



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE LA
LIPOPÉPTIDOFOSFOGLICANA (LPPG) DE *ENTAMOEBAS HISTOLYTICA* CEPA
HM1-IMSS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MAURICIO CÁRDENAS RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Rodolfo Pastelin Palacios

VOCAL: QFB Abel Gutiérrez Ramos

SECRETARIO: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio

1ER SUP.: Dr. Enrique Ortega Soto

2DO SUP.: QFB José Cordero Hernández

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Hospital Juárez de México.

Dr. Mario Adán Moreno Eutimio

Asesor

Dr. Armando Isibasi Araujo

Supervisor técnico

Mauricio Cárdenas Rodríguez

Sustentante

Dedicatoria

A mi mamá y mi papá por el cariño, el apoyo incondicional, la paciencia, la orientación y enseñarme todo para ser una buena persona y lograr una meta tan importante en mi vida.

A mi hermana y hermano por su cariño, su apoyo y estar conmigo en todo momento, bueno o malo.

A mis amigos que se han convertido en parte de mi familia.

Agradecimientos

Al Dr. Armando Isibasi por darme la oportunidad de participar en este trabajo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica a su cargo y sobre todo por ser un ejemplo a seguir en todos aspectos, por la excelente persona que es, por sus enseñanzas y por darme siempre su apoyo, cariño y amistad.

Al Dr. Mario Adán por aceptar ser mi tutor, por su apoyo como asesor de este trabajo, por compartir sus conocimientos conmigo y por sus consejos y enseñanzas.

A Anahí Castro, Gustavo Aldapa, Ilka Boscó, Ismael Sánchez, Mireille Gutiérrez, Rafael Torres, Sofía Magaña por toda su ayuda y en especial por su amistad.

Al Dr. Rodolfo Pastelín por su ayuda y su apoyo para la crítica de este trabajo.

Al QFB Emiliano Hisaki y el Biol. Pablo Vieyra por su ayuda, consejos y estar siempre que tuve una pregunta.

A la Dra. Ingeborg Becker, al Sr. Ricardo Vargas Orozco y el MVZ Daniel Sánchez Almaráz de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por las facilidades prestadas y colaboración para el trabajo con animales.

A mis compañeros de la UIMIQ por hacer la estancia en el laboratorio tan amena, motivante y agradable.

Índice

| | | |
|------|--|----|
| | Abreviaturas | 7 |
| I. | Resumen | 10 |
| II. | Introducción | 11 |
| | A. Sistema inmunitario | 11 |
| | A.1 Respuesta inmunitaria innata | 11 |
| | A.2 Respuesta inmunitaria adaptativa | 13 |
| | A.2.1 Linfocitos T | 13 |
| | A.2.2 Linfocitos B | 14 |
| | B. Inmunidad innata como base de la inmunidad adaptativa | 15 |
| | C. Adyuvantes | 17 |
| | D. Receptores Tipo Toll (TLRs) | 21 |
| | E. Lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de <i>Entamoeba histolytica</i> | 26 |
| III. | Justificación | 30 |
| IV. | Hipótesis | 30 |
| V. | Objetivos | 31 |
| | A. Objetivo General | 31 |
| | B. Objetivos Particulares | 31 |
| VI. | Materiales y métodos | 32 |
| | A. Cultivo de trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> cepa HM1-IMSS | 32 |
| | B. Extracción de la LPPG de <i>E. histolytica</i> | 32 |
| | C. Cuantificación de azúcares reductores por el método de antrona | 34 |
| | D. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinonínico (BCA) | 34 |
| | E. Determinación del contenido de endotoxina | 35 |
| | F. Identificación de la LPPG por ELISA | 36 |
| | G. Modelo de inmunización de ratones con OVA | 36 |
| | H. Determinación de los títulos de anticuerpos anti-OVA en sueros de ratones | 37 |

| | | |
|--------------|--|----------------|
| VII. | Resultados |40 |
| | A. Purificación y caracterización de la LPPG. |40 |
| | B. Determinación del efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra un antígeno no inmunogénico |41 |
| VIII. | Discusión |56 |
| IX. | Conclusiones |59 |
| X. | Bibliografía |60 |

Abreviaturas

| | |
|----------------------|--|
| Abs | Anticuerpos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Ags | Antígenos |
| APC | Célula presentadora de Antígeno |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| AS04 | Sistema adyuvante 04 |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BCR | Receptor de células B |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| <i>D</i> | Gen de diversidad |
| DCs | Células Dendríticas |
| <i>E.histolytica</i> | <i>Entamoeba histolytica</i> |
| ELISA | Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas |
| GPI | Glicosil fosfatidil inositol |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| IL-2 α R | Receptor α de la interleucina 2 |
| INF | Interferón |
| IRF | Factor regulador de Interferón |
| <i>J</i> | Gen de unión |

| | |
|-------|---|
| LAL | <i>Limulus Amebocyte Lysate</i> |
| LPPG | Lipopéptidofosfoglicana |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LRRs | Repeticiones ricas en leucina |
| MAC | Complejo de ataque a membrana |
| MAL | Adaptador tipo MyD88 |
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad |
| MPL | Monofosforil lípido-A |
| MyD88 | Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 |
| NF-κB | Factor nuclear κB |
| NK | Célula asesina natural |
| NKTs | Células T asesinas naturales |
| NLRs | Receptores tipo NOD |
| nTreg | Linfocito T regulador natural |
| OVA | Ovoalbúmina |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| PRRs | Receptores de reconocimiento a patrones |
| RAG | Gen de activación de la recombinación |
| RIG | Gen inducible por ácido retinoico |
| RLRs | Receptores tipo RIG |

| | |
|------|--|
| STAT | Traductor de señal y activador de la transcripción |
| Tc | Linfocito T citotóxico |
| TCR | Receptor de células T |
| Th | Linfocito T cooperador |
| TIR | Dominio receptor Toll/IL-1 |
| TLRs | Receptores tipo Toll |
| TNF | Factor de Necrosis Tumoral |
| TRAM | Molécula adaptadora relacionada a TRIF |
| Treg | Linfocito T regulador inducible |
| V | Gen variable |

I. Resumen

Los adyuvantes son moléculas o compuestos que mejoran la potencia y duración de respuestas inmunitarias contra antígenos específicos. Pocos son los adyuvantes autorizados para su uso en vacunas humanas, entre los más conocidos se encuentran la alúmina, que es el más utilizado y el cual presenta pocos efectos adversos e induce una respuesta inmunitaria con perfil Th2, otro adyuvante utilizado es el derivado no tóxico del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* monofosforil lípido A, el cual también presenta un buen perfil de seguridad, induce principalmente una respuesta inmunitaria Th1 y activa células de la respuesta inmunitaria innata pues es un ligando del receptor tipo Toll-4 (TLR-4). Los ligandos de TLRs han demostrado ser buenos estimuladores de las células de la inmunidad innata activando entre otras a las distintas células presentadoras de antígeno (APCs), las cuáles son necesarias para montar una óptima respuesta inmunitaria adaptativa. Se han probado varios ligandos de TLRs, entre los más destacados se encuentran aquellos que señalizan a través de distintos TLRs y aquellos que lo hacen a través de TLR-4 ya que la señalización por este receptor puede generar la activación de los factores de transcripción tanto NF- κ B como IRF-3, produciendo así citocinas proinflamatorias e interferón de tipo-I. La lipopéptidofosfoglicana (LPPG) es una molécula expresada en la superficie de *Entamoeba histolytica* y se ha asociado con su patogenicidad, ésta se reconoce a través de TLR-2 y TLR-4 por células de la inmunidad innata por lo que es un buen candidato como adyuvante. En el presente trabajo se aisló y caracterizó la LPPG de la cepa virulenta HM1-IMSS, se inoculó en combinación con ovoalbúmina (OVA) en ratones hembra BALB/c y se midieron los títulos de anticuerpos (Abs) de clase IgM, IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b anti-OVA generados.

