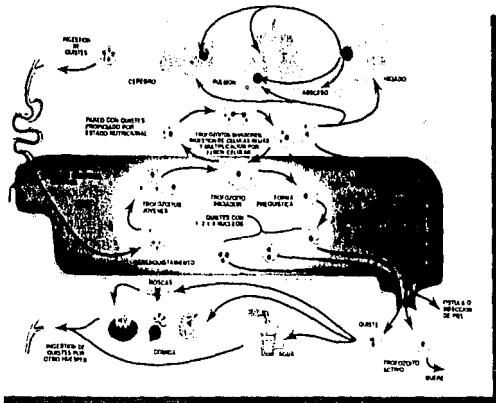


Figura b.
Trofozoito 10-20 μm diámetro.
Tricromo 100X



Figura c.
Quiste con 4 núcleos visibles.
Tricromo 100X

Figura d. Ciclo de Vida



V. METABOLISMO

La principal fuente de energía del parásito son los carbohidratos. La captación de glucosa involucra a un sistema de transporte que proporciona 100 veces más glucosa que la adquirida por endocitosis²¹. La glucosa se degrada a piruvato por la vía de Embden Meyer generando como productos finales del metabolismo anaeróbico etanol y CO₂; el lactato no se produce y no se le conoce hasta ahora una lactato deshidrogenasa. En muchas de las reacciones glicolíticas se produce pirofosfato más que ATP, para ser usado como fuente de energía.

Las amibas son fermentadoras obligadas que carecen de piruvato deshidrogenasa y enzimas para la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs.¹⁴ Las enzimas fermentadoras incluyen a la piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa, ferredoxina y alcohol deshidrogenasa que son muy similares a las enzimas equivalentes en bacterias anaerobias¹⁵. La alcohol deshidrogenasa y la ferredoxina se encuentran en el citosol¹⁶, mientras la piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa se localiza en la membrana plasmática y en la estructura citoplasmática que corresponde a la mitocondria rudimentaria¹⁷.

La síntesis de ácidos nucleicos depende de la recuperación de purinas preformadas ya que *E. histolytica* carece de la síntesis de *novo* de purinas. En cambio, pueden sintetizar bases de pirimidina de *novo*¹⁸ o también se pueden recuperar del medio.

Entre las enzimas metabólicas que se han caracterizado en *E. histolytica* y cuyos genes se han clonado se encuentran⁵²: NADPH-alcohol-desidrogenasa, aldehído-desidrogenasa, piruvato-ortofosfato-dicinasasa y dismutasa que contiene fierro (FeSOD).

VI. BIOLOGÍA MOLÉCULAR

vi.1. Genoma amibiano

Como se mencionó anteriormente, los núcleos del quiste miden de 4 a 7 µm de diámetro mientras que los del trofozoíto miden de 3 a 5µm de diámetro.

La cromatina tiene la estructura en forma de rosario, típica de eucariontes, en donde cada esfera o nucleosoma que mide 10 nm de diámetro está constituida por histonas que difieren de aquellas de los típicos eucariontes¹⁹. Por otro lado, existen las propuestas de que no toda la cromatina se organiza en nucleosomas.^{20,21,22}

La cromatina periférica se distribuye a lo largo de la capa interna del núcleo y su ADN está involucrado en la síntesis de RNA. Durante la Interfase el ADN se dispersa dentro

del núcleo. Sin embargo, antes de la división celular el ADN se concentra formando el llamado "endosoma central" y la membrana nuclear permanece intacta.

Hasta ahora siguen habiendo discrepancias en cuanto al número exacto de cromosomas; algunos grupos sugieren 5-8 cromosomas²⁴ y otros 4-5 pares de cromosomas^{25, 26}.

El contenido total de ADN indica que cada trofozoíto contiene entre 0.4 a 1.5 pg de ADN con un tamaño del genoma de aproximadamente 8.2×10^7 kb a 3.7×10^8 kb dependiendo de la metodología utilizada²⁷. Estas diferencias se pueden atribuir a diversos factores, entre ellos el ADN repetido que constituye aproximadamente el 20% del genoma, la ploidía y células multinucleadas. Contiene además 38 400 genes transcripcionalmente activos. La mayoría de los genes carecen de intrones y tienen regiones 3' y 5' no-traducidas pequeñas. En los análisis de sus promotores se encuentra la presencia de 3 motivos conservados y varias secuencias reguladoras río arriba. La transcripción de sus genes difiere de la conocida para eucariontes típicos ya que es resistente a α -amanitina (pol II).²⁷

El contenido total de G + C en el genoma es bajo, aproximadamente 22.4% en las regiones codificadoras y en las no codificadoras 33%.

E. histolytica tiene un cariotipo compuesto de 6 moléculas lineales de ADN (227, 366, 631, 850, 1112, 1361 kb) y más de 200 moléculas de ADN circular cuyos tamaños van desde 5 hasta 50 kb (el número de copias de estos elementos varía entre cepas). Cada uno está constituido por dos unidades repetidas de RNAr en posición invertida, cada unidad de ADN circular incluye los genes 16S, 5.8S y 25S que además de codificar para los transcritos ribosomales, codifica para otro transcrito de 0.7 Kb y para hemolisinas en un transcrito de 2.6 Kb. Algo de ADN extracelular se encuentra en la mitocondria rudimentaria.^{12,16,28}

vi.2. Dos especies

En 1925 Brumpt consideraba que existía tanto una especie patógena como una comensal²⁹. Desde 1978 surgieron algunos de los criterios (empleados hasta ahora) para diferenciar a ambas especies utilizando un sistema de migración de diferentes isoenzimas: hexocinasa, fosfoglucomutasa, aldolasa, acetilglucosaminidasa, peptidasa, NAD-diaforasa. Más recientemente, la división se ve reforzada por diferencias de secuencias de genes específicos³⁰, análisis de "riboprinting"^{31,32}, clonas obtenidas de librerías de ADN^{33,34} y en secuencias de genes ribosomales^{31,35,36,37}.

Se han encontrado diferencias en secuencia, niveles de transcripción y número de copias, entre ambos aislados en los genes de actina, antígenos de superficie, proteasas de cisteína, superóxido dismutasa, una serina-treonina cinasa y de amibaporo.

Por lo que en el año 1997 en la ciudad de México, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que *E. histolytica* y *E. dispar*, a pesar de ser dos especies morfológicamente iguales son genéticamente diferentes; la primera siendo la especie patógena y la segunda la especie comensal del intestino.³⁸

vi.3. Proteínas de Citoesqueleto

- **Actina.** Los genes de esta proteína fueron los primeros en ser aislados y caracterizados^{39,40}. Esta proteína además de ser la más abundante en el trofozoito, muestra 89% y 86% identidad con sus isoformas humanas citoplasmáticas y de músculo esquelético, respectivamente.
- **Miosina.** Se han identificado los genes de la cadena pesada de esta proteína^{41,42}, cuya secuencia deducida es de 2139 pb. Muestra poca identidad con las miosinas de otros protozoarios (30 a 39%) y se localiza en la parte uroidal del trofozoito, lo que sugiere su participación tanto en el movimiento como en el "capping" de moléculas extrañas.
- **Tubulina.** Se han aislado clones de ADNc y ADN genómico, las cuales contienen un ORF que codifica para una proteína de 455 aa homóloga a tubulina⁴³. En otros análisis se ha identificado la presencia de dos genes contiguos.

vi.4. Moléculas de superficie

- **Proteína Rica en Cisteínas de 29 kDa de *E. histolytica* (CREHP).** Proteína con posible actividad de hidropéroxido reductasa⁴⁴ cuya localización es controversial encontrándose tanto en la superficie^{45,46,47} como en el citosol^{48,44} de los trofozoitos, forma dímeros a través de puentes de disulfuro y oligómeros en la superficie⁴⁵. Su secuencia parcial se aisló de una librería de cADN utilizando una fracción de suero hiperinmune anti-amiba, preabsorbido para seleccionar antígenos. Sirve también para diferenciar a la especie patógena de la no patógena por inmunoblot ya que solo está presente en *E. histolytica*⁴⁶.
- **Proteína Rica en Tirosina y Asparagina de 125 kDa.** Es una proteína inmunogénica encontrada en la superficie de trofozoitos tanto de *E. histolytica*

como de *E. dispar*. Es además, una proteína polimórfica con una variabilidad del 13% entre ambas especies y del 1% entre aislados de la cepa HM1-IMSS.

- **Proteína de superficie de 60 kDa.** Identificada solo en *E. dispar*.
- **P-glicoproteínas.** Genes aislados de una librería de ADNc que codifican para estas proteínas se han identificado en cepas de *E. histolytica* resistentes a emetina.
- **Transportador de la familia ABC.** Incluye a las glicoproteínas P.
- **Proteína Rica en Serina de *E. histolytica*.**(SREHP) Es una proteína de superficie, su función no se conoce bien. Sin embargo, posee propiedades quimioatrayentes para otros trofozoítos de *E. histolytica*⁴⁹. El ADNc, obtenido de una biblioteca de ADNc de esta proteína, codifica para un péptido de 25 kDa, pero la molécula nativa migra a 47-52 kDa en SDS-PAGE debido a modificaciones post-traduccionales (fosforilación y glicosilación)⁴⁹ y a la alta hidrofobicidad de sus residuos de prolina que alteran el movimiento en el gel.

vi.5. Proteínas con secuencias repetidas

- **SREHP.** Esta proteína además pertenece al grupo de proteínas con varias secuencias repetidas de la amiba, contiene 52 serinas del total de 233 aa. Contiene múltiples repeticiones en tandem de una secuencia de 12 aa.
- **Eh20RP.** Proteína de 20 kDa, abundante en ambas especies y que contiene cuatro unidades repetidas casi idénticas de 37 residuos cada una.
- **Familia de transcritos.** Con diferencias en las regiones internas y codificadores de elementos repetidos de 8-12 aa, pertenecientes a ambas especies.

vi.6. Otros genes

Una gran cantidad de genes se han caracterizado. Entre las estrategias usadas está la selección de clonas provenientes de librerías de ADNc, tamizaje de bibliotecas con suero hiperinmune o sondas de ADN, amplificación de ADN genómico usando oligos, etc.

Entre los genes caracterizados están:⁵²

- **Ferredoxina** (6 kDa)
- **Factor de elongación 1 α** (49 kDa)
- **Proteína de unión a calcio** (15 kDa)

- **HSP70** (71.5 kDa)
- **Ubiquitina** (8.5 kDa)
- **Factor de elongación 2** (93 kDa)
- **Proteína de unión a zinc** (9 kDa)
- **Proteína cinasa p34 cdc2** (34 kDa)
- **Cinasa de treonina/serina** (47 kDa)
- **Oncogene rho** (23 kDa)
- **Oncogenes rap** (21 kDa)
- **Oncogenes ras** (21 kDa)
- **Antígeno rico en ácido glutámico** (39 kDa)
- **ATPasa transportadora de protones (subunidad catalítica)** (67 kDa)

VII. PROTEÍNAS ASOCIADAS A VIRULENCIA (fig. e)

- **Lectina de unión a galactosa (Gal/GalNAc).** Es una glicoproteína heterodimérica de 260 kDa constituida por subunidades de 170 kDa la pesada y 31-35 kDa la ligera. Existen múltiples isoformas de genes que codifican para la subunidad pesada (por lo menos 3) cuya homología oscila entre el 89.2 y 95.2% a nivel de aminoácidos. Para la subunidad ligera se han encontrado al menos 2 genes y la homología de sus productos es del 80.6% a nivel de aminoácidos.

La lectina media la adherencia de la amiba a la célula blanco incluyendo la mucosa del colon, anclándose por medio de un fosfatidilinositol de la subunidad ligera a los residuos de galactosa o N-acetil-D-galactosamina presentes en las glicoproteínas de las células blanco. Por otra parte, se considera que esta lectina es esencial para matar a las células, además de impedir la lisis por el CAM (Complejo de Ataque a Membrana).

Se ha reportado que la adherencia de *E. histolytica* es mayor que la adherencia de *E. dispar*⁵⁰. Sin embargo, esta capacidad no solo puede indicar mayor virulencia, sino también que pueda existir otra función aún no estudiada en la lectina de *E. histolytica*.

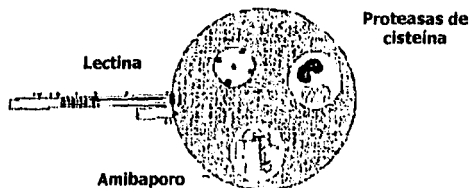
Se le ha atribuido también una función en la señalización intracelular a la cola citoplasmática de la lectina, señalización que parece ser la que controla la adhesión del trofozoíto del interior al exterior (tipo Integrina)⁵⁰.

- **Amibaporo o péptido formador de poros.** Son péptidos de 8.2 kDa constituidos por 77 aa, se han aislado tres isoformas: A, B y C. Estos péptidos tienen la capacidad de insertarse en membranas y lisar a las células. Se han encontrado dos péptidos homólogos en *E. dispar*. Sin embargo, la capacidad lítica de esta última es tres veces menor.

Los amebaporos son homólogos a muchas otras proteínas, incluyendo las saponinas (SAPS), a las proteínas citolíticas de las células T y las NK (lisinas y granulinas) las proteínas surfactantes del pulmón y las esfingomielinasas ácidas (AOAH).⁵¹

- **Proteinasas de Cisteína.** Un gran número de estas enzimas con pesos moleculares que van desde los 16-96 kDa, se han aislado de extractos de *E. histolytica*. Seis diferentes genes codifican para las proteinasas de cisteína en *E. histolytica* y cuatro análogos en *E. dispar*. Las formas predominantes son las proteinasas de cisteína maduras de 56 kDa con actividad de C3 convertasa, seguida de proteinasas de 27 a 30 kDa con actividad de histolisina. Al parecer, la acción de estas proteinasas *in vivo* es la de degradar a la matriz extracelular, facilitando la invasión por el trofozoito. Se ha sugerido que las proteinasas de cisteína expresadas por *E. histolytica* (ACP1, ACP2, ACP3, ACP5 y EhCP112) son capaces de degradar, IgA, IgG, algunas proteínas de matriz extracelular y activar complemento. Sin embargo, las proteinasas de cisteína de *E. dispar* (EdCP1, EdCP2 y EdCp3) no son capaces de hacer lo mismo y tan específicamente²³
- **Inductores de Apoptosis.** Un estudio utilizando células Jurkat y HL-60 demuestra que la apoptosis es inducida utilizando amibas intactas. Estudios en un modelo de absceso hepático amibiano (AHA) en ratón sugieren que los trofozoítos son capaces de inducir apoptosis, incluso sin involucrar a Fas/FasL o RTNF⁵⁰. Esto indica que la amiba utiliza otras vías aún no caracterizadas.

Fig. e. Representación esquemática de algunos factores de virulencia de *E. histolytica*



VIII. EPIDEMIOLOGÍA

E. histolytica es un parásito cosmopolita, endémico de varios países del tercer mundo. Es la tercera causa de mortalidad a nivel mundial por parásitos después de malaria y esquistosomiasis⁵³ y es la cuarta causa de muertes por parásitos protozoarios a nivel mundial, después de la malaria, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas⁵⁴.

Antes de la separación de las dos especies, se estimaba que aproximadamente 480 millones de personas, equivalente al 10% de la población mundial, estaba infectada con *E. histolytica* con una tasa de mortalidad de 40 000 a 110 000 personas por año⁵³. Ahora se sabe que en zonas endémicas *E. dispar* es la especie con mayor prevalencia a una razón de 10:1^{55,56}. El riesgo de que portadores asintomáticos de *E. histolytica* desarrollen la enfermedad invasiva se estimó del 10% a nivel mundial³⁴.

En Europa y Norteamérica, en donde la amibiasis invasiva es poco frecuente, los pocos casos se adjudicaban a *E. dispar* cuando en realidad la causante era *E. histolytica*. Tomando en consideración esta información, se piensa entonces que aproximadamente el 10% de los infectados lo están con *E. histolytica* (48 millones) y el resto con *E. dispar* (430 millones).

En México en el año de 1994 se tenía estimado que aproximadamente el 8% de la población mexicana ha sufrido de un episodio de infección por *E. histolytica*.

La infección ocurre vía oro-fecal, a través de agua y alimentos contaminados con quistes. Así, los portadores de quistes son la principal fuente de infección. Los grupos con mayor riesgo son los viajeros, los inmigrantes, trabajadores migradores, individuos inmunosuprimidos e individuos en instituciones mentales y prisiones.

Infecciones severas se presentan en niños de corta edad, mujeres embarazadas e individuos desnutridos ó individuos que toman corticosteroides. Curiosamente los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) no tienen un riesgo mayor de desarrollar una infección severa.

IX. PATOLOGÍA

E. histolytica deriva su nombre, por tener la capacidad de destruir casi todos los tejidos del ser humano; como la mucosa intestinal, hígado y en menor grado, cerebro piel, cartílago y hueso.

La infección intestinal por ambas puede ser desde asintomática hasta colitis aguda o fulminante con perforaciones.

ix.1. Infección asintomática

La mayoría de las infecciones asintomáticas son debidas a *E. dispar*, que vienen a ser portadores inocuos. Los portadores asintomáticos de *E. histolytica*, de los cuales hay pocos, son los de importancia en la transmisión de la enfermedad.

En un estudio epidemiológico realizado en el sur de África, se observó que el 90% de los portadores asintomáticos eliminaron la infección y sólo el 10% desarrollo colitis amibiana⁵⁷, lo que sugiere que probablemente solo ese 10% estaba infectado con *E. histolytica*.

ix.2. Infección sintomática

Se presenta dolor abdominal, evacuaciones constantes o diarrea, la cual puede ir acompañada de moco y sangre. En la mitad de los pacientes puede presentarse tenesmo.

Algunas veces hay formación de úlceras de 3-5 mm que con frecuencia están en el ciego, el recto, el colon y ocasionalmente se involucra al ileón en su parte final. Las úlceras son inicialmente superficiales, con bordes hiperémicos y una base necrótica cubierta de un exudado amarillento. Hay mucosa normal entre cada sitio de invasión.

En raras ocasiones se pueden asociar vasos sanguíneos en la base de la úlcera provocando sangrados severos. Incluso la úlcera puede llegar a perforarse causando peritonitis y en casos extremos la muerte

En especímenes quirúrgicos las úlceras tienen una apariencia ovalada y aplanada. Histológicamente hay una inflamación difusa alrededor de las ulceraciones. La lámina propia está infiltrada por células plasmáticas, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. Hay edema, hemorragia focal y frecuentemente exudado en el cual se pueden encontrar trofozoítos

La colitis amibiana fulminante es el resultado de una ulceración confluyente y necrosis en el colon. El intestino se dilata, particularmente en la porción transversal. Los pacientes se ponen febriles y muestran signos de hipovolemia y desbalance electrolítico.

Especímenes obtenidos por cirugía muestran áreas extensas de necrosis y entre ellas porciones intactas.

El ameboma o granuloma amibiano es causado por invasiones repetidas del colon con *E. histolytica* que puede complicarse con una infección piogénica. Los amebomas se pueden encontrar en el colon pero son más frecuentes en el ciego (40%) y en la unión rectosigmoide (20%). Las lesiones regularmente son únicas e involucran pequeños segmentos del colon.