II. Introducción

A. Sistema Inmunitario

El sistema inmunitario está constituido por diversas células y moléculas sensoras y efectoras que protegen al cuerpo contra sustancias perjudiciales como toxinas o agentes que causan infecciones. Para conferir esta protección el sistema inmunitario cumple con cuatro eventos principales: reconocimiento, contención de la infección y en dado caso su eliminación, regulación y generación de memoria inmunológica [1]. En los organismos vertebrados la respuesta inmunitaria se puede clasificar de manera muy amplia como respuesta inmunitaria innata y adaptativa. La respuesta inmunitaria innata precede a la adaptativa, está presente en todos los organismos multicelulares, tiene receptores codificados en línea germinal y es la encargada de distinguir lo que es propio de lo extraño y lo que es propio pero dañino, mientras que la inmunidad adaptativa está presente sólo en vertebrados y tiene receptores que son resultado de rearrreglos de genes [2, 3]

A.1 Respuesta inmunitaria innata

La inmunidad innata está compuesta por fagocitos mononucleares y polimorfonucleares, además de otros componentes humorales, como el sistema del complemento. El complemento es un sistema lábil al calor presente en el plasma, que aumenta la opsonización y consta de un gran número de proteínas plasmáticas que interactúan entre sí y generan una cascada de reacciones tras ser activadas. El sistema de complemento puede ser activado por diferentes vías (vía clásica o común, vía alterna, vía de las lectinas, vía de la properdina y vía de la coagulación) [4] que llevan a la formación del complejo de ataque a membrana (MAC), este MAC son poros que se forman en la membrana del organismo patógeno teniendo como consecuencia una lisis osmótica. Además, varios componentes del sistema de complemento funcionan como quimioatrayentes o anafilatoxinas [1, 5].

Los fagocitos mononucleares son macrófagos y células dendríticas que comparten un origen monocítico, las células dendríticas (DCs) son altamente eficientes presentando antígenos (Ags) a células T [6]. Los macrófagos están distribuidos a lo largo del cuerpo, son residentes de los tejidos y reconocen cuando un microorganismo cruza una barrera epitelial y empieza a replicarse y junto con las DCs y otros leucocitos forman el grupo de fagocitos, llamados así por su habilidad de fagocitar o endocitar, permitiendo la lisis de microorganismos [7]. Los fagocitos polimorfonucleares son los neutrófilos, basófilos y eosinófilos, cada uno tiene características especiales: los neutrófilos son asesinos especializados de vida corta, reclutados rápidamente tras la infección y que fagocitan al microorganismo y dentro de los fagolisosomas lo destruyen mediante especies reactivas de oxígeno, proteínas y enzimas líticas, los eosinófilos son producidos en grandes números en respuesta a infecciones parasitarias y actúan principalmente mediante el contenido de sus gránulos como: la proteína catiónica eosinofílica, la neurotoxina derivada de eosinófilos o la peroxidasa eosinofílica. Los basófilos actúan gracias a su receptor de alta afinidad hacia IgE y a la degranulación que sufren liberando aminas vasoactivas, histamina y serotonina [5, 6].

Las células de la inmunidad innata detectan diversos microorganismos y otro tipo de señales mediante los llamados receptores de reconocimiento a patrones (PRRs) que detectan “firmas” moleculares de los microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs tienen tres características principales: son conservados entre especies similares, han sufrido muy pocos cambios a lo largo de la evolución y son moléculas indispensables para la supervivencia o virulencia de los microorganismos [8].

Los PRRs se clasifican en citosólicos, de membrana y secretados. Entre los secretados se encuentran las colectinas, ficolinas y pentraxinas, los receptores citosólicos son los receptores parecidos al gen inducible por ácido retinóico (RLRs), y los receptores conteniendo repeticiones ricas en leucina y dominio de unión a nucleótidos (NLRs) [8]. Entre los PRRs de membrana, los principales y

más estudiados son los TLRs, presentes en muchas células de la inmunidad innata.

A.2 Respuesta inmunitaria adaptativa

La respuesta inmunitaria adaptativa se divide en inmunidad humoral e inmunidad celular, la humoral participa en la erradicación de microorganismos en sangre u otros fluidos mediante la producción de anticuerpos (Abs) por células B y la celular participa en la eliminación de células cancerosas y microorganismos que actúan intracelularmente mediante células T. Tanto células B como células T expresan receptores únicos; receptor de células B (BCR) y receptor de células T (TCR) respectivamente [7]. Éstos no son codificados en línea germinal, sino generados a través de la recombinación de los segmentos de gen variable (*V*), unión (*J*) y diversidad (*D*) [9]. Este rearrreglo *V(D)J* es mediado por el gen de activación de la recombinación (RAG) 1 y RAG 2, son muchas las combinaciones que se pueden dar entre los diversos genes *V, D* y *J* aumentando así su repertorio en gran forma [10], lo anterior hace que las respuestas inmunitarias adaptativas sean altamente específicas [8].

A.2.1 Linfocitos T

Los linfocitos T basan su reconocimiento de Ag en su TCR y tienen la característica de no unirse directamente con el Ag, sino que reconocen fragmentos peptídicos cortos de Ag que están unidos a proteínas codificadas en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Durante la etapa de desarrollo, los linfocitos T migran al timo en una etapa temprana y son conocidos como timocitos, ahí son sometidos a diversos procesos de selección; selección positiva y negativa para convertirse en linfocitos T maduros [1, 5]. Se han identificado varios tipos de linfocitos T con funciones diferentes, entre ellos están los linfocitos T cooperadores (Th) 1, Th2, Th3, Th9, Th17, Th22, T reguladores naturales (nTreg) e inducibles (iTreg) y los linfocitos T citotóxicos (Tc). Los linfocitos Th se caracterizan por expresar la molécula CD4, mientras que los linfocitos Tc expresan la molécula

CD8. Dentro de los linfocitos Th los más estudiados son los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg. El destino de la célula Th no diferenciada depende del patrón de señales al cual se enfrente durante su primer contacto con el Ag [11]. Los linfocitos Treg expresan constitutivamente, CD4, CD25 elevado, que es el receptor α de la interleucina (IL-) 2 (IL-2R α) y el factor nuclear FoxP3, su función es mantener la homeostasis de los linfocitos y regular la respuesta inmunitaria montada. Los linfocitos Th1 se caracterizan por producir IL-2, Interferón (INF-) γ y factor de necrosis tumoral (TNF) β a través del factor de transcripción T-bet y el traductor de señal y activador de la transcripción (STAT) 4[12]. Los linfocitos Th2 se caracterizan por la presencia de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25 a través de los factores de transcripción GATA 3 y STAT6. La IL-4 está involucrada en el cambio de clase a IgE, mediante IL-5 reclutan eosinófilos y gracias a IL-9 reclutan mastocitos [13].

A.2.2 Linfocitos B

Al igual que los linfocitos T, los linfocitos B tienen su propio receptor; el BCR, el cual es una inmunoglobulina (Ig) anclada en la superficie de los linfocitos. Cada célula B produce inmunoglobulina de especificidad única. La inmunoglobulina de la misma especificidad de Ag se secreta como anticuerpo por células B terminales, llamadas células plasmáticas [1]. Las células B maduras se producen en la médula ósea y éstas poco a poco sustituyen a las células B circulantes y de zona marginal [14]. Las células B después de reconocer a su antígeno pueden tener contacto con células Th y con esto ser activadas y proliferar en las zonas marginales de células T o las vainas periarteriolas linfoides de bazo o en la corteza de los ganglios linfáticos, una vez activadas las células B pueden tomar una de dos vías: permanecer en la zona marginal y convertirse en células plasmáticas de vida corta o migrar a los folículos de células B y con ayuda de células T comenzar reacciones de centro germinal [15]. Los centros germinales son centros de formación de respuestas de células B de alta afinidad y larga duración dependientes de T, ya que ahí ocurre la hipermutación somática dando como

consecuencia el aumento en la afinidad y el cambio de isotipo de los anticuerpos [16].