Histológicamente el ameboma no es fibroso y contiene tejido granuloso con linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células gigantes. Hay ligera inflamación y mucha de la hinchazón es debida al edema. Es difícil demostrar la presencia de amibas. El tejido fibroso se forma después en un intento de cicatrización⁵⁷.

ix.3. Absceso Hepático Amibiano (AHA)

Es la forma extraintestinal más común de amibiasis. Se puede encontrar en todas las edades, pero es diez veces más frecuente en adultos que en niños y es más frecuente en hombres que en mujeres⁵⁹. Es más común en sectores pobres y en poblaciones urbanas.

Al momento en que se diagnostica a los pacientes con AHA, aproximadamente el 20% ya tiene una historia de disentería previa y alrededor del 10% tienen diarrea o

disentería en ese momento. El parásito se detecta en las heces en menos del 50% de los casos por microscopía estándar y aumenta hasta 75% si se utiliza cultivo.⁵⁸

Entre los síntomas más comunes están:

i) **Dolor.** Se localiza en la región del absceso, más comúnmente en la región baja derecha de los espacios intercostales. El dolor es intenso y constante, se irradia a la región escapular y el hombro.

ii) **Fiebre.** La fiebre varía desde 38°C hasta 40°C y permanece por períodos hasta de días.

iii) **Otros síntomas.** Anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y fatiga.

Las lesiones son únicas generalmente y muchas de ellas se localizan en el lóbulo derecho en la región posterior, externa y superior⁵⁹. La incidencia del absceso hepático amibiano en el lóbulo izquierdo va del 5 al 21% de los casos.

El absceso hepático como tal, está constituido por una pared capsular delgada con un centro necrótico compuesto de fluido espeso, una zona intermedia que contiene un grueso estroma y una zona externa que es casi tejido normal. El fluido del absceso es típicamente inodoro y bacteriológicamente estéril, aunque puede sufrir invasión bacteriana secundaria.

Bajo el microscopio, el fluido del absceso muestra detrito granular eosinofílico con pocas o ninguna célula. Las amibas se localizan en la periferia del absceso.

La mortalidad estimada del AHA es del 0.2% al 2% en adultos y más del 26% en niños.

Entre otras manifestaciones de amibiasis extraintestinal pero de muy baja frecuencia están la amibiasis cutánea, peritoneal, pericárdica, pulmonar, genital y cerebral.⁵⁷

X. INMUNIDAD DE LA MUCOSA INTESTINAL

a. Respuesta inmune humoral y celular⁶⁰

Las células inmunes en el tejido linfático asociado a mucosa (GALT) están distribuidas a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) en tres sitios generales: las placas de Peyer (incluyendo el apéndice y nódulos solitarios), la mucosa y los nodos linfáticos mesentéricos.

Las placas de Peyer constituyen la parte más importante del tejido linfoide organizado del sistema inmune y el sitio inductor de la inmunidad de las mucosas. Se localizan principalmente en el ileón pero también hay distribuidas en las otras partes del

intestino delgado y del grueso. Se estima que hay 15 placas de Peyer por centímetro cuadrado (cm²) en colon, 25 en recto y que estas disminuyen con la edad.

Las placas de Peyer contienen macrófagos, células dendríticas y células linfoides, principalmente células B (50-70%) y células T (11-40%). La capa externa de las placas de Peyer consiste de células epiteliales columnares y células M. Las células M juegan un papel importante en la captación (por endocitosis) y transporte de antígenos a los linfocitos y los macrófagos de las placas de Peyer. Las células M no tienen lisosomas y no modifican al antígeno, solo lo transportan del lumen a las otras células inmunes.

La mucosa intestinal es otro sitio importante del GALT. La lámina propia contiene macrófagos y linfocitos (B y T incluyendo células plasmáticas y células null, como las NK). Además de los linfocitos de la lámina hay linfocitos entre las células epiteliales de la superficie de la mucosa cuyo origen y naturaleza todavía no se conoce con certeza. Linfocitos circulantes se encuentran ocasionalmente en el lumen del tracto.

Los nodos linfáticos mesentéricos sirven como puntos de colección para la linfa que drena desde las vellosidades intestinales y las placas de Peyer. Los nodos linfáticos mesentéricos experimentan constantemente estimulación antigénica y contienen muchos centros germinales. La médula de los nodos linfáticos mesentéricos contiene muchas células plasmáticas maduras, mientras la corteza contiene numerosas células T.

b. Funciones mayores del sistema inmune intestinal ⁶¹

- **Exclusión inmune.** Es un proceso no inflamatorio mantenido por factores específicos (IgA, IgM) y no específicos (moco, peristaltismo).
- **Eliminación inmune.** Proceso mediante el cual los antígenos peligrosos son eliminados por anticuerpos específicos y mecanismos de defensa innata, tales como complemento, neutrófilos, macrófagos, mastocitos y otros.
- **Regulación inmune o tolerancia oral.** Es el proceso central por el cual el tracto intestinal (mayor órgano inmunológico del organismo) mantiene una homeostasis entre procesos peligrosos y no peligrosos a nivel local y sistémico.

c. Absorción de antígeno ⁶¹

Todo lo que se ingiere tiene su primer encuentro con ácidos y enzimas proteolíticas. En modelos animales se ha observado que el proceso de absorción tiene dos fases: La primera consiste en la incorporación activa del antígeno por células epiteliales intestinales. La liberación de mediadores promueve la segunda fase de la absorción en

la que se observa pérdida de las uniones herméticas entre las células epiteliales, que permiten mayor afluencia del antígeno con procesamiento local.

En condiciones normales (cuando se ingieren alimentos), tras ser presentado el antígeno a los linfocitos, ocurre la supresión de cualquier respuesta inmune. En condiciones anormales, ocurre la sensibilización y activación de una respuesta alérgica. Cuando se trata de agentes patógenos se activa la respuesta inmune que puede ser mediada por anticuerpos IgA (humoral) o por células (celular).

d. Transporte y presentación de antígeno

Para que tenga lugar la respuesta inmune frente a un antígeno, éste debe ser transportado de la luz intestinal a la placas de Peyer. Las células M son las encargadas de transportar desde el lumen y a través del epitelio tanto macromoléculas como partículas y microorganismos a las placas de Peyer. Adentro de sus vesículas endocíticas las partículas endocitadas llegan a un receptáculo que contiene linfocitos y unos pocos macrófagos con los que interactúa, siendo éste un paso importante para iniciar la respuesta inmune.

Tras el paso a través de la mucosa y procesamiento por el GALT, el antígeno es presentado a través de las moléculas MHC I y MHC II. La presentación preferente es a través de las moléculas de clase I, lo que da lugar a una activación de linfocitos T supresores CD8+ e inducción de tolerancia. Por otra parte, la presentación a través de moléculas de clase II activa los linfocitos T CD4+ con la consiguiente inducción de memoria inmunológica. Además de que existen interacciones reguladoras entre estos grupos celulares. En ausencia de señales coestimuladoras (CD28-CD80; familia B7) se induce tolerancia o anergia T.

e. Procesamiento del antígeno y presentación por Células Epiteliales Intestinales (CEI)⁶¹

Además de las células presentadoras de antígeno (CPA) clásicas como las células dendríticas, las células epiteliales intestinales también pueden presentar antígenos. En antígenos administrados oralmente sucede un proceso fisiológico que puede alterar drásticamente las propiedades químicas de éste, debido al efecto del pH bajo, de tripsina, pepsina, bilis, etc. Este procesamiento puede alterar epítopos (exponiéndolos o destruyéndolos) previo al procesamiento por las CEI.

Las CEI expresan una variedad de moléculas en su superficie apical que pueden servir como receptores de antígenos y que pueden favorecer el procesamiento de los antígenos por la vía de la endocitosis mediada por receptores. La velocidad y eficiencia de la incorporación del antígeno y el procesamiento endocítico por las CEI puede ser modulada por una variedad de mediadores de la inflamación.

La naturaleza dinámica del procesamiento del antígeno por las CEI, que puede ser modulado por la inflamación no clínicamente aparente, es una variable muy importante a considerar en la evaluación de la antigenicidad de una proteína determinada.

f. Interacción de las CEI con células TCD4+

Las células CEI están en íntimo contacto con dos poblaciones de células T, los linfocitos intraepiteliales y los linfocitos de lámina propia. Los linfocitos intraepiteliales (LIE) que migran a través de la membrana basal, interdigitando entre las CEI adyacentes a lo largo de la superficie lateral, expresan una integrina $\alpha\beta 7$ que se une a la E-cadherina expresada en CEI.

Los LIE son un grupo heterogéneo de linfocitos T cuya función en la respuesta inmune mucosa y/o homeostasis no es bien conocida. En contraste, los linfocitos de lámina propia (LLP) están por debajo de la membrana basal y logran contactar con las CEI a través de proyecciones basolaterales. Las células T CD4+ son muy importantes en el establecimiento de la tolerancia oral. Dos tercios de los LLP son T CD4+; el número es más limitado entre los LIE. Se sabe que las CEI son capaces de procesar y presentar antígeno vía HLA II (Human Leucocyte Antigens tipo II).⁶²

g. Influencia de la polaridad de las CEI en la presentación de antígenos mediante moléculas de MHC II⁶²

Las CEI son células altamente polarizadas (expresa diferentes tipos de receptores en cada región basolateral o apical, fenómeno que la caracteriza de las demás CPA)¹²⁸ con diferentes dominios apicales y basolaterales que poseen propiedades físico-químicas diferentes que las diferencia de otras células presentadoras de antígeno (CPA). *In vivo*, la expresión polarizada del complejo de histocompatibilidad humano (HLA II) y de varios receptores de superficie en la membrana basolateral, modula el procesamiento de antígenos; facilitando la incorporación del antígeno a través del contacto con los linfocitos intraepiteliales (LIE) y linfocitos de lámina propia (LLP). Por lo que este

mecanismo tiene gran importancia en la inducción de respuesta inmune frente a antígenos administrados oralmente.

En la respuesta normal fisiológica, la falta de respuesta representa un balance entre la estimulación de células T con actividad supresora *versus* células con papel potencial en la inflamación. Cuando la exposición al antígeno es muy alta el resultado entre estos dos grupos celulares depende del grado de inflamación subyacente y del estado de activación de las células CEI.

En resumen, el tipo de interacción entre las células CEI-T es determinante para la decisión entre si hay respuesta inmune o tolerancia.

h. Respuesta inmune en superficie de mucosa, IgA secretora, células T efectoras

Una de las principales características de la respuesta inmune humoral de las superficies de las mucosas es la producción de IgA secretora por los linfocitos B de las placas de Peyer. Los folículos de células B se forman alrededor de las células dendríticas que les presentan el antígeno a través de las moléculas de histocompatibilidad de tipo II (MHCII) y cuando éstas últimas presentan los antígenos, las células B migran de las placas de Peyer a lámina propia y a otros compartimentos comunes de la mucosa, se diferencian y maduran para finalmente secretar IgA. De igual forma, en las placas de Peyer se forman linfocitos T CD8+ citotóxicos (LTC) y T CD4+ ayudadores (LTA) que también migran a la lámina propia intestinal o al epitelio donde, entre otras funciones, contribuyen a la formación de IgA e IgE y a la activación de los macrófagos para el control de gérmenes. La migración preferencial de las células a estos tejidos se genera a través de moléculas de adhesión, entre ellas MadCAM-1 que se encuentra presente en las placas de Peyer, ganglios mesentéricos y endotelio vascular de la lámina propia.

Las subpoblaciones de células T ayudadoras y las citocinas que producen son críticas en la iniciación y maduración de las respuestas inmunes en la mucosa intestinal. La respuesta IgA secretora está mediada por las células Th2, y en particular por citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 y TGF β que de una u otra manera se han visto involucradas en su producción. Al parecer TGF β actúa de manera sinérgica con la IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 para promover la producción de IgA por células B, al mismo tiempo que inhibe la proliferación de linfocitos. Se sugiere que esta citocina desempeña un papel importante en la inducción de tolerancia oral.

XI. VACUNAS

Vacuna

Las vacunas son elementos de la tecnología, diseñados para prevenir las infecciones causadas por diversos patógenos a través de la promoción de una respuesta inmune.

Clasificación y Tipos de Vacunas ⁶³

Las vacunas se pueden clasificar en:

- **Vacunas vivas o atenuadas.** Se basa en el uso del agente patógeno vivo pero con muy poca o nada de virulencia, por lo que no es capaz de causar enfermedad.
- **Vacunas consistentes de organismos muertos.** Se basa en el uso del agente patógeno muerto.
- **Vacunas antitoxinas.** Se usan toxoide o toxinas inactivadas.
- **Vacunas de subunidades , incluyendo péptidos.** Se basa en el uso de antígenos nativos, antígenos recombinantes o péptidos sintéticos derivados de dichos antígenos, administrados sólo o asociados a adyuvantes.
- **Vacunas con vectores.** Se explota a un agente patógeno atenuado que se replica para que a su vez exprese antígenos pertenecientes al agente contra el cual se quiere inmunizar (caballo de Troya).
- **Vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de ADN.** Se administra una construcción en un vector de expresión que contiene todos los elementos necesarios para transcribir y traducir uno ó varios genes del patógeno considerados como protectores.
- **Vacunas comestibles.** Se basa en la expresión de proteínas antigénicas en plantas transgénicas. En éste caso, la Inmunización se dá por consumo de la planta ó de su fruto.

En la siguiente tabla se muestran los tipos de vacunas y algunos ejemplos alusivos a ellas. Las marcadas con (x) aún están en etapa experimental.

Tabla de Vacunas ⁶³

Tipos de Vacunas	Virales	Bacterianas	Parasitarias
Organismo vivo o atenuado	Polio, varicela, sarampión, paperas, rubéola, fiebre amarilla, rotavirus (x), dengue (x), hepatitis A (x)	Tuberculosis, tifoidea, cólera (x), shigelosis (x), lepra (x)	
Organismo muerto	Polio, influenza, rabia, encefalitis japonesa B, hepatitis A	Pertussis, tifoidea, cólera, lepra (x), enfermedad de heliobacter (x)	Malaria (x)
Antitoxina		Difteria, tétanos, shigelosis (x), E. coli entérica (x)	
Vacunas de subunidades, incluyendo péptidos	Hepatitis B, herpes simple tipo 2 (x), influenza (x), virus del papiloma humano (x), HIV (x), rabia (x)	Haemophilus influenzae B, pertussis, H. Pylori (x), meningococo, pneumococo, tifoidea	Malaria (x), schistosomiasis (x), leishmaniasis (x)
Vacunas por vectores	HIV (x), sarampión (x), rabia (x)	Tifoidea (x), cólera (x), tuberculosis (x), shigelosis (x)	Malaria (x)
Vacunas de ácidos nucleicos	HIV(x), influenza(x), herpes simple tipo 2(x), rabia(x), hepatitis B(x), hepatitis C(x), hepatitis D(x), virus de papiloma(x), HTLV I (x), citomegalovirus(x), encefalitis de St. Louis (x)	Tifoidea (x), tuberculosis (x)	Malaria (x), schistosomiasis (x), leishmaniasis (x)

Ayudantes ⁶³

Son sustancias o formulaciones que tienen la capacidad de incrementar la respuesta inmune a un antígeno.

Entre los primeros más potentes ayudantes se encuentra el de Freund constituido por el bacilo de la tuberculosis muerto mezclado en aceite mineral⁶⁴. Este ayudante promueve la respuesta humoral (formación de anticuerpos) y la hipersensibilidad tardía (DTH). El ayudante incompleto de Freund que carece del bacilo, solo promueve la producción de anticuerpos.

Es difícil clasificar a los ayudantes porque en la práctica muchos de ellos utilizan diferentes principios. En la siguiente tabla se mencionan algunos de los más comunes y como actúan.

Tabla de Adyuvantes ⁶³

Algunos de los factores que promueven la inmunogenicidad de los antígenos	Ejemplos
Liberarlos en partículas	Ag precipitados con aluminio, flagelina polimerizada, HbsAg, liposomas, virosomas, bisosomas, ISCOMs (colesterol, saponina, fosfolípidos, proteínas de superficie virales).
Polímeros y polimerización de antígenos	Polímeros polioxipropileno, y polioxetileno, polímeros de manosa, polímeros multipéptidicos, tripalmitoil-S-gliceril cisteína
Emulsiones y adyuvantes (promoción de liberación lenta de Ag)	Adyuvante de Freund, MF59, SAF-1
Microencapsulación de antígenos	Microcapsulas biodegradables: (poli láctido-co-glicólido-PLG), cianoacrilatos (poli butil-2-cianoacrilato)
Bacterias y productos bacterianos	<i>M. tuberculosis</i> muerta, <i>Bordetella pertussis</i> muerta, <i>Corynebacterium parvum</i> , N-acetil-muramí-L-analí-D-isoglutamina, muramí dípeptido MDP, MTP-PE, LPS (de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Pseudomonas</i>), monofosforil lípido A (MPA)
Otros adyuvantes químicos	Polinucleótidos poli-1: C y poli-A: U, vitamina D3, dextran sulfato, inulina, DDA, avidina, polímeros de carbohidratos, dimetilato de trealosa, polifosfina y la proteína LeIF de <i>Leishmania</i> .
Citocinas	IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, FLT-3, INF γ
Agentes que se dirigen a las CPA	Fusión a C3d, CtxB

Abreviaciones: HBSAg (Antígeno de hepatitis B), ISCOMs (complejos inmunotendidos), MF59 (emulsión de Quiron), SAF-1 (Formulación Adyuvante de Sintex-1), MTP-PE (Porciones de LPS), LPS (Lipopolisacárido), DDA (Dimetil, dioctacil bromuro de amonio), LeIF (Leishmania protein), CtxB (Subunidad B de la toxina del cólera)

Factores a considerar para la administración de una vacuna:

1. La naturaleza del antígeno candidato a vacuna.
2. La ruta de administración puede conferir compartimentalización anatómica a la respuesta inmune, restringiéndola a Inmunidad periférica o inmunidad de la mucosa.
3. Dosis de antígeno.
4. Frecuencia de administración de la dosis.
5. Tipo de adyuvante.

Vacunas de mucosa

Las mucosas constituyen la vía de entrada de más del 90% de patógenos del humano, principalmente el tracto digestivo. Como tal, la activación de una respuesta inmune por vía oral constituye la estrategia más avalada contra muchas infecciones. De hecho, la mayoría de las vacunas efectivas aprobadas en humanos se administran por esa vía. Entre estas vacunas que involucran a patógenos atenuados se incluyen la triple (polio, tétanos y sarampión), *Salmonella typhi* y la vacuna tetravalente de rotavirus, recientemente aprobada (RotaShield).

El virus de la influenza adaptado al frío (CAIV) el cual está en etapa de experimentación avanzada, es la primera vacuna de mucosas que se administra por vía nasal a humanos y que ha demostrado generar respuestas inmunes protectoras⁶⁵. Esto sugiere que CAIV es vehículo promisorio para generar inmunidad protectora en niños en contra de la influenza.

Una forma alternativa es el uso de vacunas de ADN. Se han realizado estudios clínicos de administración de ADN en forma de plásmido para inducir protección en contra de varios patógenos, entre ellos; el virus de hepatitis B, el virus del herpes simple, HIV y malaria⁶⁶. Sin embargo, en todos los casos se reportó la inducción de anticuerpos y linfocitos T citotóxicos (LTC) a nivel sistémico y no en mucosas.

A pesar de que se ha progresado en la inducción de inmunidad de mucosas en animales de laboratorio con vacunas de ADN utilizando lípidos catiónicos u otros vehículos para las vacunas así como motivos inmunoestimuladores CpG, no existen reportes de inducción de inmunidad en mucosas con el uso de vacunas de ADN en humanos.