B. Inmunidad innata como base de la inmunidad adaptativa

Se creía que la inmunidad adaptativa era más evolucionada y estaba destinada a sustituir a la inmunidad innata, sin embargo, ambos tipos de inmunidad están ampliamente relacionados, haciendo difícil definir dónde termina o empieza cada una. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno regulando respuestas de células T bajo un estímulo de infección, las DCs maduran modificándose fenotípicamente, mejorando su actividad sobre células T provocando su proliferación y expansión clonal y regresando a un estado de latencia cuando este estímulo se termina [17]. Tras la entrada de un patógeno y su reconocimiento por las DCs, éstas migran a los ganglios linfáticos mediante linfáticos aferentes, durante esta migración el patógeno es procesado y sus Ag son presentados en moléculas codificadas en el MHC, los mecanismos por los cuáles son procesados ciertos Ags y no otros no están completamente descritos. El Ag es reconocido por las células T a través de su TCR, éste reconocimiento induce la activación, ocasionando proliferación y producción de citocinas [18]. Las células T activadas tienen contacto con células B permitiendo su diferenciación en células plasmáticas generadoras de Ab y células B de memoria [7].

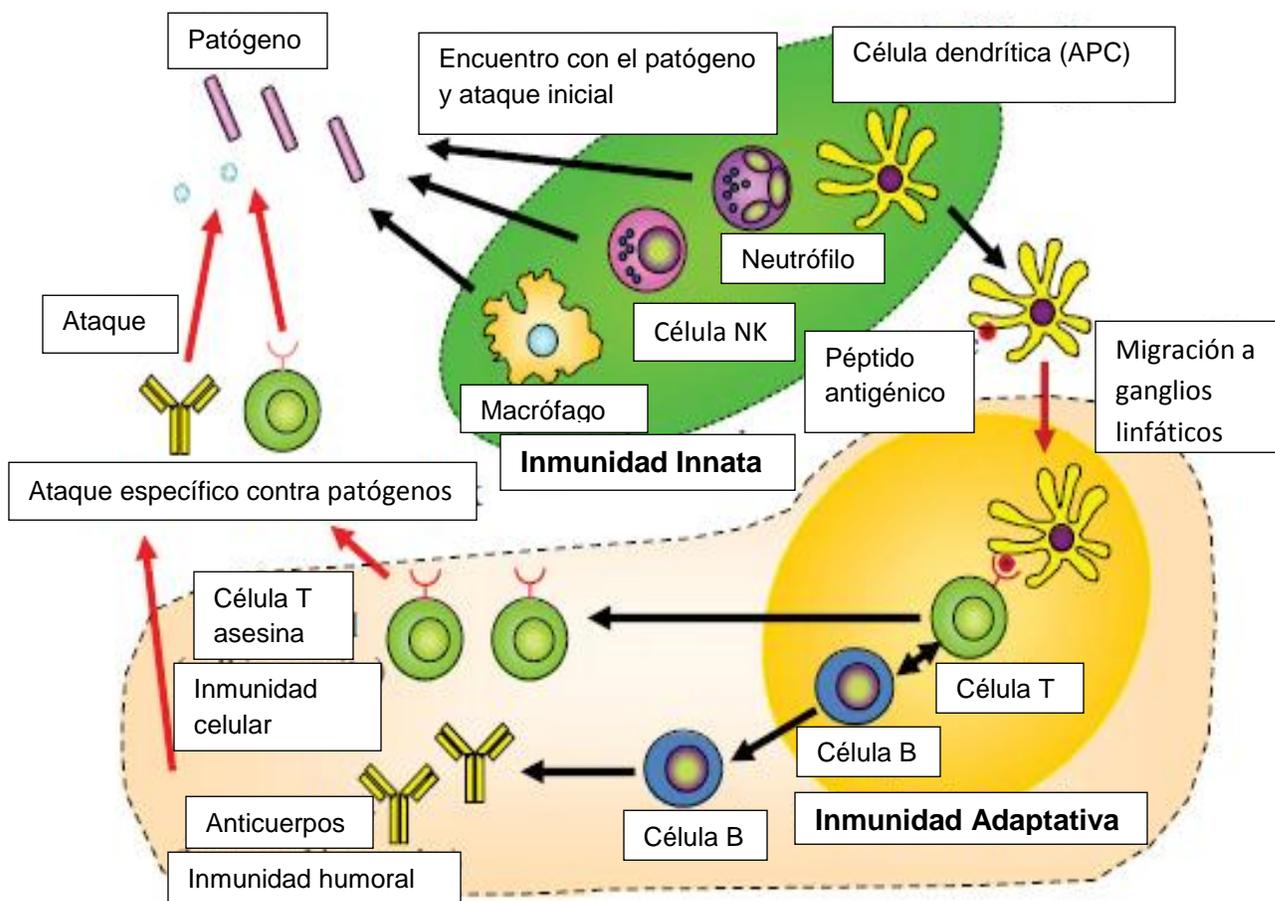


Fig.1 Interacciones del sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adaptativo. Los sistemas inmunitario innato y adaptativo están estrechamente relacionados, la activación de uno lleva a la interacción y subsecuente activación del otro, ayudando ambos a proteger al organismo contra infecciones. Modificado de Akira, S. 2011.

El uso de diversas moléculas reconocidas por receptores de la inmunidad innata co-administradas con antígenos (Ags) poco inmunogénicos ha demostrado mejorar las respuesta inmunitaria adaptativa, principalmente la generación de Ab específicos contra el Ag, se ha dado especial atención a aquellos que son ligandos de TLRs. Los TLRs son encargados de una parte del reconocimiento inmune innato, el cual se da principalmente por células que no están infectadas [8]. Ligandos de TLR4 y TLR7 han mostrado mejorar la producción de Ab [19],

algunos como el monofosforil lípido A (MPL-A), que señala a través de TLR4 son adyuvantes autorizados para uso en vacunas en humanos [20].

C. Adyuvantes

Los adyuvantes son moléculas, compuestos o complejos macromoleculares que estimulan la potencia y duración de respuestas inmunitarias a Ags presentando un nivel de toxicidad mínimo [21]. Pueden clasificarse en dos grandes grupos, en el primero están aquellos adyuvantes que sirven como inmunoestimulantes; actúan directamente sobre la respuesta inmunitaria y en el segundo están los adyuvantes que funcionan como vehículos; presentan los Ags al sistema inmunitario de manera óptima para que se pueda generar una respuesta adecuada [21]. Los adyuvantes son utilizados principalmente en la formulación de vacunas, en las que ayudan a establecer respuestas inmunitarias más fuertes y duraderas, y amplían la protección, mejorando las respuestas de poblaciones celulares con respuesta pobre y permiten reducir la cantidad de antígeno requerida [22].

Las vacunas que generalmente utilizan adyuvantes son las que pertenecen al grupo de las llamadas vacunas de subunidades, como aquella contra el virus de la hepatitis B [23]. Los adyuvantes han estado presentes inclusive desde las primeras vacunas, aunque la manera empírica en la que se desarrollaron hizo que no se tuviera consciencia de ellos [24]. Sin embargo, el estudio del mecanismo de acción reveló un papel muy importante de la inmunidad innata pues muchas de las moléculas contenidas en estas vacunas han servido como “adyuvantes intrínsecos” actuando muchas veces sobre células presentadoras de antígeno, especialmente sobre las células dendríticas afectando su migración, maduración y expresión de moléculas co-estimuladoras, cambios que pueden mejorar las respuestas de células T y B hacia los Ags. Algunos adyuvantes actúan directamente sobre células T y B mejorando su proliferación y/o conversión en células de memoria [25].