Otra estrategia prometedora para el desarrollo de vacunas de mucosa es el uso de adhesinas. Anticuerpos en contra de estas proteínas pueden bloquear la capacidad del patógeno de penetrar las barreras mucoides. Las adhesinas son opciones atractivas ya que son altamente conservadas debido a su asociación con receptores bien conservados del hospedero.

Actividad adyuvante de la toxina del cólera

La toxina del cólera (TC) es un potente adyuvante de respuesta inmune secretora IgA cuando se administra en forma oral a animales experimentales. La toxina del cólera es una molécula constituida por una subunidad A (holotoxina) asociada a un pentámero

de subunidades B. La toxina del cólera se une al gangliósido monoacilado GM1 en las células epiteliales del intestino vía la subunidad pentamérica B, permitiendo la entrada de la subunidad toxigénica A a la célula que ADP-ribosila la proteína reguladora G (adenilato ciclasa) activándola de una forma incontrolada, de esta manera provoca que las células epiteliales secreten grandes cantidades de fluido^{67,68}. Aún existen controversias en cuanto a que la subunidad de la TC ejerce el efecto adyuvante en mucosas. Así, mientras algunos trabajos demuestran que la administración de antígenos expresados en fusión con la subunidad B de la toxina del cólera son capaces de estimular la inmunidad de mucosas, otros estudios sugieren que la subunidad A es esencial para el efecto adyuvante. Sin embargo, el uso de la subunidad A es limitado por su toxicidad.

Plantas transgénicas

El avance rápido en la biotecnología de plantas resultará en contribuciones a la producción de vacunas. Estudios recientes señalan que plantas tratadas genéticamente pueden ser usadas para producir vacunas en contra de enfermedades humanas^{69,70}. A principios de 1990 Charles J. Arntzen concibió la tecnología de las plantas transgénicas como la manera de resolver muchos de los problemas que lleva consigo la vacunación de los niños de países en desarrollo. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo un llamado a la comunidad científica sobre la urgente necesidad de vacunas baratas, orales y que no necesiten refrigeración. El único problema es que las vacunas de plantas tendrán que purificarse de alcaloides y otros productos tóxicos de la planta. Dos estrategias pueden usarse para resolver este problema, uno es utilizar vectores de la planta que incorporen a la proteína en un tejido que carezca de estos tóxicos y/o alcaloides (Ej. plátano y semilla de soya). Otra solución sería la de usar la misma tecnología para incorporar construcciones para que genéticamente se eliminen los genes para las sustancias tóxicas.

El utilizar plantas transgénicas como vectores de expresión puede proporcionar una amplia variedad de ventajas con respecto a las técnicas de producción convencionales. Entre ellas tenemos:

- 1) Obtención de gran cantidad de proteína en corto tiempo.

- 2) Abaratamiento de la producción, almacenaje, distribución y administración de la vacuna (no requiere refrigeración ni personal especializado ó equipó para su administración).
- 3) Elimina contaminación de la vacuna con virus animales.
- 4) Se puede administrar de manera natural a través del consumo de la planta, frutos ó como preparados.
- 5) Como método no agresivo es ideal para vacunación de niños.
- 6) Los antígenos en la planta se encuentran en un medio natural de encapsulación que los protege de jugos gástricos.
- 7) Se puede vacunar contra varios patógenos al mismo tiempo.

Uno de los primeros ensayos fué la introducción del gene de una proteína derivada del virus de hepatitis B en plantas de tabaco. Interesantemente, la administración del antígeno a ratones logró activar los mismos componentes del sistema inmune que el propio virus puede activar.

Se ha logrado que las vacunas comestibles puedan proveer alguna protección a animales experimentales en contra del virus de la rabia, *Helicobacter pylori* y el virus entérico de MINK.

En cuanto a humanos, en 1997 varios voluntarios comieron trozos de papas crudas que contenían una parte no tóxica de la toxina de *E. coli* (la subunidad B) logrando activar tanto la respuesta inmune de mucosa como la sistémica⁷¹. En otro ensayo, 19 de 20 voluntarios también activaron su sistema inmune cuando se les dió a comer una vacuna de papa con el virus Norwalk⁷² y dos de tres que recibieron (Hilary Koprowski of Thomas Jefferson University) lechuga transgénica expresando un antígeno de la hepatitis B⁷³. Aún así, el que las vacunas transgénicas protejan a humanos contra enfermedades todavía no esta determinado.

En resumen, los experimentos realizados en animales y en humanos indican que la estrategia es viable. Todavía hay muchas cosas por resolver, tales como la cantidad de vacuna que sintetizará la planta. La producción se puede aumentar de varias maneras, una de ellas es ligando a los genes del antígeno con elementos reguladores que se activen bajo ciertas condiciones ambientales o en ciertas o todas las etapas del

desarrollo de las plantas, controlando los períodos de síntesis de las proteínas, ya que se ha observado que en algunas plantas transgénicas la síntesis se presenta casi al final del desarrollo y la cantidad de proteína que se obtiene es baja. Mientras se resuelve esto, hay que asegurarse que la cantidad administrada de fruta va a dar la dosis necesaria de antígeno a través de la cuantificación de la misma.

Tolerancia Oral

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmune de mucosas cumple con dos funciones opuestas: inmunidad de mucosa y tolerancia. La respuesta normal o común del tracto gastrointestinal a antígenos es la tolerancia⁷⁴. La tolerancia, se piensa ocurre a través de:

- **Supresión activa.** Células o citocinas que inducen la no-respuesta.
- **Anergia.** Células vivas que no responden.
- **Apoptosis.** Muerte celular programada de células reactivas.

El tracto gastrointestinal sano está constantemente en contacto con antígenos, de los cuales puede distinguir entre patógenos, flora normal y alimentos⁷⁵. Los agentes patógenos generalmente provocan que se secreten por parte de las células epiteliales citocinas y quimiocinas, atraen células inmunes y/o provocan que las células epiteliales expresen moléculas de MHC en superficie induciendo la inmunidad. Los antígenos carentes de esta actividad estimuladora se programan para la tolerancia en la cual generalmente la IgA secretora no se ve disminuída^{76, 77}.

La vía de vacunación es un determinante crucial para inducir ya sea la Inmunidad periférica o la Inmunidad de mucosas. Los métodos y rutas para inducir la Inmunidad de mucosas generalmente retardan o previenen la inducción de la Inmunidad periférica y viceversa⁷⁸. A este fenómeno se le denomina "Regulación cruzada" y fué revelado por primera vez en su forma bimodal por Pierce (1978)⁷⁹, Koster (1983)⁸⁰ y Hamilton *et al.* (1979)⁸¹ cuando estaban probando un candidato no tóxico a vacuna contra el cólera. Ellos encontraron que la sensibilización inicial por una vacunación vía parenteral redujo la habilidad de la vacuna de inducir inmunidad en la mucosa cuando la segunda inoculación del antígeno se dió por vía entérica. Pero la sensibilización parenteral resultó en una fuerte respuesta inmune en la segunda dosis administrada también por vía parenteral. La regulación cruzada no es compatible con las características de los

modos convencionales de vacunación ya que generalmente se necesita activar tanto la respuesta inmune periférica como la de mucosas para proteger.

Vacuna vs amibiasis

El diseño de una vacuna contra un parásito resulta ser más complicado que en contra de una bacteria o un virus ya que los parásitos son organismos con ciclos de vida más complejos, algunos hacen uso de vectores como es el caso de la malaria, schistosoma y trypanosoma, por mencionar los más importantes. Pero la ventaja que guarda *E. histolytica* comparado con estos últimos es:

- No tiene vectores.
- No tiene huéspedes secundarios.
- Su ciclo de vida es sencillo comparado con el de otros parásitos, (sólo dos estadíos).
- Es un parásito extracelular, característica que favorece el uso de una vacuna que aproveche los anticuerpos en contra de este agente.

Inmunidad vs *E. histolytica*

Existen reportes de la adquisición de inmunidad protectora después de un episodio invasivo con *E. histolytica*. En un estudio epidemiológico individuos que habían padecido de absceso hepático amibiano tenían una tasa de riesgo de 0.2% de contraer absceso hepático amibiano comparado con pacientes controles que no habían padecido de absceso hepático amibiano⁶², sugiriendo así que una infección previa extraintestinal resulta ser protectora. Estos hechos son respaldados por experimentos hechos en regiones en donde la infección es endémica⁶³. Experimentalmente, la inmunidad en contra de la amibiasis puede obtenerse por la infección o vacunación; esto se ha demostrado en diferentes estudios hechos con gerbos, hámsteres o monos vacunados con amibas intactas o varias formas de antígenos amibianos, en donde se observa protección en contra absceso hepático amibiano⁶⁴.

La fuente de ésta protección es controversial, con estudios de transferencia pasiva de anticuerpos que respalda a la respuesta inmune humoral y con otros que demuestran la vulnerabilidad de la amiba a células fagocíticas activadas respaldando a la respuesta inmune celular. Sin embargo, una fuerte evidencia de la poca participación de la

Inmunidad celular toma respaldo en los pacientes con SIDA, en donde aparentemente no hay correlación positiva entre SIDA y amibiasis. En cualquier caso, es probable que ambas respuestas sean importantes dependiendo de la localización y el contexto en que se encuentre la amiba.

Respuesta secretora en la amibiasis intestinal

Se ha encontrado respuesta secretora IgA contra antígenos amibianos en leche materna, calostro, heces y saliva de humanos, así como en bilis de ratas inmunizadas con trofozoítos, heces de ratones inmunizados con trofozoítos fijados en glutaraldehído⁸⁵ y en heces de roedores inmunizados por vía oral con la lectina por afinidad a N-acetil-D-galactosamina⁸⁶ ó con un dodecapéptido de la proteína rica en serina de *E. histolytica* (SREHP) acoplado a la subunidad B de la toxina del cólera expresado en una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*¹⁰². Nuestro grupo de trabajo fué el primero en demostrar la capacidad de los anticuerpos IgA purificados de saliva de pacientes de inhibir la adherencia de los trofozoítos a la célula blanco, paso esencial en el proceso citolítico de las amibas. Posteriormente, se demostró que los anticuerpos IgA obtenidos en las inmunizaciones orales mencionadas anteriormente, también son capaces de inhibir la adhesión a células epiteliales ó a líneas celulares de mamíferos⁸⁵.

Uno de los eventos que pueden respaldar de manera indirecta el papel protector de la IgA en la amibiasis en humanos es la baja incidencia de amibiasis intestinal que se ha reportado en niños recién nacidos en un área endémica de Africa (Bangladesh), durante el tiempo en que son amamantados. De igual forma, otro estudio en la misma área demuestra clara asociación entre la presencia de anticuerpos IgA contra la lectina de adherencia GalNAc en niños y su resistencia a una reinfección con *E. histolytica*, aunque no por largos períodos⁸⁷.

Estos datos sugieren que se podría desarrollar una vacuna oral a través de la estimulación de anticuerpos IgA de mucosas anti-amibianos que puedan bloquear la adherencia de la amiba a células epiteliales intestinales.

Candidatos a vacuna

Los primeros intentos de vacunación consistieron en la administración de trofozoítos muertos, así como de antígeno total y fracciones antigénicas. La mayoría de estos confirieron protección contra el desarrollo de AHA en hamsters y gerbos que son los

modelos experimentales en que se han realizado la mayoría de los ensayos de protección hasta ahora.

Tres proteínas de *E. histolytica* se han utilizado en ensayos de protección y se han propuesto candidatos para vacuna:

- La proteína rica en serina (SREHP)
- La lectina de unión a Gal/GalNAc
- La proteína rica en cisteínas de 29 kDa (CREHP)

Las características que presenta cada una son:

a) SREHP (25kDa)

- Proteína con múltiples repeticiones en tandem que se encuentra en la superficie del trofozoito.
- Es altamente inmunogénica
- Posee epítomos muy conservados
- Se encuentran anticuerpos contra esta proteína en aproximadamente 80% de los pacientes que sufrieron de absceso hepático amibiano⁸⁸.
- La mayoría de los anticuerpos de pacientes con AHA se unen a las repeticiones de dodecapeptidos y octapéptidos que dicha proteína posee, e inhiben la adherencia de la amiba a células epiteliales.
- La proteína recombinante y sus epítomos confieren protección contra el desarrollo de AHA experimental en diversos experimentos*(ver tabla).
- El interés en esta proteína ha generado varias patentes, entre ellas de vacunación.

b) Lectina específica Gal/GalNAc de *E. histolytica* (260 kDa)

- Es una proteína de superficie con actividad de lectina.
- Es la molécula principal en el proceso de adherencia de la amiba a la célula blanco. Su bloqueo con azúcares o anticuerpos monoclonales inhibe la adherencia de los trofozoítos y su capacidad citolítica.^{89,90}
- Es altamente inmunogénica y tienen epítomos conservados ya que más del 90% de los pacientes (de diferentes regiones) que desarrollan absceso hepático amibiano generan anticuerpos contra esta proteína⁹¹, la mayoría (89%) dirigidos contra la región rica en cisteínas de la subunidad de 170 kDa. El 80% de los pacientes con colitis amibiana generan anticuerpos IgA dirigidos a esta región⁹².

- La proteína nativa, la recombinante y su región rica en cisteínas confiere protección contra el AHA experimental en múltiples ensayos* (ver tabla),
- El gran interés en esta proteína ha generado múltiples patentes, incluyendo su uso como vacuna.

c) CREHP (29 kDa)

- Localización en superficie en donde es el antígeno más abundante libre de tfo^{93,94,95}
- Es inmunogénica; aproximadamente el 80% de los pacientes que sufrieron de un episodio de absceso hepático amibiano desarrollaron anticuerpos en contra de esta proteína^{96,97}.
- Es reconocida por anticuerpos IgA de pacientes que sufrieron de absceso hepático amibiano y amibiasis intestinal⁹⁸
- La proteína recombinante confirió protección parcial contra AHA experimental en hámsteres* (ver tabla).

Tabla de Ensayos de Protección

Ref	Proteína	Músculo	Infección	I/Mal	Chips	Número	Dosis	Via	AVA	Eficacia	
121	Letra (Gal/GalNac (20kDa))	AVAgerbo	500 000 fzf	1h	Gal/GalNac		10 ug	p	27%	67%	
				Exp.1	ACF				81%		
					FES				100%		
99	SREB-IP-MEP	AVAgerbo	50 000 fzf	1h	SREB-IP-MEP	14	100 ug	p	30%	64%	
					MIP	10	100 ug	p	100%		
					FES	11	75 ul	p	100%		
				Exp.2	SREB-IP-MEP	9	150 ug	cl	0%	100%	
					MIP	9	150 ug	cl	100%		
					FES	5	75 ul	cl	100%		
102	170CR	AVAgerbo	50 000 fzf	1h	170CRGST	12	150 ug	p	1,7%	81-83%	
	SREB-IP-MEP				SREB-IP-MEP	12	150 ug	p	0%	100%	
	170-SR				170-SR	14	150 ug	p	1,4%	80%	
					CGT	10	150 ug	p	90%		
					MIP	10	150 ug	p	100%		
					FES	10	75 ul	p	100%		
101	LC3 (CR de letrea de 170 kDa)	AVAgerbo	500 000 fzf	1h	LC3		10 ug	p	18 00%	71%	
					Tiermax			p	58 10%		
					FES			p	65 20%		
103	CT-B-SREB-IP-12	Balye			CT-B-SREB-IP-12	4-5	100 ug	oral			
					Cu-B	4-6	100 ug	oral			
97	CREB-IP	AVAgerbo	500 000 fzf	1h	CREB-IP		10 ug	p	30%	54%	
					Tiermax			p	59%		
					FES			p	69%		
107	SREB-IP-MEP	Corbo y Dalric	500 000 fzf	1h	SREB-IP-MEP	20 ml	100000000	oral	22%	70%	
					SREB-IP-MEP	8 gzf		oral	100%	0%	
					Salmonela	10		oral	100%	0%	
					Nada	14		oral	100%		
84	SREB-IP-MEP	Almos afnc verdes			SREB-IP-MEP			subcutanea			
124	mAb letrea 150 kDa (E10019)	Hanskers	500 000 fzf	1h	E-0015 0 1	8	100 ug	p	75%	25%	
					E-0015 1 0	8	1000 ug	p	50%	50%	
					E-0015 1 0	8	10 000 ug	p	25%	75%	
					TCF-48 (Ab Isotipo)	5	10 000 ug	p	100%		
					FES	8		p	100%		
104	NLH-170CR-PEP5 OB-170CR-PEP5	Cerebas/CD	500 000 fzf	1h	Exp.1	NLH-170CR2-PEP5	g	50 ug	p	75%	25%
						N/L	g	50 ug	p	100%	
						NLH-170CR2-PEP5	r	200 ul	Immpas sue coney ip	33%	67%
						N/L	r	200 ul	Immpas sue coney ip	100%	
				Exp.2	Cl-B-170CR-PEP5	g	50 ug	p	100%	0%	
					Cl-B-M	g	50 ug	p	100%	0%	
					Cl-B-C	g	50 ug	p	54 50%	66%	
					Cl-B-N	g	50 ug	p	35 40%	63 60%	
					Cl-B	g	50 ug	p	100%		
				Exp.3	Cl-B	g	100 ug + NatHCO3 0 2 M	oral	100%		
					Cl-C	g	100 ug + NatHCO3 0 2 M	oral	100%	0%	
					Cl-N	g	100 ug + NatHCO3 0 2 M	oral	100%	0%	
					Cl-B	g	100 ug	p	100%		
					Cl-C	g	100 ug	p	80%	20%	
					Cl-N	g	100 ug	p	70%	30%	
125	170kDa de una letrea de superficie 170kDa de una letrea de superficie	Hanskers	750 000 fzf	1h	Exp.1	170+180 pur cromatografía	8	10 ug	p	62 50%	37 50%
						ACF	9		p	100%	
						FES	9		p	100%	
				Exp.2	170+180 pur SDS-PAGE	9	10 ug	p	33 30%	66 70%	
						ACF	9		p	100%	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

XII. PHAGE DISPLAY

1) Características Generales

Phage display se refiere a la expresión de péptidos o proteínas en la superficie de un fago filamentoso, entre ellos el más común es M13. Generalmente, los péptidos fusionados o proteínas, se expresan en la parte amino-terminal de las proteínas de envoltura del fago. Principalmente pVIII del que hay más de 2000 copias y pIII del que hay de 4 a 5 copias por fago. En el sistema pIII se pueden fusionar péptidos o proteínas grandes, mientras que en pVIII son pequeños (6 a 8 residuos) pero en 2700 copias.

Los sistemas de expresión de "phage display" son amplios y comprenden la expresión de: péptidos aleatorios, epítopos/mimótopos definidos (reconocidos por anticuerpos), bibliotecas genómicas y de ADNc y fragmentos de ADN genómico.

Esta tecnología aporta más ventajas y posibilidades que otras técnicas: se pueden aislar péptidos (epítopos) o proteínas de patógenos o anticuerpos monoclonales usando repertorios de anticuerpos o péptidos expresados en el fago; identificación de moléculas involucradas en la interacción entre receptor-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN, enzima-sustrato, entre otras; generación de fagos capaces de unirse, entrar y transcribirse en células de mamífero¹⁰⁶.