Pocos son los adyuvantes autorizados para ser utilizados en vacunas de uso humano, entre ellos están la alúmina, el sistema adyuvante 04 (AS04), MF59 y MPL [23].

La alúmina es el adyuvante más utilizado, consiste en geles no cristalinos basados en oxi-hidróxido de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, hidroxisulfato de aluminio, entre otras sales que pueden ser emulsificadas con el Ag y que generan una respuesta de Ab con perfil Th2, caracterizada por la presencia de IL-4, IL-5, IL-6, IL-25, IL-33 e IL-13 y de Ab IgG1 e IgG2b, respuesta importante contra patógenos extracelulares. Es componente de vacunas como aquella contra la difteria, pertusis y tétanos, contra la hepatitis A, hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, entre muchas otras [20, 22, 23, 25]. A pesar de su extenso uso, el mecanismo por el cuál actúa no se conoce totalmente aunque hay tres teorías que han tratado de explicar lo anterior:

- La primera y más antigua dice que la alúmina funciona como un depósito de Ag mediante el cuál éste es liberado continuamente para mejorar la respuesta de Ab.
- La segunda teoría sugiere que la alúmina convierte al Ag en una forma particulada para que éste pueda ser fagocitado más fácilmente por APCs.
- La tercera teoría propone que la alúmina induce la activación del complejo inflamasoma generando IL-1 β , inflamación local, activando y reclutando macrófagos y otras APCs. Además se ha demostrado que induce la secreción de algunas quimiocinas como lo son CCL2, CCL3, CCL4 y CXCL8 en monocitos y macrófagos humanos [21, 26]. Un estudio reciente apoya esta teoría encontrando que la alúmina induce la inflamación mediante la inducción de cristales de ácido úrico, los cuales estimulan el inflamasoma Nlrp3, que puede activar caspasa-1 y esto a su vez procesar las pro-formas de IL-1 β e IL-18 [26].

Las ventajas que ofrece la alúmina son su seguridad, generación y estabilización de respuesta de Ab y su facilidad para ser producida a gran escala.

El Sistema Adyuvante 04 (AS04) es un adyuvante de nueva generación actualmente aprobado para uso en dos vacunas, contra la hepatitis B y contra el virus del papiloma humano (HPV), está formado por MPL adsorbido sobre alúmina. MPL es el derivado no tóxico del lipopolisacárido (LPS) obtenido de *Salmonella minnesota*, éste activa APCs, principalmente DCs, aumentando su migración y mejorando la toma del Ag, además señala a través de uno de los receptores de la inmunidad innata, el TLR-4, activando al factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) y la subsecuente producción de citocinas inflamatorias, las cuales a su vez mejoran la respuesta inmunitaria adaptativa. El MPL genera una respuesta con perfil Th1, el cual es efectivo contra patógenos intracelulares y se caracteriza por la presencia de IL-2 y el Ab IgG2a [20]. AS04 es un adyuvante muy eficiente ya que tiene la capacidad de unir las ventajas de la alúmina: la producción y estabilización de Ab, y del MPL: activación de APCs y producción de citocinas inflamatorias, dando como resultado la producción de citocinas no sólo por la activación de NF- κ B, sino dependientes de la activación de caspasas [20].

El desarrollo de adyuvantes de nueva generación como AS04 se basa en el hecho de que la inmunidad innata tiene un papel fundamental para programar y dirigir las respuestas adaptativas. Gran parte, o toda la actividad de estos nuevos adyuvantes es señalar a través de receptores de la inmunidad innata, principalmente los TLRs.

Tabla1. Activación de la inmunidad innata por vacunas y adyuvantes. Modificado Ahmed, R y Pulendran, B, 2011.

| | Mecanismo inmunitario Innato | Tipo de respuesta inmunitaria |
|--|--|---|
| Vacuna con licencia | | |
| Fiebre Amarilla (YF-17D) | Activa varios subconjuntos de DCs por TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9; activa RIG-I y mda5 | Linfocitos Tc; linfocitos Th1 y Th2; anticuerpos neutralizantes |
| Viruela | Inhibe la activación de DC y causa muerte celular; bloquea señalización por TLR4 y TLR3 | Linfocitos Tc; anticuerpos neutralizantes |
| Bacilo de Calmette-Guérin | Activa TLR2, TLR4, TLR9 y DC-SIGN | Th1 y Th2 |
| Combinaciones vacuna-adyuvante con licencia | | |
| Alúmina | Señalización por TLR no crítica para la producción de Ab; induce caspasa-1 y activación de inflamasoma en DCs. | Th2; anticuerpos |
| MF59 | Mecanismo desconocido; probablemente por la mejora de la toma por APCs | Th2; anticuerpos |
| AS04 | Agonista de TLR4 | Th1; anticuerpos |
| Adyuvantes emergentes | | |
| CpG ADN | Ligando de TLR9 | Th1; anticuerpos |
| Ligandos de TLR7 y TLR8 | Ligandos de TLR7 | Th1; anticuerpos |
| Fusiones proteína-flagelina | Activa TLR5 y los componentes del inflamasoma IPAF y NAIP5 | Th1 y Th2 |

D. Receptores Tipo Toll (TLRs)

Los TLRs son proteínas transmembranales de tipo I, la porción N-terminal extracelular está formada por 16-28 repeticiones ricas en leucina (LRRs) gracias a las cuales reconoce a los PAMPs, la porción C-terminal localizada intracelularmente es un dominio receptor Toll/IL-1 (TIR) homólogo al dominio intracelular de la familia de receptores de IL-1, éste dominio es necesario para la interacción y reclutamiento de varias moléculas adaptadoras que activan la señalización [27]. En humanos han sido identificados 10 TLRs funcionales, cada uno tiene una función diferente en términos de los PAMPs reconocidos y la respuesta inmunitaria generada. Entre los PAMPs que pueden reconocer están lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos de una gran variedad de bacterias, hongos, parásitos y virus, éste reconocimiento se da en diferentes compartimentos celulares como la membrana plasmática, endosomas, lisosomas y endolisosomas [28]. Los TLRs pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo los PAMPs que tienen como ligandos y su localización celular. Un grupo está compuesto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, los cuales están localizados sobre la membrana plasmática y reconocen principalmente componentes microbianos de membrana como lípidos, lipoproteínas y proteínas, el otro grupo está formado por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 localizados específicamente en vesículas intracelulares como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas, reconociendo ácidos nucleicos microbianos [29].

El reconocimiento de los PAMPs estimula el reclutamiento de adaptadores que contienen el dominio TIR, éstos son el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), adaptador tipo MyD88 (MAL o TIRAP), proteína adaptadora conteniendo el dominio TIR para inducir interferón β (TRIF o TICAM1) y la molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM o TICAM2). MyD88 está compartido por casi todos los TLRs, sólo TLR3 no utiliza ésta molécula adaptadora y utiliza a TRIF, TLR4 es el único que utiliza ambas vías de señalización. El reclutamiento de cualquiera de estas dos moléculas adaptadoras dispara cada una

de las vías de señalización que tienen como resultado la activación de factores de transcripción como NF- κ B y el factor de regulación de interferón (IRF), que lleva a la producción de citocinas inflamatorias e interferones tipo-I [27, 30, 31].