2) Bibliotecas de fagos para el mapeo de epítopos y el desarrollo de vacunas¹⁰⁷

Las bibliotecas de péptidos aleatorios se han utilizado para la identificación de péptidos que son ligandos de ciertos anticuerpos sin conocer el epítipo exactamente. Las bibliotecas de fragmentos de antígeno (AFL) han servido para identificar epítopos de un antígeno proteico en especial. En muchos casos, se identifican secuencias homólogas al epítipo original (mimótopos) que funcionan en cuanto a inmunogenicidad y reconocimiento como el original. Sin embargo, la importancia de los péptidos como mimótopos estructurales de un epítipo a comparación de los mimótopos puros funcionales, es que contactan al anticuerpo por interacciones diferentes a las del epítipo original, pero no es clara todavía.

La purificación de un fago con su blanco se puede detectar por el incremento de fago unido después de cada ronda de tamizaje y por ensayos de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). Las condiciones que afectan afinidad y diversidad de las clonas seleccionadas son: astringencia de los lavados, número de bioselecciones o tamizajes (biopannings) y la concentración de la molécula blanco o la densidad de la molécula Inmovilizada. La diversidad de las clonas disminuye después de múltiples rondas de purificación con alta astringencia.

3) Fagos como acarreadores inmunogénicos para vacunación

Una de las características más atractivas de la técnica de Phage Display, es el identificar epítomos o mimótopos de antígenos candidatos a vacuna. Una vez identificados, el bacteriófago filamentosos se utiliza como acarreador Inmunogénico para generar anticuerpos en contra de los péptidos recombinantes desplegados en el amino terminal de las proteínas de cubierta. Su ventaja sobre otros acarreadores tales como ovalbumina, el toxoide tetánico, etc. es el que los epítomos B del fago están limitados a los residuos externos donde está expuesta la secuencia del antígeno o péptido. Esto significa que el fago suele inducir una buena respuesta de anticuerpos contra la secuencia de interés, comparada con la de otros acarreadores, por lo que no requiere de adyuvantes.¹⁰⁸

En 1994, Schellekens y cols.¹⁰⁹ demostraron que un péptido proveniente de una biblioteca aleatoria de fagos (RPL), identificado por tamizaje con un anticuerpo monoclonal específico para la glicoproteína D del virus de herpes simple (HSV)-1 fué capaz de conferir inmunidad protectora a la infección de HSV-1. Incluso la afinidad de el anticuerpo monoclonal por el péptido RPL derivado y el epítomo lineal nativo fueron similares.

En varios trabajos de protección^{110,111,112} utilizando mimótopos se ha encontrado que aquellos que inducen una respuesta de anticuerpos protectora, corresponden a epítomos de proteína lineales de los virus patógenos. Folgori *et al.*¹¹³ fue el primero en demostrar que los sueros de pacientes con hepatitis C puede ser utilizado para identificar mimótopos de epítomos reconocidos comunmente en el virus de hepatitis C. Ya identificados tanto mimótopos lineales como conformacionales, se utilizaron algunos de estos fagos para inmunizar conejos, lo que resultó en una reacción cruzada con el virus HCV. Así mismo, Scala *et al.*¹¹⁴ identificó varios fagos que reaccionaron con

diferentes sueros de personas infectadas con HIV. Se inmunizaron ratones con estos fagos seleccionados y de manera significativa las IgG purificadas neutralizaron aislados primarios de HIV-1, en un ensayo de infección *in vitro* utilizando sangre humana periférica. En parásitos la técnica se ha empleado con péptidos de *Plasmodium falciparum* (P1, P2). El poder utilizar uno o varios mimótopos de epítomos de patógenos sin utilizar a los patógenos completos atenuados o muertos o al antígeno completo para desarrollar vacunas puede ser de gran utilidad, principalmente cuando no se han identificado muchos de los antígenos de un agente patógeno o no se pueden obtener fácilmente. Sin embargo hay que tener mucho cuidado en la selección de estos péptidos, ya que pueden existir epítomos que favorezcan la infección¹²⁵. Incluso ésta técnica es útil para dilucidar en parte la etiología de ciertas enfermedades autoinmunes, desarrollar métodos que las prevengan o para diagnóstico en general.

II. HIPÓTESIS

1. Si se administra la proteína CREHP fusionada a la subunidad B de la toxina del cólera se podría generar tanto una respuesta secretora como una respuesta sistémica¹²⁷ capaces de bloquear la invasión de trofozoítos en un modelo de amibiasis intestinal.
2. Si utilizamos suero de pacientes recuperados de un episodio de AHA para seleccionar fagos que desplieguen péptidos, haciendo uso de la técnica de Phage Display, se podrían aislar epitopos o mimótopos que pueden ser utilizados como vacuna o diagnóstico de la amibiasis.

III. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la capacidad de protección de la proteína CREHP (Identificada por anticuerpos IgA de saliva de pacientes infectados) fusionada a la subunidad B de la toxina del cólera (CREHP-CtxB), así como de péptidos sintéticos identificados por "phage display", en modelos experimentales de amibiasis intestinal y extraintestinal (hepático).

ESPECÍFICOS

- Expresar en bacterias y purificar la proteína híbrida CREHP-CtxB (rica en cisteínas + subunidad B de la toxina del cólera) en cantidades suficientes para realizar ensayos de Inmunización oral.
- Inmunizar ratones por vía oral y evaluar el nivel de protección en el modelo de amibiasis intracecal reportado por nuestro grupo¹¹⁵.
- Evaluar la respuesta inmune secretora (producción de anticuerpos IgA) y su posible relación con protección.
- Aislar e identificar posibles péptidos protectores en una biblioteca de fagos expresando péptidos al azar (phage display) utilizando sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (tamizar la biblioteca).
- Identificar los péptidos que portan los fagos aislados con los sueros de AHAh por la técnica de Phage Display.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

ELABORACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESIÓN

El gene de la proteína rica en cisteínas (-7aa en el extremo amino-terminal) aislado de una biblioteca de ADNc λ -ZAP II (Uni-Zap™ XR Cloning Kit) de *E. histolytica* HM1:IMSS, se amplificó por PCR utilizando oligos sintéticos diseñados para permitir la inserción de los sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' y NdeI en el 3' además de eliminar el codón de paro. El amplificado de 0.7 kb se purificó a partir de un gel de agarosa al 1% en buffer de corrida TAE (amortiguador Tris 0.04 M-acetato, 0.001 M EDTA) y se clonó río arriba y en marco abierto con el gene de la subunidad B de la toxina del cólera (CtxB) en el vector pV1542 usando ligasa del fago T4 a 16° C durante toda la noche; la clonación se demostró por PCR ¹³⁴ (fig. 1).

Para la expresión en bacterias, la construcción CREHP-CtxB se amplificó por PCR con oligos que permitieron la inserción de sitios de restricción Hind III y EcoRI en los extremos 5' y 3' respectivamente, además de la eliminación del codon de paro de la subunidad B de la toxina. El amplificado de 1 Kb se purificó de un gel de agarosa al 0.8% y se subclonó en los sitios de restricción HindIII-EcoRI del vector de expresión pET23a usando ligasa del fago T4 a 16 °C durante toda la noche como se describe en el manual del fabricante (Gibco BRL). El codón de paro de CtxB se eliminó para poder clonar la construcción en marco abierto con seis tripletes del vector pET23a que codifican histidinas inmediatamente abajo del sitio de multiclonación. La cola de histidinas permite la purificación de la proteína expresada a partir de los extractos bacterianos por unión a cationes metálicos como el níquel.

La clonación del inserto se demostró por PCR y el mantenimiento del marco de lectura así como de la codificación de la cola de polihistidinas por secuenciación automática. Se purificó plásmido de la construcción en pET23a y se transformaron bacterias de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS a través del sistema de choque térmico en CaCl₂ (50mM) a 42°C por 60 seg (Maniatis). Las clonas transformadas se seleccionaron en presencia de penicilina (200ug/ml) y cloranfenicol (35 mg/ml) y se confirmaron por amplificación de la fusión por PCR en 1.5 ul de cultivo de las bacterias.

INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Cultivos diluidos 1:50 a partir de bacterias BL21(DE3) pLysS transformadas y crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB con los antibióticos correspondientes, se crecieron hasta una $OD_{600} = 0.5$ (2 h a 250 rpm y 37°C) y se utilizaron para inducir la proteína recombinante con Isopropyl-thio- β -D-galactopyranosido (IPTG), mismo que se une al represor del promotor Lac en el genoma de la bacteria BL21 liberándolo y permitiendo la transcripción del gen de la Polimerasa T7, el cual a su vez lleva a cabo la transcripción del gen de la proteína de interés (Novagen, pET Manual System). Para determinar las condiciones óptimas de expresión, se hicieron varias pruebas con combinatoria de factores como: medio de cultivo (Caldo Luria y Terrific Broth), temperatura (37°C, 30°C y temperatura ambiente), concentración de IPTG (0.5 a 10 mM), volumen del cultivo (5, 50, 100, 150 y 500 ml) y tiempo de inducción (5, 8 y 24 h). La inducción se determinó por corrimiento de los lisados bacterianos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% (2.5ml acrilamida/bisacrilamida 30:0.8, 1.75 ml Tris 1.5M pH 8.8, 1.25 ml H₂O bd, 50 μ l dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%, 65 μ l persulfato de amonio (APS) al 10%, 6.5 μ l de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) durante 1 h a 100 Voltios¹³⁵.

Con la finalidad de determinar si la proteína expresada se almacenaba en el citosol o se agregaba en cuerpos de inclusión, las bacterias se lisaron por congelación y sonicación (7 veces en intervalos de 1 min en hielo) y se centrifugaron para separar las dos fases, el sobrenadante ó fracción soluble (citosol) y el botón o fracción insoluble (membranas y cuerpos de inclusión). La localización de la proteína expresada se determinó por corrimiento en SDS-PAGE al 15%.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CREHP-CTXB

Para purificar la proteína por cromatografía de afinidad de unión a metales (Chelating Sepharose Fast Flor, Pharmacia Biotech), la fase insoluble (1ml) de las bacterias transformadas e inducidas, se aplicó lentamente a las columnas de sefarosa HiTrap (Pharmacia Biotech, USA) tratadas con NISO₄ (10 ml de 50 mM), se lavó y las proteínas unidas se eluyeron con EDTA 0.05% mM, pH 7.2. La pureza de la proteína se determinó por SDS-PAGE al 15%.

Para obtener los cuerpos de inclusión se cosecharon las bacterias inducidas, se lavaron en buffer de fosfatos (PBS), se resuspendieron en el mismo buffer y se sonicaron, se centrifugaron 40 min a 15000 rpm, se resuspendieron en 1 ml de Tris 0.05M pH 8.0 y se desnaturalizaron usando urea 8M. A continuación, la muestra se centrifugo a 15 000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se vertió lentamente en la columna tratada con NISO₄. De igual forma la pureza de la proteína se determinó por SDS-PAGE al 15%.

Con la finalidad de incrementar la cantidad de proteína, se purificó adicionalmente por difusión a partir de geles SDS-PAGE grandes al 12% en los que se corrieron los extractos totales a 100 Voltios durante 14 h. Se cortaron las bandas correspondientes a la proteína inducida, se trituraron por su paso a través de jeringas y se colocaron en 3 ml de PBS a 4°C durante tres días. Finalmente, la proteína eluída se colectó en los sobrenadantes que contenían los restos de los geles por centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min.

En todo caso se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry, usando BSA como estándar¹³⁶.

FUNCIONALIDAD DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DEL CÓLERA

La funcionalidad de la subunidad B expresada en fusión con la proteína rica en cisteínas se demostró a través de un ensayo de unión a gangliósido GM1 (su ligando en las células epiteliales), determinado por ELISA. Para ello, placas de 96 pozos se sensibilizaron con 100 ng de GM1 (Avanti Polar Lipids Inc) en buffer de carbonatos pH 9.6 durante toda la noche a 4°C. Después de bloquear los pozos con PBS-BSA al 1% durante 1h a 37°C, se agregó la proteína de fusión (250 ng/pozo), una proteína recombinante ARF (factor de ribosilación de ADP) purificada por el mismo método (250 ng/pozo) como control negativo y CtxB (250 ng/pozo) como control positivo. Todos se incubaron durante 1 hr a 37°C, se lavaron los pozos con PBS-Tween 0.05% y se añadió un anti-suero de conejo policlonal contra la proteína recombinante, un antisuero de conejo policlonal contra la proteína ARF (factor de ribosilación de ADP) y un antisuero de conejo policlonal contra la subunidad B de la TC, respectivamente; todos diluidos 1:100 durante 1 h a 37°C. Después del lavado, se añadió un segundo anticuerpo anti-total de conejo peroxidado (Zymed Laboratories, Inc.) (dilución

1:1000) durante 1h a 37°C seguido del revelado con OPD (orto-fenil-enediamina) y H₂O₂ y la lectura a 490 nm.

CULTIVO Y COSECHAMIENTO DE *E. histolytica*

Trofozoítos axénicos de *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS, provenientes de absceso hepático amibiano de hámsteres, se crecieron en medio de cultivo TYI-S-33¹³⁷ suplementado con 15% de suero bovino adulto a 37°C. Los trofozoítos se cosecharon a las 72 h de cultivo (fase de crecimiento logarítmica) por enfriamiento en hielo durante 10 minutos y centrifugación a 150 x g durante 5 min a 4°C. Los trofozoítos se resuspendieron en amortiguador de fosfatos PBS (15mM pH 7.2), se contaron en cámara de nuebauer y se ajustaron para el ensayo de infección.

RATONES

Se utilizaron ratones hembras de 6 semanas de edad de la cepa C3H/HeJ que son insensibles a lipopolisacárido (LPS) (Jackson Laboratory. Bar Harbor USA), libres de parásitos que se mantuvieron en jaulas de plástico estériles con filtro de aire y con alimento y agua *ad libitum*.

MODELO DE AMIBIASIS INTRACECAL EXPERIMENTAL EN RATONES C3H/HEJ

Como antesala a los ensayos de protección, se procedió a reproducir y mejorar el modelo de amibiasis intracecal previamente reportado por nuestro laboratorio¹²⁶. La modificación con respecto al protocolo previamente descrito, comprendió el uso de trofozoítos axénicos recién recuperados de abscesos hepáticos en hámsteres (Incrementa la virulencia) en lugar de monoxénicos, eliminando con ello todos los problemas relacionados con la inoculación de bacterias y los cambios que conlleva en la flora intestinal.

Se utilizaron 2 grupos de ratones de 8 animales cada uno. Uno de los grupos se infectó con ambas mientras el otro recibió solo PBS. Brevemente, los ratones se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg) (Revetmex S.A.) y xilazina (10 mg/kg) (Pisa S.A), se afeitó el área abdominal y se realizó una laparotomía bajo condiciones asépticas para

exponer el ciego (apéndice entre el intestino delgado y el grueso). Se inyectaron 5×10^5 trofozoítos en 0.15 ml de PBS, se selló el orificio con gelfoam (Pharmacia and UpJohn, S.A.), se regresó el ciego a la cavidad peritoneal y se procedió a suturar (Vycril 4-0). Veinte días después, se sacrificaron los animales, se les extirpó el ciego, se analizó el contenido intracecal y se procedió a hacer cortes histológicos de los mismos teñidos con hematoxilina-eosina.

INMUNIZACIÓN DE RATONES CON CREHP-CTXB

Veinte ratones se dividieron en tres grupos: el grupo I integrado por 8 ratones inmunizados con la proteína recombinante (CREHP-CtxB) + toxina del cólera (TC) en PBS, el grupo II control consistente de 8 ratones a los cuales sólo se le administró TC y el grupo III control consistente de 4 ratones a los cuales solo se le administró PBS.

A todos los ratones se les anestesió ligeramente con éter y se inmunizaron por vía oral utilizando sondas de plástico (Standard wall spaghetti tubing, Chemplast Inc. USA). Al grupo I se le administraron 100 ug de CREHP-CtxB + 10 ug de TC en PBS-NaHCO₃ 0.5 M (para neutralizar pH del estómago) los días 0, 7, 14 y 21. De la misma forma se trató al grupo II, solo que a éste se le administraron 10 ug de TC en PBS-NaHCO₃ 0.5 M y al tercer grupo solo PBS. Se colectaron muestras de heces y suero los días 0 y 21 (De Vos y Dick, 1991).

INFECCIÓN INTRACECAL DE LOS RATONES CON TROFOZOÍTOS DE *E. histolytica* Y ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LOS CIEGOS

Siete días después de finalizado el protocolo de inmunización, todos los ratones se infectaron intracalmente como se describió anteriormente. El día del sacrificio (47 post-Inicio de la inmunización) se colectaron muestras de heces y suero y se analizaron las características macroscópicas de los ciegos antes de ser extirpados como: tamaño, color, distensión, sangre y presencia de trofozoitos al microscopio de luz. Una vez extirpados, el borde libre de los ciegos se selló con hilo nylon, se les inyectó cuidadosamente formalina al 10% en PBS y se guardaron en suspensión en la misma solución. Para el análisis histopatológico se embebieron en parafina, las secciones del tejido se tiñeron con hematoxilina-eosina y se fotografiaron bajo microscopía de luz.

ENSAYOS DE ELISA

Las muestras de heces se pesaron, se resuspendieron en un volumen 5 veces mayor que su peso en PBS con una mezcla de inhibidores de proteasa, se centrifugaron, se colectó el sobrenadante y se guardaron a -70°C hasta su uso. Placas de 96 pozos se sensibilizaron con 200 ng de la proteína recombinante CREHP-CtxB durante toda la noche a 4°C en buffer de carbonatos pH 9.6. Después de bloquear los pozos con PBS-BSA al 1% a 37°C durante 1 h, se les agregó 200 μl de los sobrenadante de las heces ó 200 μl de los sueros diluidos 1:100 y se incubó durante 1 hr a 37°C . Se lavaron los pozos con PBS-Tween 0.05% y se añadió un anticuerpo anti-IgA de ratón peroxidado (Zymed Laboratorios, Inc.) para las muestras de heces o anticuerpos anti-Ig totales, IgG e IgM de ratón peroxidado para las muestras de sueros diluidos 1:1000. Después de 1h a 37°C , los pozos se lavaron de la misma manera y los complejos inmunes se revelaron con OPD y H_2O_2 . Finalmente las placas se leyeron a 490 nm. Los ensayos de ELISA se realizaron por duplicado para todos los casos.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El día del sacrificio, se extrajo el bazo de los ratones inmunizados así como controles bajo condiciones de esterilidad en medio RPMI y los esplenocitos se obtuvieron por perfusión. Las células se concentraron por centrifugación, se resuspendieron en solución hemolisante durante 5 min en hielo y se lavaron con medio RPMI. Los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (BSA) (10%) y antibióticos (1%), se contaron y se ajustaron para colocar 5×10^5 linfocitos/pozo en las placas de 96 pozos. Los ensayos se realizaron por triplicado en un grupo de pozos a los cuales no se les añadió nada, un grupo que se estimularon con $1 \mu\text{g}$ /pozo de Concavulina A y otro grupo que se incubó con $5 \mu\text{g}$ /pozo de antígeno total de amiba, preparado por calentamiento y enfriamiento en amortiguador con inhibidores de proteasas. De igual forma 5×10^5 esplenocitos se añadieron a placas previamente sensibilizadas con anticuerpos (Zymed Laboratories, Inc.) anti-CD3, anti-CD28 y con la mezcla de ambos. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C con 5% de CO_2 y 95% de humedad. Al cabo de este tiempo, las células se pulsaron con timidina tritiada ($1 \mu\text{Ci}$ /pozo) y se continuaron incubaron durante 18 h y se cosecharon mediante un cosechador automático. La incorporación de timidina tritiada se determinó

en un contador beta de centelleo y los resultados de las cpm se expresaron como índices de proliferación con base en las lecturas de fondo.

SUEROS DE PACIENTES CON ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO (AHA)

Se utilizaron 2 sueros de pacientes con AHA diagnosticados por ELISA y punción hepática que se confirmaron en nuestro laboratorio por ensayos de Western blot contra antígeno total de amiba usando metodología estándar (Towbin y col, 1979).

WESTERN BLOT DE SUEROS DE PACIENTES CON AHA CONTRA ANTÍGENO TOTAL DE *E. histolytica*

Se corrió antígeno total de *E. histolytica* en un gel de acrilamida al 12% (SDS-PAGE) y se transfirió a una matriz de nitrocelulosa a 0.7 amperios durante 45 min. Tiras de 3 mm se bloquearon con 3% BSA en PBS-Tween 0.5% durante toda la noche a 4°C. Una vez bloqueadas, las tiras se incubaron con los sueros diluidos 1:100 en PBS-Tween-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Después de los lavados con PBS-Tween 0.3%, las tiras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-Ig total (Zymed Laboratories, Inc.) de humano acoplado a peroxidasa en dilución 1:1000. Las tiras se lavaron igual y los complejos inmunes se revelaron con 4-cloronaftol y H₂O₂ (Towbin y col. 1979).

BIOSELECCIÓN

Utilizando el protocolo del fabricante (Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, Inc.), se sensibilizaron 8 pozos de una placa de 96 pozos (Maxisorp) con 2 µg de anticuerpo monoclonal anti-Fc de IgG humano (Zymed Laboratories, Inc.) en 100 µl de PBS por pozo durante 1 h a 37°C. Después de 10 lavados con 100 µl de PBS/pozo, éstos se bloquearon con 200 µl de PBS-BSA 3% durante 90 min a 37°C. Los pozos se lavaron de la misma manera, se les agregó uno de los sueros de absceso hepático amibiano (AHA) humano diluido 1:100 en 100 µl de PBS a cada pozo y se incubaron durante 1 h a 37°C. Después de repetir los lavados se guardó la placa a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se añadió a cada 4 pozos, 100 µl/pozo de una dilución 1:4 en PBS-BSA 0.1% de las dos bibliotecas de fagos M13 que se utilizaron (C7C y D7: concentración: 2x10¹¹ fagos/ml y diversidad: 10⁹ fagos/ml; New England Biolabs, Inc.) y se dejó incubando a 4°C durante 270 min. Después de 10 lavados con PBS frío, los

fagos adheridos se eluyeron por incubación con 100 ul/pozo de glicina 0.2M /HCl pH 2.2 por 10 min a temperatura ambiente y después 10 min a 37°C. Los sobrenadantes de las bibliotecas (400 ul/ biblioteca) se recolectaron en un tubo eppendorf y se neutralizaron con 25 ul de Tris base 2M pH 8.0. Con la finalidad de incrementar la especificidad de los fagos adheridos a los anticuerpos AHA, se realizaron un par de rondas más (la segunda con el mismo suero y la tercera con otro) siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

TITULACIÓN DE LOS FAGOS

Se inoculó una colonia de *E. coli* cepa ER2537 F⁺ (con pIII) en 10 ml de medio 2YT (16g bacto-triptona, 10g de extracto de levadura, 5g NaCl por litro) y se dejó incubando durante toda la noche a 37°C en agitación a 250 rpm. Al día siguiente, se incubaron 200 ul de estas bacterias con 1 y 500 ul de una dilución 1:1000 de los fagos obtenidos por cada biblioteca en presencia de X-gal/IPTG (1.25 g IPTG, 1g Xgal (5-Bromo-4-cloro-3-iodo-3- β -D-galactosido)) para identificar por color azul aquellas bacterias infectadas por los fagos. Esta mezcla se sembró en medio sólido LB Top-Agar (10g bacto-triptona, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl, 1g de MgCl₂·6H₂O, 7g de agarosa por litro) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

AMPLIFICACIÓN DE LOS FAGOS

A partir de un cultivo nocturno de bacterias ER2537 F⁺ se inocularon 500 ul del cultivo y 390 ul de los fagos eluidos en las diferentes rondas de bioselección en 50 ml de medio 2YT y se dejaron incubar a 37°C durante 270 min a 280 rpm. Una vez infectadas, las bacterias se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante, se le agregó 1/6 de PEG/NaCl (20% w/v polietilén-glicol-8000, 2.5 M NaCl) para precipitar a los fagos y se dejó durante toda la noche a 4°C. Al tercer día, se centrifugaron los fagos-PEG a 14000 rpm durante 10 min, se resuspendieron en 1 ml de buffer TBS y se repitió la centrifugación a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y una vez más se agregó 1/6 de PEG/NaCl y se colocó en hielo durante 1 h. Se centrifugaron los fagos durante 15 min a 14000 rpm a 4°C y el botón se resuspendió en 200 ul de TBS. Restos de detritos bacterianos se eliminaron con otro ciclo de centrifugación.

Se hizo una dilución 10⁹ del fago y se procedió a titular utilizando el método ya descrito. Al cuarto día y quinto días se determinó el título de los amplificados y se

calculó el volumen adecuado para tener 2×10^{13} ufp (unidades formadoras de placas) por amplificado de cada biblioteca.

CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS OBTENIDAS POR BIOSELECCIÓN

A. Amplificación de las placas

Se tomaron 20 clonas aleatorias de la segunda y tercera rondas de bioselección "biopanning" por cada biblioteca y se transfirió cada una a 10 ml de medio 2YT con bacterias ER2537 provenientes de un cultivo nocturno y diluidas 1:100. Después de una incubación a 37°C y 200 rpm durante 5 h, se tomó 1 ml del cultivo para purificación de ADN de cadena sencilla y a los 9 ml restantes se les agregó 1/6 de PEG/NaCl y se dejaron a 4°C para la titulación como se describió anteriormente.

B. Purificación de ADN de cadena sencilla y secuenciación

A 1 ml/clona de las muestras amplificadas, se le agregó 400 ul de PEG/NaCl y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante, se repitió este procedimiento y finalmente se resuspendió en 400 ul de buffer de yodo 4M (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 4M NaI). El ADN se precipitó por adición de 500 ul de etanol absoluto durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugación a 14 000 rpm durante 10 min. El botón de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó, se resuspendió en 15 ul de H₂O megapura y se guardó a -20°C hasta su uso. La pureza y la concentración del ADN de cadena sencilla se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y finalmente se secuenció en un secuenciador automático con el uso de los oligos -28gIII y -96 gIII (Phage Display Library Kit, New England Biolabs, Inc.).

C. Análisis computacional de las secuencias de ADN de cadena sencilla

El análisis computacional en busca de secuencias homólogas se realizó en la base de datos del National Center of Biotechnology and Ingeniery (NCBI), usando el servicio de alineamiento y análisis de homología BLAST (Short Peptides) y además con secuencias de *E. histolytica* de la base de datos TIGR (The Institute of Genome Research).

V. RESULTADOS

ELABORACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESIÓN

La amplificación por PCR del gene completo que codifica para la proteína CREHP de 29 kDa mostró una banda de 0.7 kb en un gel de agarosa 1% (Fig. 1A). La clonación en el vector pV1542 que contenía la CtxB fue comprobada por PCR mostrando una banda de 1 kb correspondiente a la asociación de CREHP con CtxB (Fig. 1B). El mantenimiento del marco abierto de lectura entre los dos genes se comprobó por secuenciación automática con oligos de los extremos e internos. A continuación, la fusión CREHP-CtxB se subclonó en el vector de expresión pET23a y al igual que la anterior se demostró por PCR (Fig. 1C). La Fig. 2 muestra la secuencia de la proteína de fusión y su seguimiento con la secuencia de la cola de poli-histidinas aportada por el vector. Para su expresión, se transformaron bacterias BL21 (DE3) pLys que son resistentes a cloranfenicol gracias a el plásmido pLys. Las clonas transformadas se identificaron por resistencia adicional a ampicilina y se confirmaron por amplificación de la banda de 1 kb directamente a partir del medio de cultivo (Fig. 1D).

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CREHP-CTXB

La fase insoluble se pasó directamente por columnas de sefarosa tratadas con cloruro de níquel; sin embargo, no se pudo recuperar la proteína de los sobrenadantes lo que sugirió que ésta pudo haberse acumulado como cuerpos de inclusión. A partir de esta deducción, se desnaturalizaron los cuerpos de inclusión usando urea y el preparado se pasó por la columna, obteniendo así la proteína purificada demostrado en SDS-PAGE (Fig. 3C). La cantidad máxima de proteína obtenida por columna fue de 50 ug.

Con la finalidad de incrementar la cantidad de proteína para inmunización oral, se purificó adicionalmente por difusión a partir de geles SDS-PAGE grandes (Fig. 3D). Este sistema permitió la obtención de una mayor cantidad de proteína por lo que se utilizó en el resto del protocolo de purificación hasta obtener la cantidad necesaria para las inmunizaciones.

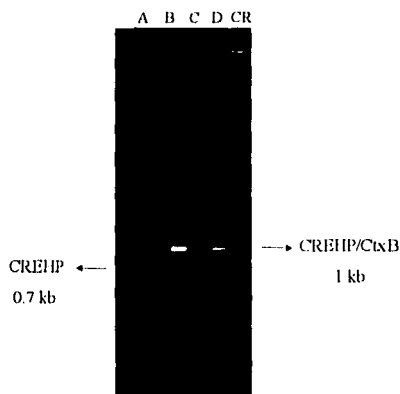


Fig. 1. Corrimiento en gel de agarosa de los productos de PCR de la CREHP (A), de la fusión de CREHP con CtxB en el vector pV1542 (B), de la fusión del vector pET23a y la confirmación de la transformación de bacterias BL21 (DE3) plysS.

Figura 2

Secuencia de la fusión CREHP/CTXB

```

                                cccgggaaattcacc
+Tggcttgcgaatcaacacaaaagagtggttgaataaaagaatgtccagagagaaagaatggttgaataa
gttgttgtccaaagaaacaaaagcaatttaagaaatttataaaccaaatttgaaaaaagcaaatggaaa
agaagccacagaaattcaaacgcccagcgaatttgcacatgtggttcaaatcaaaaagagattgatattaat
gaatataaaagggaaaatgtgtgtattgttgttttcccaattgggattggcaatttgttgtccaaag
aaatgatttggatatagtgaacttggaggcaattgaaagaaatcaattgttgaagtattggagtgagt
gtagattccagtttatctgcacaaagcattggtgttgaagcagataaaaagttaaggaggagtaggaaagt
tgcaattcccaattagatccagatataagagagatgcaatttotaaccaaataggaaatgttaaatgcca
agcaggaatttgcaagagagagatattgcacatctgattgatataagggaaaagttaagataclattcaaat
gaatgatgatggaaattggagatacaacgggaagaaacaatcaagaaatagtttaagcaattcaaatcagt
gatgaaacattggagcagtttgcacactcaattggaaacacagcccaaacgacacattgcaaccaacacag
atggaaataaagaaatatttaaacagcaaacatattgcaactgggaacacactcaaaatattctgatttgtg
tgcagaatcccaacacacacaatataacgcctaaatgataagatatttctgtatcacagaatctctca
gttggaaaaagagagatggctatcattacttttaagaatggtgcaatttttcaagtagaagataccag
gtatgtaacacatatagattccacaaaaaaaagcagattgaaagagatgaaggaatccctgaggattgcata
cttactgaagotaaagtcgaaaagttatgtgtattggaataataaaaacgctcctatgogattgocgca
attagttatggcaaataaagctt

```

```

M A C N Q Q K E C G K K E C Q E K E C C K E C C C P R I K A F K K F
I N T F E K A Q I G K E A P E F K A P A Y C P C G S I K E I D I N E
Y K G K Y V V L L F Y P L D W T F V C P T E M I G Y S E L G Q L K E
I N C E V I G V S V D S V Y C H Q A W C E A D K S K G V G K L T F
P L V S D I K R C I S I K Y G M L N V E A G I A R R G V Y I I D D K
G K V R Y I Q M N D D G I G R S T E T I R I V K A I Q F S I D E H G
A V C P L N W K P G K D T I E P T P D G I K K Y L T A T Y A H G T P
Q N I T D L C A E Y H N T Q I Y T L N D I F S Y T E S L A G K R E M
A I I T F K N G A I F Q V E V P G S Q H I D S O K K A I E R M K D T
L R I A Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A R A A I S H A N -

```

Total de aminoácidos: 310: 1020 nt.

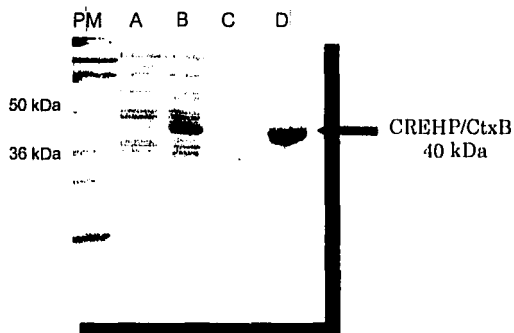


Fig. 3. Inducción y purificación de la proteína recombinante CREHP/CtxB. PM. Pesos Moleculares, A. Extracto de bacteria no inducido, B. Extracto de bacteria inducido, C. Proteína purificada por afinidad, D. Proteína purificada por elución.

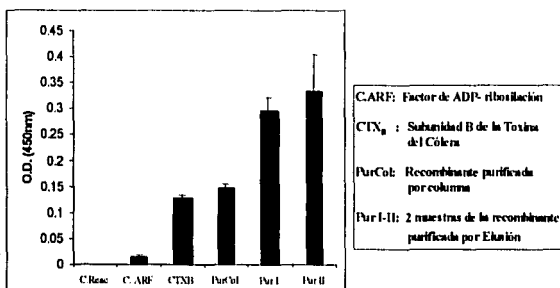


Fig. 4. Funcionalidad de la subunidad B de la Toxina del Cólera demostrada a través de un ensayo de unión a Gangliósido GM1, determinado por ELISA. La proteína no relacionada ARF se usó como control de especificidad.

FUNCIONALIDAD DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DEL CÓLERA (CTxB)

La funcionalidad de CtxB expresada en fusión con CREHP se demostró a través de un ensayo de unión a gangliósido GM1 (su ligando en las células epiteliales), determinado por ELISA. Los resultados de las lecturas demostraron efectivamente la unión de la proteína recombinante a GM1 a diferencia de un control no relacionado como la proteína recombinante ARF de *E. histolytica* purificada por el mismo método (Fig 4). Con este ensayo se demostró que CtxB expresada en fusión con la CREHP mantuvo su capacidad de unirse a GM1 y por lo tanto, como se ha reportado, podía ejercer su función de adyuvante de la respuesta secretora al facilitar la toma de CREHP por la células M de las placas de Peyer y su presentación a las células inmunes adyacentes.

MODELO DE AMIBIASIS INTESTINAL EXPERIMENTAL EN RATONES C3H/HEJ

La reproducción de la infección amibiana en ciegos de ratones C3H/HeJ por inoculación intracecal de trofozoítos axénicos recién recuperados de abscesos hepáticos amibianos en hámsteres resultó en alteraciones macroscópicas de los ciegos así como de la integridad de epitelio cecal determinado en cortes teñidos con hematoxilina-eosina similares o aún más severos que los observados con los trofozoítos monoxénicos (Tabla I). Los ciegos de los ratones infectados mostraron señales de inflamación, mucosidad, diarrea y trazas de sangre, mismos que se correlacionaron con el daño general de la superficie de la mucosa y la presencia de abundantes trofozoítos adheridos a los enterocitos o en la luz intestinal, incluso algunos de ellos con eritrocitos fagocitados (fig 5). Estos resultados comparados con aquellos de controles no infectados, demostraron la reproducción del modelo de infección que años atrás reportó nuestro grupo de trabajo¹²⁶ pero ahora con cultivos de amibas axénicas en lugar de monoxénicas.

Tabla I. Características macroscópicas de los ciegos de los ratones infectados

Ratones	Ciego		Contenido Intracecal Amarillento y diarreico	Trofeositos	Esplenomegalia
	Inflamado	Pálido			
1	√		√	√	√
2	√		√		√
3		√		√	√
4	√		√		√
5	√			√	√
6		√		√	√
7		√	√	√	√
8	√		√	√	√
9		√	√	√	√

Inflamado: Aumento de tamaño

Esplenomegalia: Tamaño de bazo aumentado

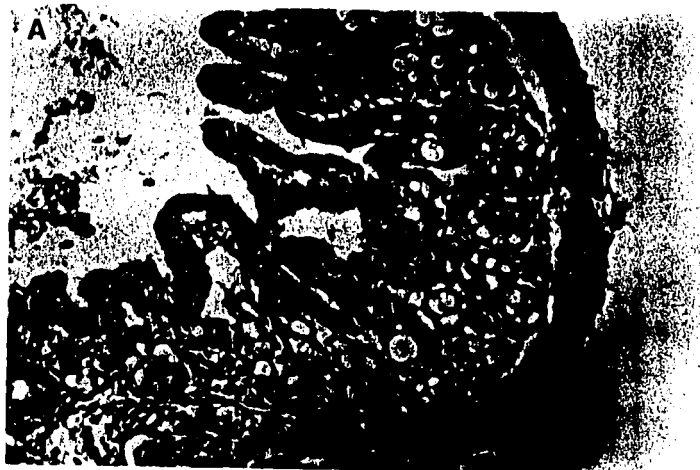


Fig. 5 Cortes histológicos de ciego de ratones. A. de un ratón normal. B. Infectado con trofozoitos asociados a la superficie de la mucosa. Los trofozoitos están señalados con una flecha

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

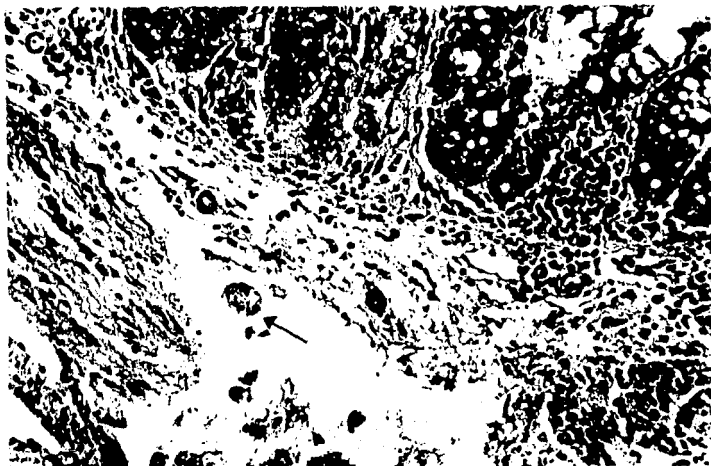


Fig 5. Cortes histológicos de ciego de ratones. C. Con trofozoitos en la luz intestinal e infiltrado inflamatorio. D. Con trofozoitos eritrofagocíticos (*) y erosión de la superficie epitelial. Los trofozoitos están señalados con una flecha.