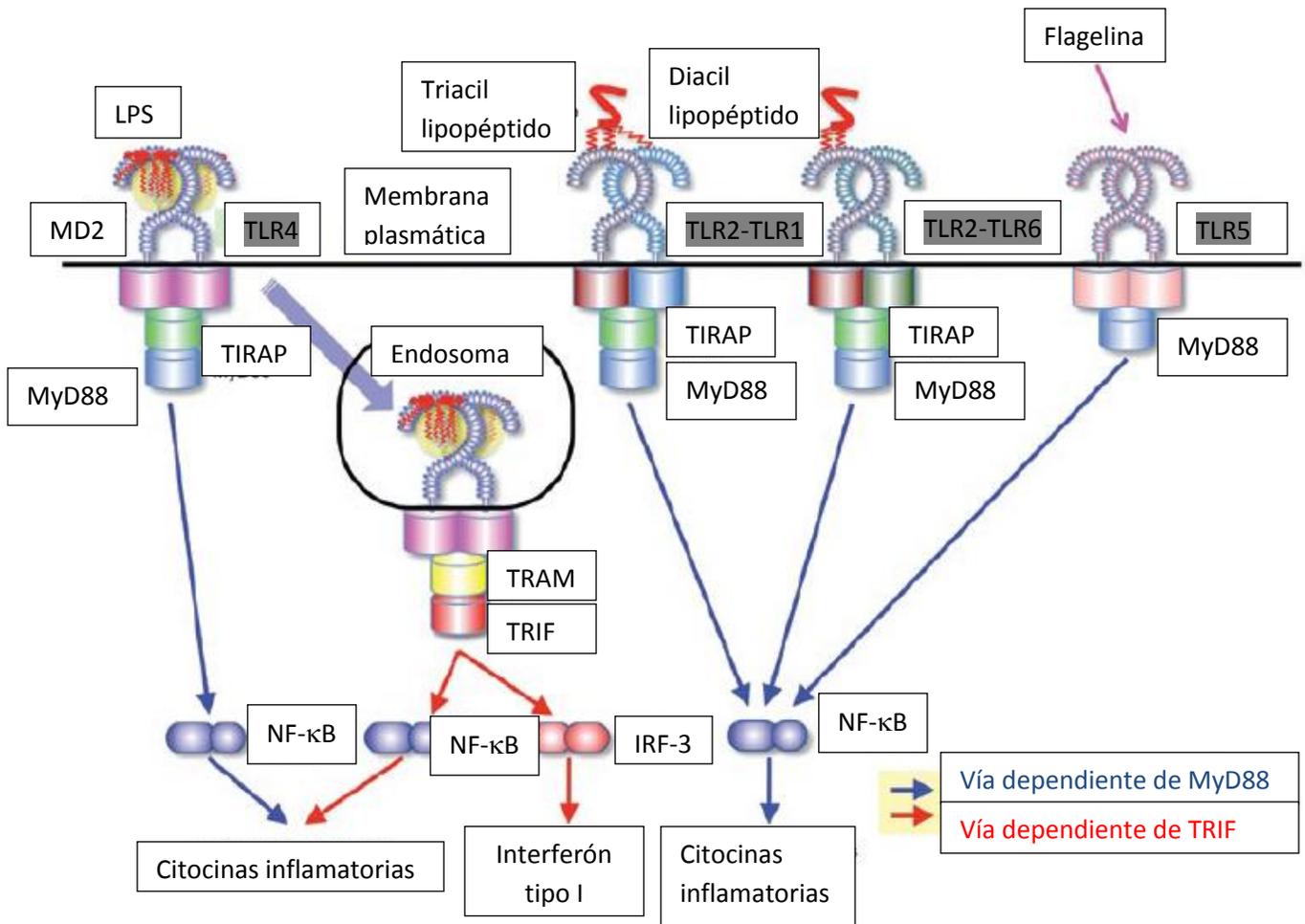


Fig.2 TLRs de membrana plasmática. Representación de los TLRs localizados en membrana plasmática y las vías de señalización que cada uno sigue, también se muestran ejemplos de PAMPs que cada uno reconoce. Modificado de Akira, S y Kawai, T 2010.

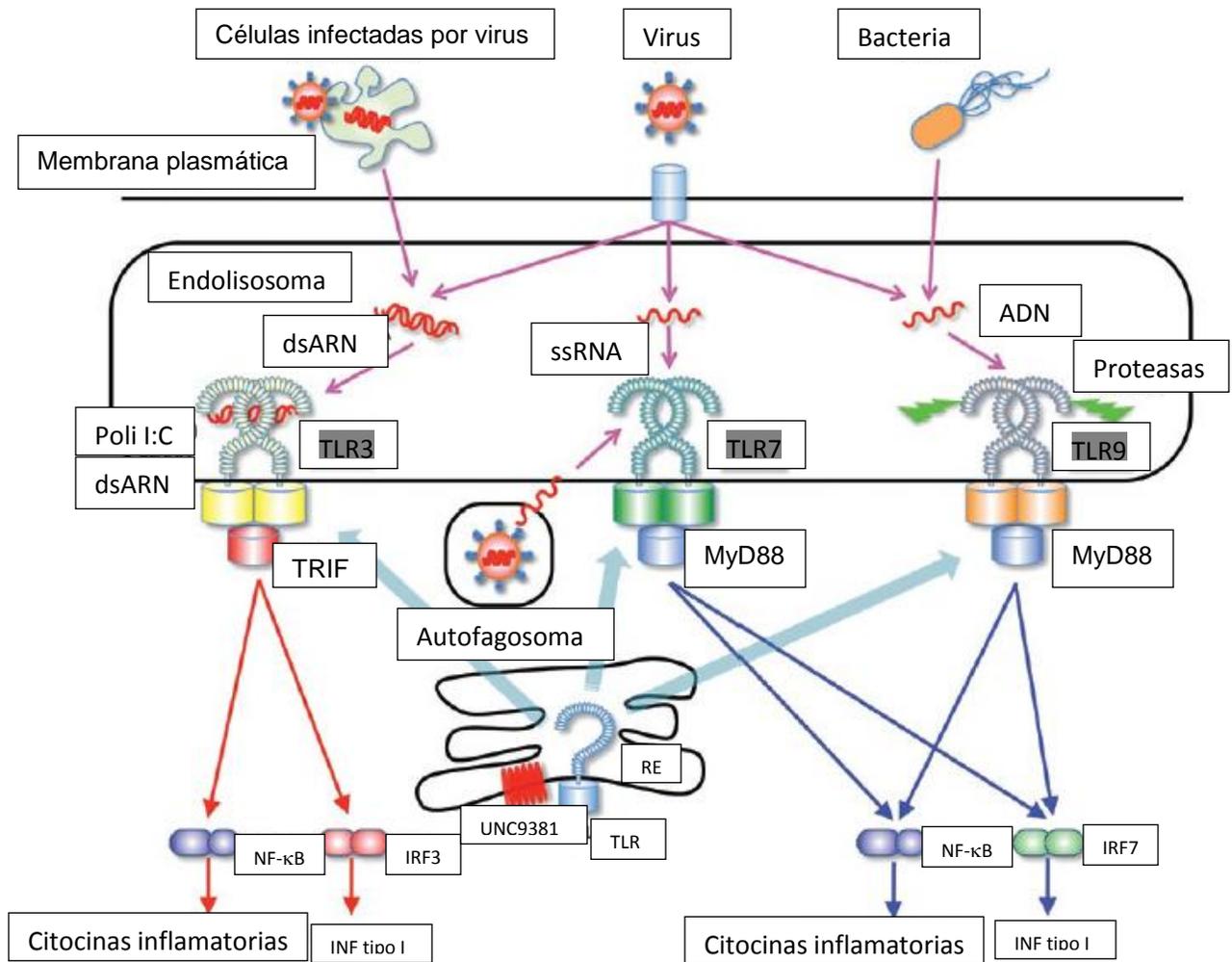


Fig.3 TLRs intracelulares. Representación de los TLRs de vesículas intracelulares y las vías de señalización que siguen, todos reconocen ácidos nucleicos. ssARN: ARN de cadena sencilla, dsARN: ARN de doble cadena, RE: Retículo Endoplásmico. Modificado de Akira, S y Kawai, T 2010.