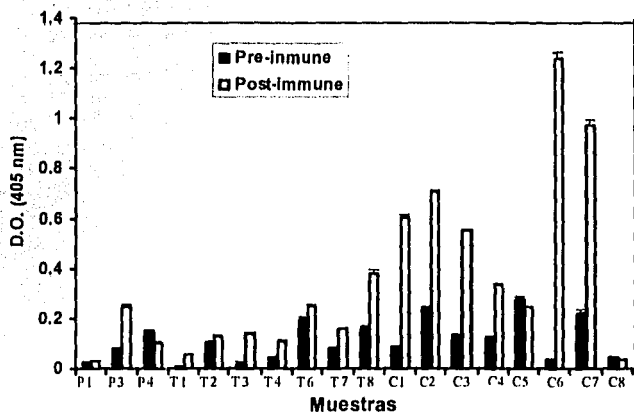


Fig 6. Determinación de anticuerpos IgA anti-CREHP-CtxB en sobrenadantes de heces de los ratones Inmunizados por ELISA. Grupos: P = PBS, TC = Toxina del Cólera, C = CREHP-CtxB + TC.

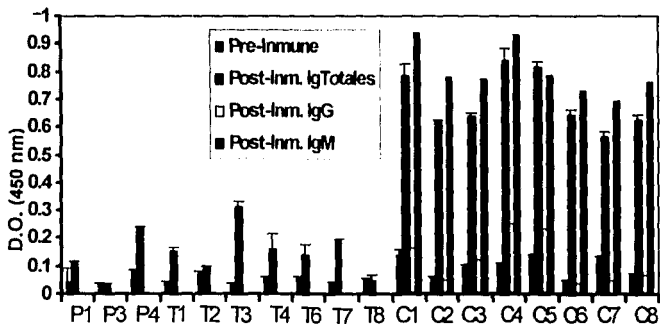


Fig 7. Determinación de anticuerpos Ig's totales, IgM e IgG anti-CREHP-CtxB en suero de ratones inmunizados por ELISA. Grupos: P = PBS, TC = Toxina del Cólera, C = CREHP-CtxB + TC.

EVALUACIÓN DE RESPUESTA INMUNE SECRETORA (IgA) POR ENSAYOS DE ELISA

Una vez inmunizados los ratones como se describió en materiales y métodos, se procedió al análisis de la respuesta inmune humoral local y sistémica. La determinación de anticuerpos IgA secretores anti-CREHP/CtxB se determinó en heces de los ratones por ensayos de ELISA. Como era de esperarse, sólo el grupo experimental al cual se le administró la proteína recombinante CREHP-CtxB generó anticuerpos IgA específicos aunque con niveles variables entre los diferentes ratones inmunizados (**Fig. 6**). Los grupos controles a los cuales sólo se les administró PBS y toxina del cólera (TC) no mostraron reacción en el ELISA antes ni después de la inmunización.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA SISTÉMICA (INMUNOGLOBULINAS TOTALES, IgG E IgM) POR ENSAYOS DE ELISA

La determinación de anticuerpos totales, IgG e IgM anti-CREHP/CtxB se determinó en suero de los ratones por ensayos de ELISA. El grupo experimental al cual se le administró la proteína recombinante CREHP-CtxB por vía oral, generó altos títulos de anticuerpos séricos específicos en todos los ratones (**Fig. 7**). Interesantemente, el análisis de isotipo demostró que se trataban de anticuerpos IgM presentes aún después del protocolo de inmunización de 4-5 semanas, con poca o casi nula respuesta del isotipo IgG. El suero de los ratones controles inmunizados con TC o a los que sólo se les administró PBS no mostraron reacción en el ELISA antes ni después de la inmunización.

ENSAYOS DE PROTECCIÓN DE RATONES CON CREHP-CTXB

El análisis de los ciegos de los ratones en términos generales mostró que no hubo protección significativa contra la infección intracecal por inmunización con la proteína de fusión, bajo el protocolo de inmunización que se asumió para este experimento. Se tomaron en cuenta características de los ciegos a simple vista como: tamaño, color, contenido de gases, mucosidad, sangre y presencia de trofozoítos al microscopio de luz. Los ciegos de la mayoría de los ratones de los diferentes grupos, incluyendo el inmunizado con CREHP/CtxB, mostraron características asociadas a la infección

Intracel: inflamación, distensión, vascularización, abundante moco, sangre y trofozoítos en el contenido intracel bajo el microscopio (Tabla II). La única excepción, no significativa, fue el ratón inmunizado no. 7 de CREHP-CtxB que mostró las características del ciego de un ratón normal.

Al igual que las observaciones macroscópicas de los ciegos, el análisis de los cortes histológicos demostró la presencia de trofozoítos en la luz intestinal ó asociados a los enterocitos y/o daño de la superficie del epitello intestinal (Fig. 8). En ningun caso se observó invasión de la submucosa o de organos extraintestinales como el hígado.

PROLIFERACIÓN CELULAR

Una vez sacrificados los ratones post-Inmunización e Infección, se extrajeron los bazos de manera individual, se procesaron y se realizaron los ensayos de proliferación con concavalina A (ConA) que es mitogénico por excelencia, antígeno total de *E. histolytica* (AgT) y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, moléculas esenciales en las vías de activación primaria y secundaria de los linfocitos T. Los resultados mostraron que los esplenocitos de los animales inmunizados con CREHP/CtxB, a diferencia de los otros grupos controles (PBS y TC), mostraron una reducción significativa o ausencia de la proliferación ante todos los estímulos ensayados (Figs. 9 y 10) , a excepción de los esplenocitos del ratón no. 5 que proliferaron ante el anticuerpo anti-CD3. Por su parte, los esplenocitos de los grupos controles proliferaron ante todos los estímulos, con la excepción de los anticuerpos anti-CD28 como era de esperarse, ya que involucra la vía secundaria de activación de los linfocitos que por si sola, sin la participación de la vía principal (CD3), no es capaz de inducir proliferación. En el caso de proliferación utilizando ambos anticuerpos se observó el mismo patrón que utilizando el anticuerpo anti-CD3 (Fig.10).

Tabla II. Características Generales de los Ciegos de Ratones Inmunizados con CREHP-CtxB e Infectados con *E. histolytica*

Ratón	Trofozoito	Ciego				
		Inflamado (mayor tamaño)	Pálido	Amarillento	Flatulento (gas)	Adherencias (ciego pegado)
1 PBS	++++	√	√		√	√
3 PBS	0					
4 PBS	0	√	√	√		
1 TC	1			√	√	√
2 TC	1			√	√	
3 TC	0			√	√	
4 TC	+			√	√	
6 TC	0			√		
7 TC	0			√	√	
8 TC	0			√	√	
1 C-CtxB	+++			√	√	
2 C-CtxB	0			√	√	√
3 C-CtxB	++++			√	√	
4 C-CtxB	+			√	√	
5 C-CtxB	0			√	√	
6 C-CtxB	0			√	√	
7 C-CtxB	0					
8 C-CtxB	+++		√			√

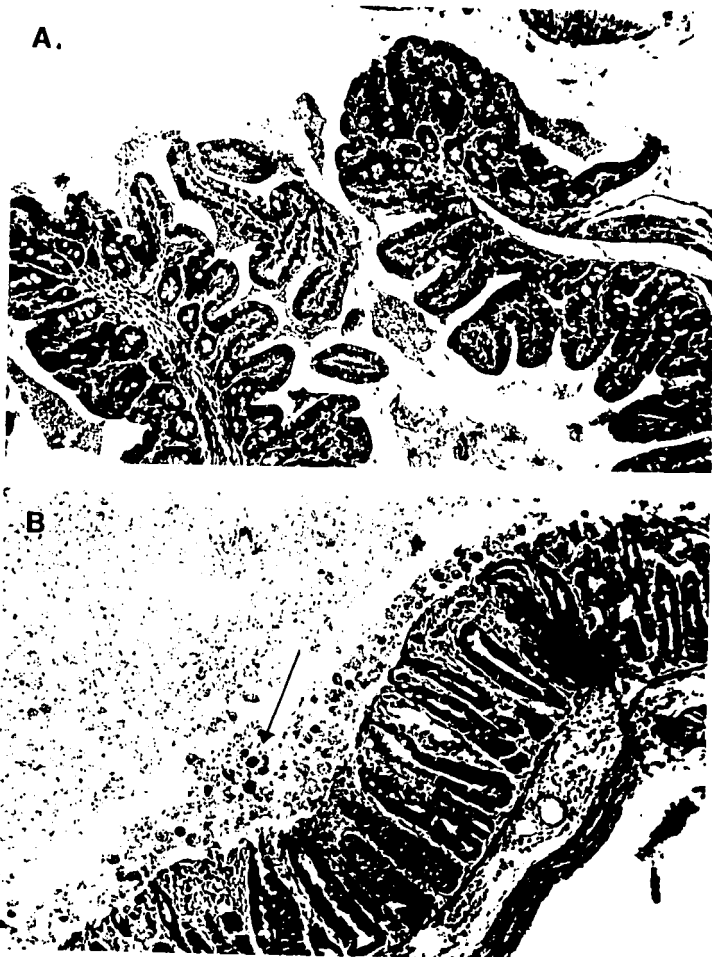


Fig. 8. Cortes histológicos de ciego de ratones. A. de un ratón normal, (N). B. de un ratón al que se le administró PBS infectado con trofozoitos de *E. histolytica*. Los trofozoitos están señalados con una flecha.

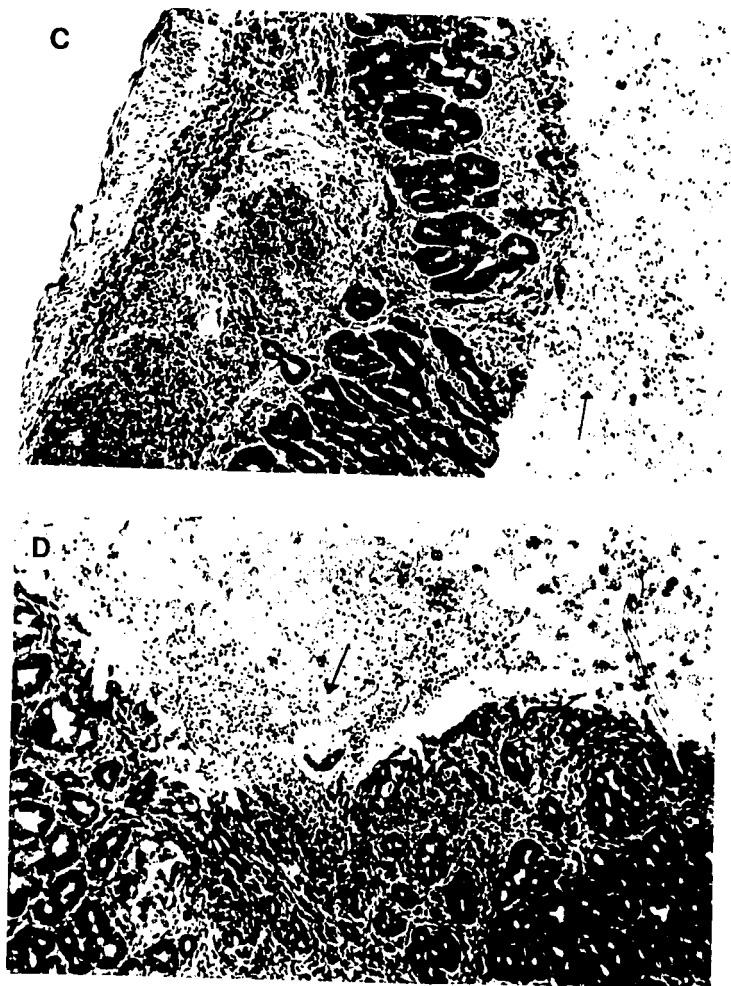


Fig 8. Cortes histológicos de ciego de ratones. C de un ratón al que se le administró toxina del cólera (TC) infectado con trofozoitos de *E. histolytica* y de un ratón inmunizado con CREHP-C1xB + TC e infectado con trofozoitos de *E. histolytica* (D). Los trofozoitos están señalados con una flecha.

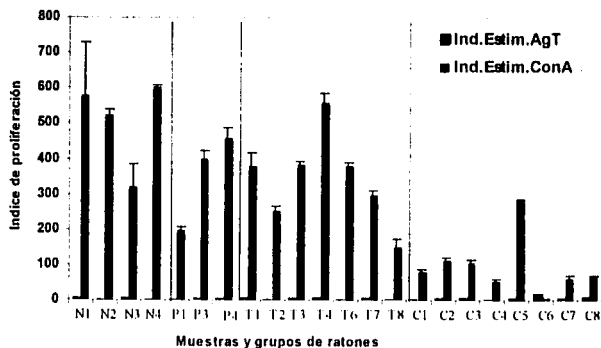


Fig 9. Ensayos de proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados e infectados en presencia de ConA y antígeno total (AgT) de amiba por incorporación de timidina tritiada (H^3 - Timidina). Grupos: P = PBS, TC = Toxina del Cólera, C = CREHP-CtxB + TC.

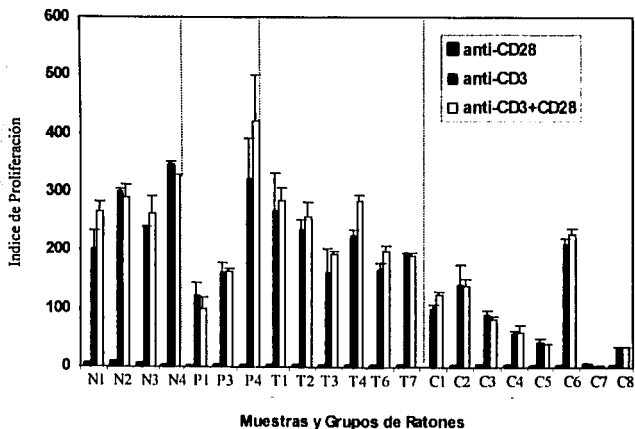


Fig 10. Ensayos de proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados e infectados en presencia de anti-CD3 y anti-CD8 por incorporación de de timidina tritiada (H^3 - Timidina). Grupos: P = PBS, TC = Toxina del Cólera, C = CREHP-CtxB + TC.

SELECCIÓN DE SUEROS DE PACIENTES CON AHA POR WESTERN BLOT PARA PHAGE DISPLAY

Para identificar péptidos predominantemente reconocidos en pacientes que se aliviaron de un episodio de absceso hepático amibiano (protección a largo plazo), se seleccionaron sueros de pacientes con AHA por Western blot contra antígeno total de amiba. Los 7 diferentes sueros de pacientes que sufrieron de un episodio de absceso hepático amibiano, reconocieron una amplia variedad de antígenos de la amiba en todos los rangos de peso molecular. De todos ellos, se seleccionaron dos sueros, los más altamente reactivos para ser utilizados en la técnica de phage display (sueros #17 y #28) (Fig. 11).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS POR PHAGE DISPLAY UTILIZANDO SUEROS DE PACIENTES CON AHA

El primer suero que se utilizó para el "panning" de la biblioteca de fagos fue el #28. Los anticuerpos IgG de este suero se fijaron en placas de ELISA a través de anticuerpos anti-Fc de IgG humana y la selección se realizó sobre un par de bibliotecas de fagos M13 de 7 y 9 aminoácidos, según el caso (diversidad de 10^9). Los fagos que reconocieron los anticuerpos se recuperaron en buffer TBS, se titularon y se amplificaron a través de la infección en bacterias *E. coli* y por reconocimiento a través de tinción azul con X-gal. Posteriormente con la finalidad de incrementar la especificidad de los fagos seleccionados se realizó un segundo "biopanning" o bloselección con el mismo suero 28 y un tercero con el suero # 17, lo que restringió la posibilidad de elegir fagos que se unieran inespecíficamente a los anticuerpos de AHA.

En la Tabla III se muestran los resultados de los títulos obtenidos en las tres rondas de bloselección, en donde se observa claramente un aumento del título conforme se incrementan las rondas lo que se relaciona con un aumento de la especificidad.

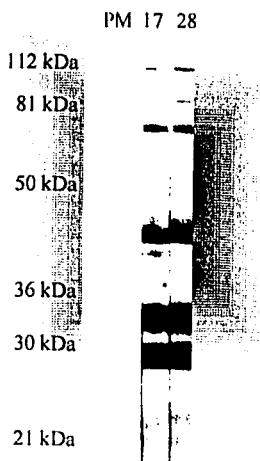


Fig. 11. Western blot de suero de pacientes con AHA en contra de Antígeno total de amiba.

Tabla III. Resultados de las 3 Rondas de Bioselección

Biblioteca	1R (ufp)*	2R (ufp)*	3R (ufp)*
7 aa	4×10^6	6×10^9	2.16×10^{10}
9 aa	6×10^5	3.1×10^8	7.2×10^9

* ufp: unidades formadas de placas

CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS DE FAGOS A TRAVÉS DE LA SECUENCIACIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA

Se aisló el ADN de cadena sencilla de 40 clonas de fagos elegidos al azar provenientes de la segunda (10 clonas por biblioteca) y tercera (10 clonas por biblioteca) rondas de bioselección de ambas bibliotecas (C7C y D7). Se secuenció cada una de las 40 clonas en secuenciador automático y se analizó la similitud entre las secuencias así como también con las secuencias reportadas para proteínas de *E. histolytica* utilizando el sistema de análisis computacional del NCBI Blast Short-Peptides y la base de datos TIGR (The Institute of Genome Research).

Al hacer un alineamiento de las secuencias obtenidas de la biblioteca de 7aa, se encontró la secuencia NHWASPR presente en 7 de las 20 clonas secuenciadas. Otra de las secuencias SPLHATL se encontró en 2 de las 20 secuencias. En total se obtuvieron 13 secuencias diferentes. La comparación de las secuencias, basada en la frecuencia de aminoácidos en las diferentes posiciones, permitió establecer la siguiente secuencia consenso: SHWAR/APN/A/R/T. La frecuencia de los diferentes aminoácidos fue de 4/13 secuencias presentaron serina (S) en la primera posición; 4/13, histidina (H) en la segunda posición; 4/13, triptófano (W) en la tercera posición; 3/13, alanina (A) en la cuarta posición; 5/13, prolina (P) en la sexta posición. En la Tabla IV se muestra cada una de las secuencias obtenidas y el número de aminoácidos que al alinearlos coinciden con los aminoácidos de la secuencia consenso.

Al hacer un alineamiento de las secuencias obtenidas de la biblioteca de 9aa, se encontraron 16 diferentes secuencias. Ninguna de las secuencias se encontró repetida y tres resultaron ser fago silvestre mientras que una secuencia provenía

Tabla III. Resultados de las 3 Rondas de Bioselección

Biblioteca	1R (ufp)*	2R (ufp)*	3R (ufp)*
7 aa	4×10^6	6×10^9	2.16×10^{10}
9 aa	6×10^5	3.1×10^8	7.2×10^9

* ufp: unidades formadas de placas

CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS DE FAGOS A TRAVÉS DE LA SECUENCIACIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA

Se aisló el ADN de cadena sencilla de 40 clonas de fagos elegidos al azar provenientes de la segunda (10 clonas por biblioteca) y tercera (10 clonas por biblioteca) rondas de bioselección de ambas bibliotecas (C7C y D7). Se secuenció cada una de las 40 clonas en secuenciador automático y se analizó la similitud entre las secuencias así como también con las secuencias reportadas para proteínas de *E. histolytica* utilizando el sistema de análisis computacional del NCBI Blast Short-Peptides y la base de datos TIGR (The Institute of Genome Research).