Cada TLR es único y tiene características que lo distinguen de los demás, a continuación se mencionan algunas de ellas:

- TLR2 tiene la capacidad de formar heterodímeros con TLR1 y TLR6, lo cual es clave para su especificidad y manera de actuar.
- TLR3 señala sólo a través de TRIF/TRAM, su señalización también es necesaria para la activación de RIG-I.
- TLR4 forma un complejo con las proteínas adaptadoras MD-2 y CD14 y puede señalar a través de MyD88 o de TRIF.
- TLR5 es el único que tiene un solo ligando conocido, la flagelina bacteriana, su unión incrementa la expresión de marcadores de monocitos como lo son CD80 y CD25.
- TLR7 y TLR8 reconocen segmentos de ARN ricos en secuencias poli-U o GU.
- TLR9 reconoce oligodeoxinucléotidos no metilados virales, los cuales están ausentes en mamíferos.

Otra característica que diferencia a cada TLR de los demás son los ligandos que reconoce [22, 27, 30, 31]. En la siguiente tabla se muestran los ligandos conocidos de los diferentes TLRs:

Tabla2. Ligandos de los distintos TLRs y el tipo de respuesta inmune. Modificado de Reed, S 2011.

| Inmunoestimulante | Interacción | Tipo de respuesta inmune |
|--|-------------------------|------------------------------------|
| Ligando de TLR Lipopéptido, lipoproteína, ácido teicóico bacterianos; lipoglicano de micobacterias; zimozan de levaduras; LPPG | TLR2, TLR2/1, TLR2/6 | Ab, Th1, NK |
| ARN de doble cadena Viral | TLR3 | NK |
| Lipopolisacárido, lípido, MPL; LPPG | TLR4 | Th1 fuerte, Ab |
| Flagelina | TLR5 | Th1, linfocitos Tc, Ab |
| ARN viral de cadena sencilla, Imidazoquinolinas | TLR7/8 | Th1 fuerte, linfocitos Tc |
| ADN bacteriano, CpG, hemozoina | TLR9 | Th1 fuerte, linfocitos Tc y Ab; NK |
| Bacteria uropatógena | TLR11 | Th1 |
| Otros: | | |
| Saponinas | Procesamiento de Ag | Th1 fuerte, linfocitos Tc y Ab |
| Citocinas GM-CSF, IL-2, IFN α, toxinas bacterianas | Receptores de citocinas | Ab |

E. Lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *Entamoeba histolytica*

La amibiasis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoario *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), es la segunda causa de muerte por enfermedad parasitaria a nivel mundial. Los trofozoitos de *E. histolytica* invaden la mucosa intestinal causando colitis amibiana, en algunas ocasiones los trofozoitos rompen la barrera intestinal y viajan a otras partes del cuerpo causando lesiones extraintestinales y provocando abscesos amibianos, siendo el absceso hepático el más común [32].

Aunque la incidencia de la amibiasis ha disminuido gracias a las mejoras en la sanidad, sigue siendo un problema grave pues se considera que hay aproximadamente 500 millones de personas infectadas con *E. histolytica*. El tratamiento para la enfermedad es sulfato de paromomicina y furoato de diloxanida [33].

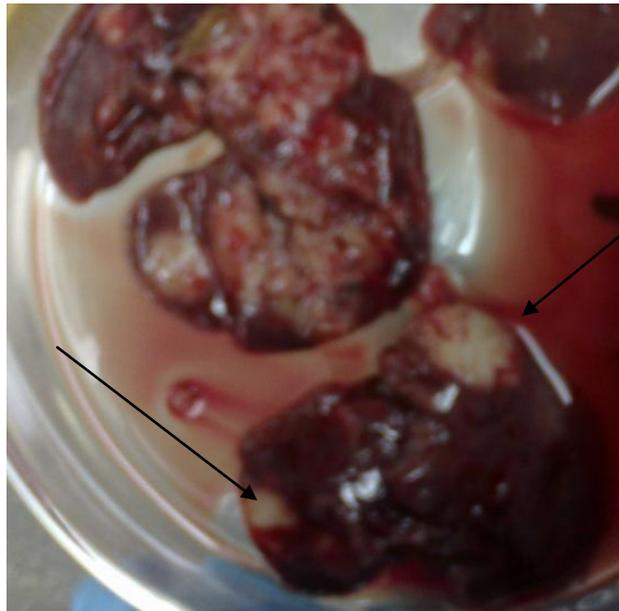


Fig.4 Absceso hepático amibiano. Fotografía de hígado de hámster chino al cuál se le indujo experimentalmente absceso hepático amibiano señalados con flechas.

La patogenicidad de los trofozoitos de *E. histolytica* se ha atribuído a su capacidad de fagocitar, su resistencia al sistema de complemento y a la expresión de ciertas moléculas como: adhesinas, péptidos formadores de poros (ameboporos), proteasas de cisteínas, colagenasas, entre otras [34]. La patogénesis de la amibiasis se ha descrito en tres etapas; la colonización, disrupción de la mucosa y lisis de células epiteliales del colón del hospedero [35].

Se ha demostrado que la patogenicidad de *E. histolytica* se debe a diversas moléculas expresadas sobre su superficie, entre ellas se encuentra la lipopéptidofosfoglicana (LPPG). La LPPG fue descrita por primera vez por Isibasi *et al* [36], se aisló de la membrana de trofozoitos de *E. histolytica* utilizando una modificación del método de extracción fenol-agua del LPS [37]. La LPPG es una molécula con aproximadamente 85% de carbohidratos, 8% de péptidos, 2.5% de lípidos y 1% de fosfato [33], contiene un polipéptido ácido con residuos de serina que forma enlaces fosfodiéster con las regiones polisacáridas, formadas por glucosa y galactosa, el fosfodiéster también está unido a etanolamina, que a su vez está unido a glicosil fosfatidil inositol (GPI), un anclaje que es una característica muy importante de la molécula y el cuál está unido a las cadenas de ácidos grasos [38].

La LPPG es reconocida tanto por el sistema inmunitario innato como por el adaptativo, se han encontrado Ab IgA en calostro de voluntarias sanas y Ab IgG en ratas inoculadas con trofozoitos [33].