Al hacer un alineamiento de las secuencias obtenidas de la biblioteca de 7aa, se encontró la secuencia NHWASPR presente en 7 de las 20 clonas secuenciadas. Otra de las secuencias SPLHATL se encontró en 2 de las 20 secuencias. En total se obtuvieron 13 secuencias diferentes. La comparación de las secuencias, basada en la frecuencia de aminoácidos en las diferentes posiciones, permitió establecer la siguiente secuencia consenso: SHWAR/APN/A/R/T. La frecuencia de los diferentes aminoácidos fue de 4/13 secuencias presentaron serina (S) en la primera posición; 4/13, histidina (H) en la segunda posición; 4/13, triptofano (W) en la tercera posición; 3/13, alanina (A) en la cuarta posición; 5/13, prolina (P) en la sexta posición. En la Tabla IV se muestra cada una de las secuencias obtenidas y el número de aminoácidos que al alinearlos coinciden con los aminoácidos de la secuencia consenso.

Al hacer un alineamiento de las secuencias obtenidas de la biblioteca de 9aa, se encontraron 16 diferentes secuencias. Ninguna de las secuencias se encontró repetida y tres resultaron ser fago silvestre mientras que una secuencia provenía

aparentemente de un fago mutante. La comparación de las secuencias basada en la frecuencia de aminoácidos en las diferentes posiciones permitió establecer la siguiente secuencia consenso: CL/SA/NQ/T*S/L/PLA/TC (*= R/P/T/S/G/Q/Y). La frecuencia de los diferentes aminoácidos fue de 3/16 secuencias presentaron lisina (L) o serina (S) en la segunda posición; 3/16, alanina (A) o asparagina (N) en la tercera posición; 3/16, glutamina (Q) o treonina (T) en la cuarta posición; 4/16, lisina (L) en la séptima posición, 3/16, alanina (A) o treonina (T) en la octava posición.

En la Tabla V se muestra cada una de las secuencias obtenidas y el número de aminoácidos que al alinearlos coinciden con los aminoácidos de la secuencia consenso.

El análisis computacional en la búsqueda de homólogos (Blast y TIGR) no mostró similitud significativa con ninguna proteína de *E. histolytica*, sin embargo se encontraron en la biblioteca de 7aa (D7) dos secuencias consenso. En el caso de la biblioteca de de 9aa (C9C) también se encontró una secuencia consenso pero constituida por aminoácidos variables.

Tabla IV. Secuencias de péptidos de 7aa
obtenidas a partir de clonas de fagos aisladas en diferentes rondas de bioselección

Clona	Secuencia	HOMOLOGIA SEC. CONSENSO	Clona	Secuencia	HOMOLOGIA A SEC. CONSENSO
7.20	S P L H F P F	2/7	7.30	✓ S P L H A T L	2/7
7.21	* N H W A S P R	5/7	7.31	T I V A R S A	3/7
7.22	* N H W A S P R	5/7	7.32	T D A L R L T	2/7
7.23	* N H W A S P R	5/7	7.33	H D T V A L G	1/7
7.24	S H W L N P T	5/7	7.34	N H W A C P R	5/7
7.25	* N H W A S P R	5/7	7.35	* N H W A S P R	5/7
7.26	W D T R A H N	2/7	7.36	* N H W A S P R	5/7
7.27	S L P Q P V H	1/7	7.37	* N H W A S P R	5/7
7.28	✓ S P L H A T L	2/7	7.38	H H A P G P M	2/7
7.29	P P W N R D A	3/7	7.39	T S I S L F P	0/7
Consenso	S H N A R A P N A R T 1 2 3 4 5 6 7		Sec. Dif.	13	

● y ✓ se refieren a la misma secuencia, respectivamente

Tabla V. Secuencias de péptidos de 9aa
obtenidas a partir de clonas de fagos aisladas en diferentes rondas de bioselección

Clona	Secuencia	Homolo gía con sec. Con.	Clona	Secuencia	Homolo gía con sec. Con.
9.20	WT	-	9.30	C K K T Q P L T C	7/9
9.21	C L T S R G S A C	5/9	9.31	C S C Q Y Y T Q C	5/9
9.22	C Q A D P A A L C	3/9	9.32	C P A Q S S Q S C	6/9
9.23	WT	-	9.33	C P Q P G L H A C	5/9
9.24	C Y M R T I M H C	3/9	9.34	C A G R Y S S H M C	4/9
9.25	C S F Q H S R A C	6/9	9.35	WT	-
9.26	C R N F G L L A T C	7/9	9.36	C N L A L R F N C	2/9
9.27	C L A T S L R R C	7/9	9.37	C N N A T N K S C	4/9
9.28	C S N H P E A G C	5/9	9.38	C L S V F V L I L Q C?	-
9.29	C L L T Q P L T C	8/9	9.39	C C M R R P L L C	5/9
	* = R/P/T/S/G/Q/Y				
Consenso	C L T R A M Q T * S L P L A T C		Sec. Dif.	16	

WT: fago silvestre

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El gen de la proteína rica en cisteínas de 29 kDa (CREHP) se logró fusionar al gen de la subunidad B de la toxina del cólera (CtxB). La proteína de fusión de 40 kDa se expresó en un sistema bacteriano y se purificó en suficiente cantidad para los ensayos de inmunización. La funcionalidad de CtxB se demostró por ensayos de unión a GM1 por ensayos de ELISA. Con este ensayo se demostró que CtxB expresada en fusión con la CREHP mantuvo su capacidad de unirse a GM1 y por lo tanto, como se ha reportado, podría ejercer su función de adyuvante de la respuesta secretora al facilitar la toma de CREHP por las células M de las placas de Peyer y su presentación a las células efectoras adyacentes. Por otra parte, la infección intracecal en el modelo murino de amibiasis intestinal con cultivos de amibas axénicas, mostró características macroscópicas que se relacionan con una infección severa; además en el examen microscópico de los cortes histológicos se observó daño del epitelio intestinal en diferentes grados. La reproducción del modelo sin la asociación de las amibas con *E. coli* representa un paso importante en la obtención de un modelo experimental de amibiasis intestinal confiable, controlable y reproducible.

Teniendo los elementos necesarios para la inmunización, se administró la proteína recombinante combinada con TC por vía oral a un grupo de ratones C3H/HeJ, mientras que los controles sólo recibieron TC y PBS. El protocolo empleado resultó en la generación de una respuesta IgA secretora anti-CREHP en solo 5 de 8 animales. Sin embargo, la generación de la respuesta es clara; especialmente en dos de los ratones que mostraron niveles elevados de IgA, cuando se compara con los controles. Concomitante con la respuesta secretora, se generó una alta respuesta sérica específica anti-CREHP representada por anticuerpos de isotipo IgM en todos los ratones inmunizados. El hecho de que la respuesta sérica fuera uniforme entre los diferentes ratones a diferencia de la respuesta secretora, sugiere que CREHP/CtxB fue absorbida en el intestino, pero que por razones desconocidas no fue capaz de generar una respuesta secretora IgA en algunos ratones. Esto podría estar asociado a variables difíciles de controlar cuando se administra preparados por vía oral y de manera mecánica (rejurgitación, niveles de absorción, etc). Es importante señalar que ambos tipos de respuesta parecen estar dirigidos contra la CREHP en lugar de la CtxB, ya que los animales inmunizados solo con TC (que contiene CtxB) no mostraron reacción

significativa en ninguno de los ELISAS contra CREHP/CtxB. Por otra parte, la presencia de anticuerpos del isotipo IgM después de un protocolo de Inmunización de un mes, sugiere una falta de maduración de isotipo que se relaciona con los resultados obtenidos de las proliferaciones celulares.

Los ensayos de proliferación celular llevados a cabo sobre los esplenocitos de los ratones inmunizados y después del reto con *E. histolytica* mostraron una falta de respuesta (anergia) de las células de los ratones inmunizados con CREHP/CtxB a los diferentes estímulos que se emplearon: ConA (lectina mitogénica por excelencia), antígeno de amiba y anti-CD3. El hecho de que la respuesta celular estuviera abatida en los ratones inmunizados por vía oral con CREHP/CtxB, pero no en los controles incluyendo los que recibieron TC, así como el hecho de que a pesar de estar infectados con amibas los controles sí respondieron (hay reportes de inmunosupresión por infección con *E. histolytica*¹²⁹), demuestra que la falta de respuesta está asociada a la administración de CREHP. La deficiencia en la respuesta celular involucra la vía principal de activación y señalización de la célula T (MHC:TCR-CD3) ya que los esplenocitos no respondieron ante el estímulo de los anticuerpos anti-CD3. Como era de esperarse no hubo respuesta a través de anti-CD28 ya que este es un correceptor que participa en la segunda vía de activación del linfocito T a través de su unión natural con correceptores de la familia B7 presentes en las células presentadoras de antígeno. La vía de CD28 contribuye a la expresión de los receptores para las citocinas autócrinas de las células T¹²⁰. Ante la ausencia de respuesta a través de estas vías, las células T no proliferan ni producen citocinas, algunas de ellas necesarias para otros fenómenos como la maduración de isotipo de anticuerpos. Esto podría explicar la presencia de los anticuerpos IgM en los sueros de los ratones inmunizados con CREHP/CtxB, ya que éstos no habrían madurado a IgG debido a la ausencia de citocinas de células T CD4+ ayudadoras.

La respuesta de anticuerpos IgA secretores con ausencia de respuesta celular sistémica, se ha relacionado con un estado de tolerancia oral, un fenómeno fisiológico frecuente a antígenos y otras moléculas que penetran por esta vía. La tolerancia oral es el mecanismo por el cual el organismo regula la respuesta a nivel de la mucosa del tracto gastrointestinal, inhibiéndola en el caso de la gran cantidad de moléculas que penetran con los alimentos o activándola en el caso de agentes patógenos. El mecanismo que controla esta dualidad no es del todo conocido, pero se sugiere que es dependiente del grado de inflamación que la molécula o el microorganismo es capaz de

causar en el epitelio Intestinal¹³⁰. Así, se sugiere que existe un cierto umbral de inflamación que si es sobrepasado despierta la respuesta inmune y en caso contrario la apaga a través de la tolerancia oral. Con respecto a la tolerancia (falta de respuesta) son varios los mecanismos que se han propuesto: I) la generación de TGFβ por células Th3 reguladoras^{118,119}, II) la generación de linfocitos B provenientes del peritoneo que producen IgA de una manera independiente de células T¹³¹, III) la generación de linfocitos B que fagocitan gran cantidad de antígeno soluble¹³², IV) la participación de correceptores MHC CD1 y gp180 presentes en enterocitos¹²⁸ y V) por un mecanismo de migración del antígeno al hígado con activación de células de Kupffer locales¹³³.

Se ha documentado ampliamente que la administración de la TC o de su subunidad CtxB no producen tolerancia y que incluso impiden el desarrollo de la misma contra antígenos que se administren con ellas. Fue por esta razón y por su actividad adyuvante de IgA, que se decidió fusionar la CREHP con CtxB. Sin embargo, existen algunos reportes recientes de generación de tolerancia periférica por administración oral de algunos antígenos acoplados a un adyuvante como CtxB¹¹⁶. De igual forma, existe discrepancia entre si la TC abroga la tolerancia o no, ya que uno de los primeros experimentos realizados afirma la reversión de tolerancia con TC¹¹⁶, mientras que uno muy reciente reporta que en su caso TC no revirtió la tolerancia contra una proteína recombinante fusionada a CtxB, algo muy semejante a lo que se observó en nuestro caso¹¹⁷. Así, en nuestro caso parece ser que se generó una tolerancia oral a pesar de que la proteína estaba fusionada a CtxB y que además se administró TC.

Dentro de los tipos de tolerancia oral descritos hasta ahora, el de supresión parece ser el que se indujo con CREHP/CtxB. En este caso, se puede generar una respuesta local con ausencia de respuesta periférica generalmente debida a la administración de dosis repetidas de bajas concentraciones de antígeno (hasta 5 mg). En el otro caso de tolerancia oral anérgica o de deleción clonal, no hay respuesta en ninguno de los compartimentos Inmunes asociado a la administración de altas dosis de antígeno (25-500 mg)¹¹⁸.

La generación de tolerancia oral por supresión podría tener que ver con los resultados negativos de protección. Así, la mayoría de los ratones inmunizados desarrollaron la infección al igual que los controles, incluso en aquellos que desarrollaron respuesta de tipo IgA específica. La clave podría ser la necesidad de la generación de la respuesta IgA en mucosas, además de la activación de la respuesta celular sistémica, ya que en experimentos previos se había logrado obtener cierto nivel de protección contra la

amiba utilizando un protocolo que bloqueaba la posibilidad de generar una tolerancia (administración de una dosis intraperitoneal del antígeno). Esta observación correlaciona con el hecho de que sólo los pacientes recuperados de absceso hepático y que por lo tanto ya desarrollaron una respuesta periférica humoral y celular contra la amiba, muestran cierto nivel de inmunidad protectora a la reinfección.

El establecimiento de un protocolo para ensayos de protección no es algo fácil. Queda claro que es sumamente importante establecer un protocolo de inmunización muy detallado tomando en cuenta múltiples variables como la proteína candidato, el adyuvante que se usará, la vía de administración, las dosis empleada, el número de veces de estas y su intervalo de aplicación. La mayoría de las veces estos protocolos se van estableciendo de manera empírica debido a la gran cantidad de variables que deben ser tomadas en cuenta. Basados en estos resultados y en algunas otras observaciones, el grupo de trabajo se encuentra analizando nuevos protocolos y formas de administrar los antígenos, entre ellos el consumo de plantas y frutos transgénicos, así como la inmunización en mucosas con ADN.

Otra posibilidad es la identificación de nuevos antígenos o de manera más específica sus epítomos, sobretodo pertenecientes a proteínas de superficie. En este sentido, la técnica de Phage Display es una de las opciones más adecuadas. En este trabajo, adicional a el intento de protección con la proteína recombinante, hemos identificado varios epítomos a través de la técnica de Phage Display utilizando sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (AHA). Se aislaron 40 diferentes clonas a partir de dos bibliotecas de fagos (C7C, D7), que reaccionaron con anticuerpos comunes de dos pacientes con estas características. Interesantemente, de la biblioteca de 7 aa se identificó un péptido presente en 7 de las 20 clonas, lo que implica que se trata de un epítomo ó mimótopo (secuencia diferente al epítomo, pero con semejante estructura) real, contra el cual está dirigida buena parte de la respuesta humoral de AHA. De la librería de 9 aa no se pudo identificar ninguna secuencia repetida entre las clonas, sin embargo, al igual que la de 7 aa, el alineamiento mostró varios aminoácidos conservados en las diferentes posiciones dentro del péptido, lo que permitió establecer un par de secuencias consenso: SHWAR/APN/A/R/T para la de 7 aa y CL/SA/NQ/T*S/L/PLA/TC (*= R/P/T/S/G/Q/Y) para la de 9aa. La búsqueda de homologías en la base de datos del NCBI a nivel de aminoácidos, mostró que algunas secuencias tienen cierta homología con algunas proteínas de otros protozoarios como *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*, pero no con proteínas de *E. histolytica*. De

igual forma, la búsqueda de homología en la base de datos TIGR para *E. histolytica* (proyecto de secuenciación del genoma de *E. histolytica*) a nivel de nucleótidos, que es lo que ellos reportan, no mostró homologías significativas. Esto podría indicar, que las secuencias identificadas son en realidad mimótopos mas que epitopos y que por lo tanto no muestran homología con las proteínas reportadas. También es posible, que sean epitopos de antígenos de la amiba aún no identificados y cuya secuencia genómica es también aun desconocida. Cualquiera sea el caso, el hecho de que al menos una de las secuencias sea tan ampliamente identificada abre la posibilidad de utilizarla como candidato a vacunación o como herramienta de diagnóstico que es otra área de sumo interés en el campo de la amibiasis ya que el kit que actualmente se emplea (*Entamoeba histolytica* Kit II, TecLab Virginia, USA) es sumamente costoso y por lo tanto difícil de adquirir, sobretodo en poblaciones de tercer mundo, entre las cuales está México. La caracterización completa de estas clonas sigue su curso en nuestro grupo de trabajo, para que en un plazo no muy lejano sean empleadas en experimentos de protección en mucosas o bien para desarrollar un método de diagnóstico de la amibiasis práctico y a un bajo costo.

Hasta ahora no se han reportado trabajos de vacunación efectiva contra la gran cantidad de parásitos protozoarios patógenos para el hombre con excepción de malaria, en donde la vacuna sigue en experimentación. Aún más árido es el campo de la vacunación oral contra parásitos protozoarios, entre ellos la amiba. Por otro lado, no hay que perder de vista que gran parte de los sistemas de vacunación vigentes tanto contra virus como contra bacterias emplean a los organismos vivos o atenuados⁶³, pero también los riesgos del uso de organismos atenuados son considerables. Desafortunadamente, el uso de trofozoitos completos no es una opción, sin embargo, el uso de membranas totales o proteínas recombinantes de las cuales se puedan eliminar (por diferentes técnicas) las proteínas o epitopos que favorezcan la infección podría ser otra estrategia a considerar. O bien, buscar compuestos naturales como la leche materna y sus elementos con actividad anti-microbiana, cuyo efecto al parecer va mas allá que solo los anticuerpos IgA. Así, se sugiere que sus carbohidratos podrían también tener un papel en la protección observada contra algunos patógenos¹²¹. En ese sentido, estudios como el descrito en esta tesis contribuyen a la comprensión del fenómeno Inmunológico asociado a la administración de una vacuna oral contra *E. histolytica* y con ello a los probable mecanismos de protección contra éste y otros parásitos.

VII. REFERENCIAS

- 1 Lesh, F. A. (1975). "Massive development of amebas in the large intestine. Fedor Aleksandrovich Lesh (Losch)." *Am J Trop Med Hyg* 24(3): 383-92.
- 2 Osler W, "On the *Amoeba coli* in dysentery in the large intestine". Translated and reprinted in *Am J Trop Med Hyg* 1875; 24:383-392.
- 3 Councilman WT, Lafleur HA. Amebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp Rep*, 1891; 2: 395-548.
- 4 Schaudinn F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden (Vorläufige Mitteilung) *Arb Kaiserlichen Gesundheitsamte* 1903; 19: 547-576.
- 5 Walker EL, Sellards AW. Experimental entamoebic dysentery. *Philippine J Sci B Troo Med* 1913; 8: 253-330.
- 6 Sargeant, P. G., J. E. Williams, et al. (1978). "The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72(5): 519-21.
- 7 Sargeant, P. G. and J. E. Williams (1979). "Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73(2): 225-7.
- 8 Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40: 340-4.
- 9 Brumpt E. Etude sommaire de l' '*Entamoeba dispar*' n. sp. Amibe á kystes quadrinucléées, parasite de l'homme. *Bull Acad Med (Paris)* 1925; 94:943-952.
- 10 Cavalier-Smith, T. (1993). "Kingdom protozoa and its 18 phyla." *Microbiol Rev* 57(4): 953-94.
- 11 Silberman, J. D., C. G. Clark, et al. (1999). "Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences." *Mol Biol Evol* 16(12): 1740-51.
- 12 Azam, A., J. Paul, et al. (1996). "Identification of novel genes from *Entamoeba histolytica* by expressed sequence tag analysis." *Gene* 181(1-2): 113-6.
- 13 Cavalier-Smith, T. (1998). "A revised six-kingdom system of life." *Biol Rev Camb Philos Soc* 73(3): 203-66.
- 14 Reeves, R. E. (1984). "Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903." *Adv Parasitol* 23: 105-42.