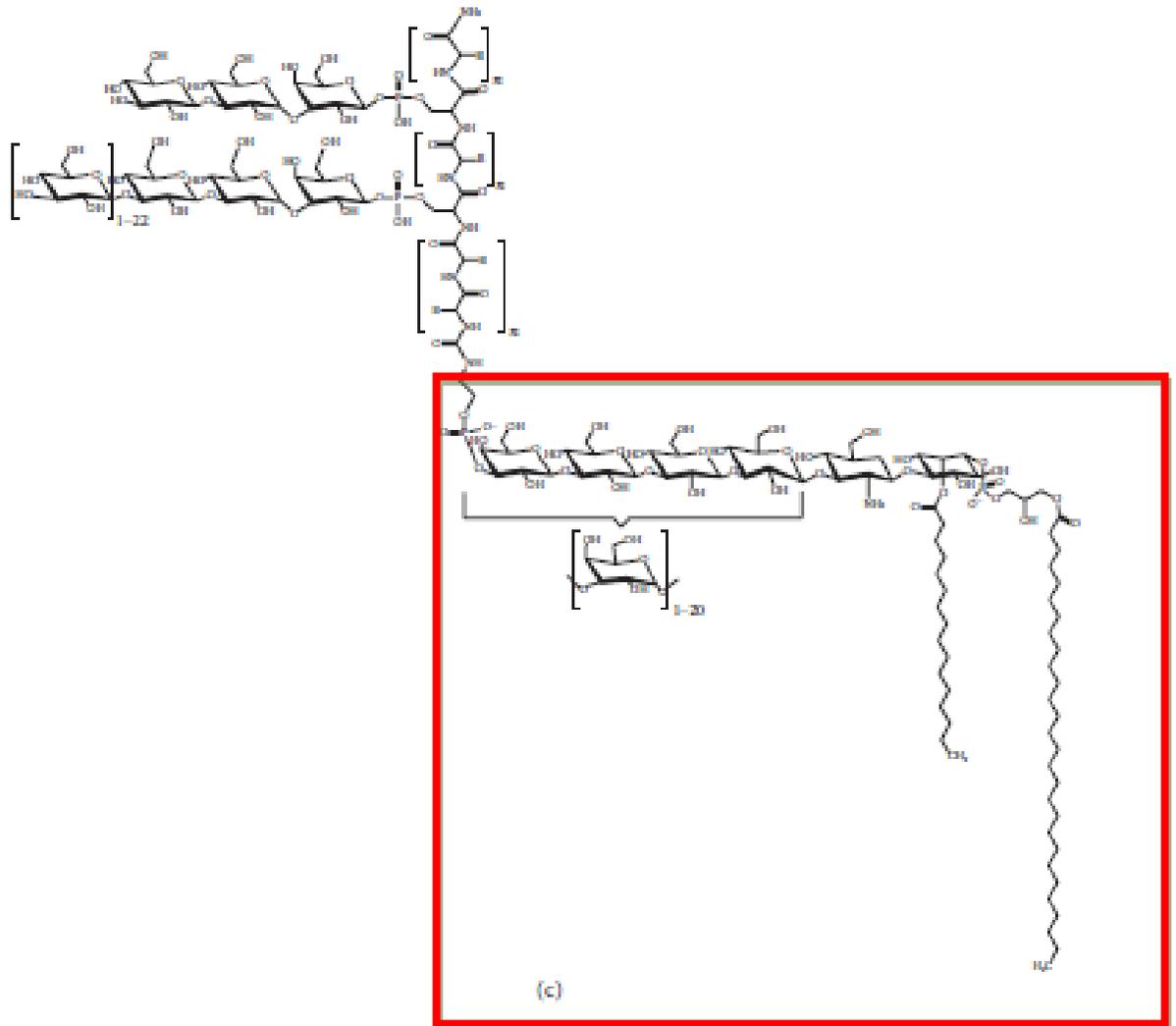


Fig.5 Estructura parcial de la LPPG de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS. Se muestra la estructura de la LPPG de *E. histolytica*, la región del anclaje GPI se señala. Modificado de Wong-Baeza *et al.* 2009.

La LPPG es considerada un PAMP pues la reconocen APCs mediante TLR2 y TLR4, también produce citocinas inflamatorias como IL-12, TNF- α e IL-8 [32] y la presentan células T asesinas naturales (NKTs) mediante la molécula no clásica de presentación CD1d [39].

III. Justificación

El uso de adyuvantes en la formulación de vacunas ayuda a mejorar la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, se sabe que incluso las primeras vacunas desarrolladas empíricamente contenían moléculas que funcionaban como adyuvantes, muchos de los cuales son ligandos de los receptores de la inmunidad innata, los TLRs. Estos TLRs actúan señalizando en las células que los expresan, entre ellas las APCs, las cuáles modifican su migración, expresión de moléculas co-estimuladoras, entre otros cambios, como respuesta a un estímulo mejorando así su función presentadora de Ag y pudiendo generar una producción de Ab específicos contra ese Ag más fuerte y de mayor duración. La LPPG de *E. histolytica* es una molécula que se reconoce por TLR2 y TLR4 por lo que es un buen candidato para ser adyuvante en alguna vacuna, sin embargo no se ha evaluado si tiene esa capacidad adyuvante. En el presente trabajo se determina la capacidad adyuvante de la LPPG de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS al ser inoculada junto con ovoalbúmina (OVA) y midiendo títulos de anticuerpos anti-OVA con el fin de establecer si la LPPG puede ser un futuro candidato para ser utilizada como adyuvante.

IV. Hipótesis

La lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS tiene capacidad adyuvante sobre antígenos no inmunogénicos induciendo títulos de anticuerpos anti-OVA.

V. Objetivos

A. Objetivo general

Determinar la capacidad adyuvante de la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS.

B. Objetivos particulares

Aislar y purificar LPPG de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS.

Caracterizar inmunoquímicamente la LPPG obtenida de la cepa HM1-IMSS de *E. histolytica*.

Determinar los títulos de anticuerpos generados tras la inoculación de la LPPG a distintas dosis junto con un antígeno no inmunogénico (OVA).

VI. Materiales y métodos

A. Cultivo de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS

Los trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33, en botellas de cultivo de 250 ml y 50ml. Al medio se le ajustó el pH a 6.8 y se esterilizó a 121°C durante 30 minutos. Después fue enriquecido con 10% de suero fetal bovino (Gibco Invitrogen) previamente inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min y 3% de vitamina Diamond (SAFC Biosciences). Los trofozoitos se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento despegándolos de las paredes de las botellas de cultivo colocándolas en baño de hielo por 10 min, posteriormente se decantó el medio en tubos cónicos de 50ml (Corning) y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el botón resuspendido en 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas. La biomasa obtenida se concentró en un tubo cónico de 50 ml y se almacenó a -70°C hasta su uso.

B. Extracción de la LPPG de *E. histolytica*

La extracción de la LPPG se hizo por el método de fenol-agua modificado por Isibasi *et al*, 1982. Se utilizaron aproximadamente 60ml de biomasa húmeda de la cepa HM1-IMSS.

La biomasa de trofozoitos obtenida se descongeló en baño María a 37°C por 30 min y el contenido se reunió en un solo tubo, éste se congeló a -70°C durante 30 min. Se realizaron 3 ciclos más de congelación-descongelación para lisar por

completo los trofozoitos. El lisado obtenido se centrifugó a 430 x g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar los núcleos y organelos de gran tamaño. El sobrenadante fue recolectado en dos tubos de policarbonato para ultracentrífuga (Beckman) y centrifugado a 150,000 x g (35,000 rpm) durante 45 min a 4°C. En esta centrifugación son eliminadas moléculas contenidas en el citoplasma y que se observan como un líquido amarillo el cual se desechó. El botón conteniendo un concentrado de membranas fue trasvasado a un tubo de teflón y resuspendido con 5 ml de agua inyectable a 68°C, después se agregaron 5 ml de fenol al 90% a 68°C y se colocó en un baño de agua a 68°C con agitación y 200 rpm por 30 min, posteriormente el tubo fue colocado en un baño de hielo por 30 min. Pasado éste tiempo se centrifugó a 12,000 x g (8300 rpm) durante 30 min. Tras la centrifugación se observan tres fases: la acuosa en la parte superior, una interfase sólida y la fase fenólica en el fondo del tubo. La fase acuosa fue extraída midiendo el volumen de ésta y sin tomar la fase sólida y fue colectada en un tubo de teflón colocado en hielo. El volumen tomado se adicionó nuevamente a 68°C y se homogenizó. Se agregaron otros 5 ml de agua y fenol a 68°C y se realizó el procedimiento ya mencionado. Se realizó una última extracción añadiendo sólo el volumen que se retiró de agua y repitiendo el mismo procedimiento.

La fase acuosa obtenida se dializó en una membrana para diálisis durante cuatro días cambiando el agua diario para eliminar restos de fenol. El dializado fue recuperado y resuspendido en 3.9 ml de agua inyectable, después se colocó en tubos cónicos de 1.2ml y congeló a -70°C hasta su uso para la caracterización.