- 15 Rosenthal, B., Z. Mai, *et al.* (1997). "Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*." *J Bacteriol* 179(11): 3736-45.
- 16 Mai, Z., S. Ghosh, *et al.* (1999). "Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*." *Mol Cell Biol* 19(3): 2198-205.
- 17 Rodriguez, M. A., R. M. Garcia-Perez, *et al.* (1998). "The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*." *Microb Pathog* 25(1): 1-10.
- 18 Albach, R. A. (1989). "Nucleic acids of *Entamoeba histolytica*." *J Protozool* 36(2): 197-205.
- 19 Sogin, M. L., J. H. Gunderson, *et al.* (1989). "Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*." *Science* 243(4887): 75-7.
- 20 Meza, I. (1992). "*Entamoeba histolytica*: phylogenetic considerations. A review." *Arch Med Res* 23(2): 1-5.
- 21 Torres-Guerrero, H., D. A. Peattie, *et al.* (1991). "Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*." *Mol Biochem Parasitol* 45(1): 121-30.
- 22 Fodinger, M., S. Ortner, *et al.* (1993). "Pathogenic *Entamoeba histolytica*: cDNA cloning of a histone H3 with a divergent primary structure." *Mol Biochem Parasitol* 59(2): 315-22.
- 23 Que X. and S. L. Reed (2000). "Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis." *Clin Microbiol Rev* 13 (2): 196-206.
- 24 Arguello, C., B. Valenzuela, *et al.* (1992). "Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites." *Arch Med Res* 23(2): 77-80.
- 25 Meza I, Torres-Guerrero HK, Meraz MA. Molecular Organization of *Entamoeba histolytica*. In Kretschmer R, Ed. Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990:123.
- 26 Cicquaud CR. Etude de l'ultrastructure du nayou et de la mitose de *Entamoeba histolytica*. *Biol Cell* 1979: 33:505.
- 27 Bhattacharya, A., S. Satish, *et al.* (2000). "The genome of *Entamoeba histolytica*." *Int J Parasitol* 30(4): 401-10.

- 28 Tovar, J., A. Fischer, *et al.* (1999). "The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*." *Mol Microbiol* 32(5): 1013-21.
- 29 Albach RA. *Nucleic acids of Entamoeba histolytica*. *J Protozool* 1989; 36 : 197.
- 30 Garfinkel, L. I., M. Giladi, *et al.* (1989). "DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes." *Infect Immun* 57(3): 926-31.
- 31 Clark, C. G. and L. S. Diamond (1991). "Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct." *Mol Biochem Parasitol* 49(2): 297-302.
- 32 Clark, C. G. and L. S. Diamond (1991). "The Laredo strain and other '*Entamoeba histolytica*-like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*." *Mol Biochem Parasitol* 46(1): 11-8.
- 33 Tannich, E., R. D. Horstmann, *et al.* (1989). "Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*," *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(13): 5118-22.
- 34 Tannich, E. and G. D. Burchard (1991). "Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*." *J Clin Microbiol* 29(2): 250-5.
- 35 Que, X. and S. L. Reed (1991). "Nucleotide sequence of a small subunit ribosomal RNA (16S-like rRNA) gene from *Entamoeba histolytica*: differentiation of pathogenic from nonpathogenic isolates." *Nucleic Acids Res* 19(19): 5438.
- 36 Cruz-Reyes, J. A., W. M. Spice, *et al.* (1992). "Ribosomal DNA sequences in the differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*." *Parasitology* 104 (Pt 2): 239-46.
- 37 Cevallos, M. A., H. Porta, *et al.* (1993). "Sequence of the 5.8S ribosomal gene of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*." *Nucleic Acids Res* 21(2): 355.
- 38 WHO weekly epidemiological record, no. 14, 4 april 1997.
- 39 Meza, I., M. Sabanero, *et al.* (1983). "Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*." *J Biol Chem* 258(6): 3936-41.
- 40 Bhattacharya S, Battacharya A, Diomand LS, Soldo AT. Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA, *J Protozool* 1989; 36: 455.
- 41 Arhets, P., Z. Rahim, *et al.* (1992). "Identification of a myosin heavy chain gene from *Entamoeba histolytica*." *Arch Med Res* 23(2): 41-3.

- 42 Raymond-Denise, A., P. Sansonetti, *et al.* (1993). "Identification and characterization of a myosin heavy chain gene (mhCA) from the human parasitic pathogen *Entamoeba histolytica*," *Mol Biochem Parasitol* 59(1): 123-31.
- 43 Sanchez, M. A., D. A. Peattie, *et al.* (1994). "Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* alpha-tubulin-encoding gene." *Gene* 146(2): 239-44.
- 44 Bruchhaus, I. and E. Tannich (1993). "Analysis of the genomic sequence encoding the 29-kDa cysteine-rich protein of *Entamoeba histolytica*." *Trop Med Parasitol* 44(2): 116-8.
- 45 Flores, B. M., M. A. Batzer, *et al.* (1993). "Structural analysis and demonstration of the 29 kDa antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica* as the major accessible free thiol-containing surface protein." *Mol Microbiol* 7(5): 755-63.
- 46 Reed, S. L., B. M. Flores, *et al.* (1992). "Molecular and cellular characterization of the 29-kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates." *Infect Immun* 60(2): 542-9.
- 47 Torian, B. E., B. M. Flores, *et al.* (1990). "cDNA sequence analysis of a 29-kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16): 6358-62.
- 48 Tachibana, H., S. Kobayashi, *et al.* (1990). "Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000-Mr antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody." *Infect Immun* 58(4): 955-60.
- 49 Stanley, S. L., Jr., K. Tian, *et al.* (1995). "The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues." *J Biol Chem* 270(8): 4121-6.
- 50 Gilchrist, C. A. and W. A. Petri (1999). "Virulence factors of *Entamoeba histolytica*." *Curr Opin Microbiol* 2(4): 433-7.
- 51 Zhai, Y. and M. H. Saier, Jr. (2000). "The amoebapore superfamily." *Biochim Biophys Acta* 1469(2): 87-99.
- 52 Carrero, J. C. and J. P. Lalette (1996). "Molecular biology of *Entamoeba histolytica*: a review." *Arch Med Res* 27(3): 403-12.
- 53 Walsh, J. A. (1986). "Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality." *Rev Infect Dis* 8(2): 228-38.
- 54 .Pérez-Tamayo R. Microbios y enfermedades. Ciencia (2000), México. Pp : 73-82.

- 55 Gathiram, V. and T. F. Jackson (1985). "Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population." *Lancet* 1(8431): 719-21.
- 56 Martinez-Garcia, M. C., G. Gutierrez-Trujillo, et al. (1990). "Efficacy of zymodemes of *E. histolytica* technique in an epidemiologic study and report of new zymodemes in Mexico." *Arch Invest Med (Mex)* 21 Suppl 1: 203-8.
- 57 Cevallos AM. Manson's Tropical Diseases, Saunders. 21st Edition. London, U.K. (In press).
- 58 Irusen EM, Jackson TF, Simjee AE. Asymptomatic intestinal colonization by pathogenic *Entamoeba histolytica* in amebic liver abscess: prevalence, response to therapy, and pathogenic potential. *Clin Infect Dis.* 1992 Apr;14(4):889-93.
- 59 Hughes MA, Petri WA Jr. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am.* 2000 Sep;14(3):565-82, viii. Review.
- 60 Cliver DO. "Food Diseases". Academic Press, Inc. San Diego California, 1990. Pg 3-36.
- 61 Sanz, ML. Inmunidad y Prevención de la Alergia de Alimentos. *Allergol Immunol Clin* 2001;16 (Extraordinario Núm. 2): 58-75
- 62 Hanson LA, Luidin S, Karlsson M, Dahlman-Hoglund A, Dahlgren U, Telemo E. Regulation of the Immune Response to Oral Administration of Antigens in Food Experimental Animals. *Nutritional research* 1998; 18: 1343-1350.
- 63 Nossal GJ. Vaccines. *Fundamental Immunology* 4th EdtIn, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999.
- 64 Freud J, McDermott K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1942 ; 49:548-553.
- 65 Gruber WC, Belshe RB, King JC, Treanor JJ, Piedra PA, Wright PA, et al. Evaluation of live attenuated influenza vaccines in children 6-18 months of age: safety, immunogenicity, and efficacy. *J Infect Dis* 1996;173:1313-9.
- 66 Welner DB, Kennedy RC. Genetic vaccines. *Sci Am* 1999;281:50-7.
- 67 Holmgren, J., N. Lycke, and C. Czerkinsky. 1993 Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 11(12):1179-1184.
- 68 Spangler, B.D. 1992 Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56:622-647.

- 69 Haq, T.A., H.S. Mason, J.D. Clements, and C.J. Arntzen. 1995 Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:7147-16.
- 70 Arntzen, C.J., H.S. Mason, J. Shi, T.A. Haq, M.K. Estes, and J.D. Clements. 1994 Production of candidate oral vaccines in edible tissues of transgenic plants. Pp. 339-344 In *Vaccines '94*, F. Brown, R.M. Chanock, H.S. Ginsberg, and R.A. Lerner, eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- 71 Mason, H. S., T. A. Haq, *et al.* (1998). "Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene." *Vaccine* 16(13): 1336-43.
- 72 Tacket, C. O., H. S. Mason, *et al.* (2000). "Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes." *J Infect Dis* 182(1): 302-5.
- 73 Beetham, P. R., P. B. Klpp, *et al.* (1999). "A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15): 8774-8.
- 74 Chen, Y., J. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V.K. Kuchroo, and H.L. Weiner. 1995 Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376:177-189.
- 75 Matzinger, P. 1994 Tolerance, danger, and the extended family. *Ann. Rev. Immunol.* 12:991-1045.
- 76 Kagnoff, M.F. 1996 Mucosal immunology: new frontiers. *Immunol. Today* 17:57-59.
- 77 Bendelac, A. 1995 CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science* 269:185-192.
- 78 MacDonald, T.T. 1982 Enhancement and suppression of Peyer's patch immune response by systemic priming. *Clin. Exp. Immunol.* 49:441.
- 79 Pierce, N.F. 1978 The role of antigen form and function in the primary and secondary intestinal immune responses to cholera toxin and toxoid in rats. *J. Exp. Med.* 148:195.
- 80 Koster, F.T., and N.F. Pierce. 1983 Parenteral immunization causes antigen-specific cell-mediated suppression of an intestinal IgA response. *J. Immunol.* 131:115.

- 81 Hamilton, S.R., J.H. Yardley, and G.D. Brown. 1979 Suppression of local intestinal immunoglobulin A immune response to cholera toxin by subcutaneous administration of cholera toxoids. *Infect. Immun.* 24:422.
- 82 De León, A. 1970. Pronóstico tardío en el absceso hepáticoamibiano. *Arch Invest Med. México* 1:s205-s206.
- 83 Salata, R. A., J. G. Cox, et al. (1987). "The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoebae by lectin-dependent lymphocytes." *Parasite Immunol* 9(2): 249-61.
- 84 Stanley, S. L., Jr. (1997). "Progress towards development of a vaccine for amebiasis." *Clin Microbiol Rev* 10(4): 637-49.
- 85 Ortiz-Ortiz, L., N. Mora, et al. (1998). "Secretory immune response in patients with intestinal amoebiasis." *Parasite Immunol* 20(10): 503-7.
- 86 Kelsall, B. L. and J. I. Ravdin (1995). "Immunization of rats with the 260-kilodalton *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has in vitro adherence-inhibitory activity." *Infect Immun* 63(2): 686-9.
- 87 Haque, R., I. M. Ali, et al. (2001). "Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children." *J Infect Dis* 183(12): 1787-93.
- 88 Stanley, S. L., Jr., T. F. Jackson, et al. (1991). "Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein." *Jama* 266(14): 1984-6.
- 89 Petri, W. A., Jr., T. L. Snodgrass, et al. (1990). "Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence." *J Immunol* 144(12): 4803-9.
- 90 Ravdin, J. I., W. A. Petri, et al. (1986). "Production of mouse monoclonal antibodies which inhibit in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites." *Infect Immun* 53(1): 1-5.
- 91 Ravdin, J. I., T. F. Jackson, et al. (1990). "Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*." *J. Infect Dis* 162(3): 768-72.
- 92 Soong, C. J., B. E. Torian, et al. (1995). "Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen." *Infect Immun* 63(2): 472-7.

- 93 Flores, B. M., M. A. Batzer, et al. (1993). "Structural analysis and demonstration of the 29 kDa antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica* as the major accessible free thiol-containing surface protein." *Mol Microbiol* 7(5): 755-63.
- 94 Reed, S. L., B. M. Flores, et al. (1992). "Molecular and cellular characterization of the 29-kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates." *Infect Immun* 60(2): 542-9.
- 95 Torian, B. E., B. M. Flores, et al. (1990). "cDNA sequence analysis of a 29-kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16): 6358-62.
- 96 Flores, B. M., S. L. Reed, et al. (1993). "Serologic reactivity to purified recombinant and native 29-kilodalton peripheral membrane protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *J Clin Microbiol* 31(6): 1403-7.
- 97 Soong, C. J., B. E. Torian, et al. (1995). "Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen." *Infect Immun* 63(2): 472-7.
- 98 Carrero, J. C., P. Petrossian, et al. (2000). "Cloning and characterization of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by human secretory IgA antibodies." *Parasitol Res* 86(4): 330-4.
- 99 Zhang, T., P. R. Cieslak, et al. (1994). "Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen." *Infect Immun* 62(4): 1166-70.
- 100 Zhang, T., P. R. Cieslak, et al. (1994). "Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen." *Infect Immun* 62(4): 1166-70.
- 101 Soong, C. J., K. C. Kain, et al. (1995). "A recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin is efficacious as a subunit vaccine in the gerbil model of amebic liver abscess." *J Infect Dis* 171(3): 645-51.
- 102 Zhang, T., E. Li, et al. (1995). "Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response." *Infect Immun* 63(4): 1349-55.
- 103 Zhang, T. and S. L. Stanley, Jr. (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(5): 1526-31.
- 104 Lotter, H., F. Khajawa, *et al.* (2000). "Protection of gerbils from amebic liver abscess by vaccination with a 25-mer peptide derived from the cysteine-rich region of *Entamoeba histolytica* galactose-specific adherence lectin." *Infect Immun* 68(8): 4416-21.
- 105 Cheng, X. J. and H. Tachibana (2001). "Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by immunization with the 150- and 170-kDa surface antigens of *Entamoeba histolytica*." *Parasitol Res* 87(2): 126-30.
- 106 Manoutcharian, K., G. Gevorkian, *et al.* (2001). "Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents." *Curr Pharm Biotechnol* 2(3): 217-23.
- 107 Irving, M. B., O. Pan, *et al.* (2001). "Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics." *Curr Opin Chem Biol* 5(3): 314-24.
- 108 Greenwood, J., A. E. Willis, *et al.* (1991). "Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens." *J Mol Biol* 220(4): 821-7.
- 109 Schellekens, G. A., E. Lasonder, *et al.* (1994). "Identification of the core residues of the epitope of a monoclonal antibody raised against glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 by screening of a random peptide library." *Eur J Immunol* 24(12): 3188-93.
- 110 Bastien, N., M. Trudel, *et al.* (1997). "Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus." *Virology* 234(1): 118-22.
- 111 Grabowska, A., C. Jameson, *et al.* (1999). "Identification of type-specific domains within glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) recognized by the majority of patients infected with HSV-2, but not by those infected with HSV-1." *J Gen Virol* 80 (Pt 7): 1789-98.
- 112 Yu, M. W., J. K. Scott, *et al.* (2000). "Characterization of murine coronavirus neutralization epitopes with phage-displayed peptides." *Virology* 271(1): 182-96.
- 113 Folgori, A., R. Tafi, *et al.* (1994). "A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera." *Embo J* 13(9): 2236-43.

- 114 Scala, G., X. Chen, *et al.* (1999). "Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera." *J Immunol* 162(10): 6155-61.
- 115 Carrero JC, Inmunización Oral con Antígenos de *Entamoeba histolytica* Clonados a través de Anticuerpos IgA Secretores. Tesis Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, 1998.
- 116 Sun, J. B., J. Holmgren, *et al.* (1994). "Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23): 10795-9.
- 117 Kato, H., K. Fujihashi, *et al.* (2001). "Oral tolerance revisited: prior oral tolerization abrogates cholera toxin-induced mucosal IgA responses." *J Immunol* 166(5): 3114-21.
- 118 Garside, P. and A. M. Mowat (2001). "Oral tolerance." *Semin Immunol* 13(3): 177-85.
- 119 Weiner, H. L. (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells." *Microbes Infect* 3(11): 947-54.
- 120 Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. *Immuno Biology "the immune system in health and disease"* 4th Ed. Elsevier Science Limited. Pg 263-303, 1999.
- 121 Erney R, Hilty M, Pckering L, Ruiz-Palacios G, Prieto P. Human milk oligosaccharides: a novel method provides insight into human genetics. *Adv Exp Med Biol.* 2001;501:285-97.
- 122 Chavéz-Munguía B, Espinosa-Castellano M, Castañón G, Martínez-Palomo A. Ultrastructural Evidence of Smooth Endoplasmic Reticulum and Golgi-Like Elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* 31 (2000): S165-S167.
- 123 Petri WA, Ravdin JI. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1991 Jan; 59(1):97-101.
- 124 Cheng XJ, Tachibana H, Kaneda Y. Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by monoclonal antibody to a 150 kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 1999 85: 78-80.
- 125 Petri WA Jr, Snodgrass TL, Jackson TF, Gathiram V, Simjee AE, Chadee K, Chapman MD. Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *J Immunol* 1990 Jun 15; 144(12): 4803-9.

- 126 Ghosh PK, Mancilla R, Ortiz-Ortiz L. Intestinal amebiasis: histopathologic features in experimentally infected mice. *Arch Med Res* 1994 Autumn; 25(3): 297-302.
- 127 Boyaka PN, Marlano M, Vancott JL, Takahashi I, Fujihashi K, Yamamoto M, Van Gilkel FW, Jackson RJ, Kiyono H, McGhee JR. Strategies for mucosal vaccine development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(4), 1999, pp 35-45.
- 128 Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells-polarity and complexity. *Immunology Today*, March, 21(3), 2000 pp 123-128.
- 129 Ghosh PK, Castellanos-Barba C, Ortiz-Ortiz L. Intestinal amebiasis: cyclic suppression of the immune response. *Parasitol Res.* 1995;81(6):475-80.
- 130 Ernst PB, Song F, Klimpel GR, Haeblerle H, Bamford B, Crowe SE, Ye G, Reyes VE. Regulation of the mucosal immune response. *Am J Trop Med Hyg.* 60(4), 1999, pp 2-9.
- 131 Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T-cell independent mechanism of intestinal mucosal IgA response to commensal bacteria. *Science*. June, 288 pp 2222-2226.
- 132 Eynon E, Parker D. Small B cell as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med.* 1992; 175: 131-138.
- 133 Rodoff T and Lipsky P. Role of the Kupffer cells in local and systemic immune response. *Gastroenterology* 1981; 854-860.
- 134 Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular Cloning "A Laboratory Manual"*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 135 Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 136 Lowry OH, Rosebrouch NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951. 193: 265-275.
- 137 Diamond L. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* (1961) 134, 336-339.