C. Cuantificación de azúcares reductores por el método de antrona

El contenido de carbohidratos de la LPPG cepa HM1-IMSS fue determinado por el método de antrona. Se preparó una curva estándar de D-glucosa por duplicado añadiendo 1ml de glucosa a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$) más 2 ml de solución de antrona al 0.2% en ácido sulfúrico en tubos de ensayo despirogenizados. Las muestras se prepararon por triplicado añadiendo 25, 50 y 75 μl de muestra más lo necesario de H_2O para obtener un volumen final de 500 μl más 1 ml de la solución de antrona al 0.2%.

La curva y las muestras fueron hervidas en baño de agua por 10 min. El ácido sulfúrico sirve para hidrolizar los monosacáridos libres y los polisacáridos en sus extremos reductores en forma de furfurales, formando un complejo verde con la antrona y cuya absorbancia a 620 nm es proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra (Trevelyan y Harrison, 1952).

D. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA).

La determinación del contenido de proteínas en la LPPG se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA protein Assay, Thermo Scientific, USA). El método se basa en la reacción de Biuret, en la que los péptidos de tres o más residuos de aminoácidos forman un complejo azul con los iones cobre, que en condiciones alcalinas se reducen a de Cu^{2+} a Cu^{1+} . Cu^{1+} es detectado por el ácido bicinconínico formando un complejo morado intenso que absorbe la luz a 562nm.

Se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) siguiendo las instrucciones del kit. Se hicieron las diluciones de la alícuota de BSA a concentraciones de 1,500, 1,000, 750, 500, 250, 125, 50, 25 y 0 µg/mL utilizando PBS pH 7.4 como diluyente.

El reactivo de trabajo se elaboró tomando 50 partes del reactivo A y 1 parte del reactivo B. La curva y las muestras se prepararon tomando 50 µL de cada una y añadiendo 1 ml de reactivo de trabajo, se incubaron a 37°C por 30 min y se midió la absorbancia a 562 nm.

E. Determinación del contenido de endotoxina

El contenido de endotoxina en la LPPG se determinó con el kit *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) PYROGENT-5000. El método se basa en la reacción del lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus*, que en presencia de endotoxina activa enzimas de la cascada de coagulación. El ensayo LAL turbimétrico mide el aumento de la turbidez que precede a la formación del coágulo.

Se preparó una curva estándar de endotoxina con concentraciones de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 UE/ml. Las muestras se prepararon haciendo diluciones de 10, 1 y 0.1 µg/mL a partir de la concentración de carbohidratos determinada. Se colocaron 100 µl de la curva y las muestras en una placa libre de pirógenos de 96 pozos, posteriormente se colocó en el lector de microplacas e incubó por 15 min. Después se le adicionó 100 µL del lisado de amebocitos a los pozos y se midió la absorbancia a 340 nm.

F. Identificación de la LPPG por ELISA

Se detectó la LPPG por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) indirecto con un suero policlonal de conejo anti-LPPG.

Se fijó la placa de fondo plano de 96 pozos (Costar) con LPPG a concentraciones de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 µg/mL a partir de la concentración de carbohidratos en 100 µl de solución reguladora de carbonatos pH 9.5 por una hora a 37°C y toda la noche a 4°C, después la placa se lavó 4 veces con solución de lavado (PBS con 0.1% de Tween 20), terminados los lavados se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS a 37°C por una hora. La placa se lavó con la misma solución y se agregó el suero anti-LPPG de conejo a una dilución 1:2000 en solución de bloqueo y se incubó 1 hora a 37°C. Terminado el tiempo se lavó la placa y se le agregó el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Invitrogen USA) en dilución 1:4000 en solución de bloqueo, se incubó por 1 h a 37°C. La placa fue lavada 4 veces con solución de lavado y se le agregó solución de citratos pH 5.6 con la molécula cromogénica orto-fenilendiamina y se incubó en obscuridad a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se detuvo la reacción con 10 µl de ácido sulfúrico 2.5 N y se leyó a 492 nm.

G. Modelo de inmunización de ratones con OVA

Se inmunizaron vía intraperitoneal 28 ratones hembras, de la cepa BALB/c de 4-6 semanas de edad, divididos en 7 grupos como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 3. Esquema para la inmunización y re-inmunización del antígeno modelo, OVA, con la LPPG y un adyuvante conocido, la alúmina.

| Grupo | Antígeno | Adyuvante (μl) | Reinmunización (día) |
|--------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | OVA | LPPG (50 μ g) | 15 |
| 2 | OVA | LPPG (100 μ g) | 15 |
| 3 | OVA | LPPG (200 μ g) | 15 |
| 4 | OVA | Alúmina (10 μ g) | 15 |
| 5 | - | LPPG (200 μ g) | 15 |
| 6 | PBS | - | 15 |
| 7 | OVA | - | 15 |

Se recolectaron en tubos Microtainer® 400 μ l de sangre obtenida de la vena facial lateral de los ratones a los días 0, 4, 8, 13, 20, 30 y 60. Los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos para separar el suero y fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

H. Determinación de los títulos de anticuerpos anti-OVA en sueros de ratones.

Los títulos de anticuerpos anti-OVA generados tras la inmunización fueron detectados por ELISA indirecta con anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b (Invitrogen USA) y anti-IgM anti-ratón conjugados con peroxidasa de

rábano. Se fijaron placas de fondo plano (Costar) de 96 pozos con 15µg de ovoalbúmina (OVA) en 100µl solución amortiguadora de carbonatos pH 9.5 por una hora a 37°C y después toda la noche a 4°C, después se lavaron 4 veces con solución de lavado y fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS a 37°C por una hora. Se repitieron los lavados y se almacenaron a 4°C envueltas para mantener su humedad hasta su uso.

A placas de 96 pozos con fondo semicircular se le agregaron 195 µl de la solución de PBS-leche en la primera hilera y 100 µl a los demás pozos. Se agregaron 5 µl del suero de los ratones inmunizados o del control positivo y negativo en cada pozo con 195 µl, teniendo el suero una dilución 1:40. Posteriormente con una micropipeta multicanal de 50-300 µl (Thermo scientific) se tomaron 100 µl y se homogenizó subiendo y bajando la mezcla 10 veces, tomando finalmente 100 µl y mezclando con los 100 µl de solución PBS-leche de la hilera siguiente subiendo y bajando 10 veces y se repitió hasta completar las hileras y dejando la última hilera con un volumen de 200 µl para seguir diluyendo el suero. Después se tomaron 100 µl de cada pozo y se colocaron en la placa previamente fijada con OVA en el mismo orden del pozo de la placa de dilución. Las placas fueron incubadas por una hora a 37°C, se lavaron 4 veces con la solución de lavado y se agregó el anticuerpo anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b o anti-IgM anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano en solución de bloqueo y se incubaron por 1h a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con solución de lavado y se les agregó solución amortiguadora de citratos con la molécula cromogénica orto-fenilendiamina y se incubaron en oscuridad por 10 min a temperatura ambiente,

finalizado el tiempo de incubación se detuvo la reacción con 10 μ l de ácido sulfúrico 2.5N y se leyó a 492 nm.

VII. Resultados

A. Purificación y caracterización de la LPPG

Las concentraciones de carbohidratos y proteínas de la LPPG de *E. histolytica* y el contenido de endotoxina contaminante se muestran en la tabla 4. Para los siguientes ensayos, las concentraciones son en base a la concentración de carbohidratos ya que es el componente principal de la molécula.

La determinación del contenido de endotoxina resultó menor a 0.5 UE por cada 1µg de LPPG asegurándonos así, que la actividad biológica observada es responsabilidad de la LPPG.

La identificación de la LPPG por ELISA demostró reconocimiento con un suero policlonal de conejo anti-LPPG desde una concentración de 0.001 µg/ml de LPPG fijada en la fase sólida (Fig. 6). Se utilizó como control LPS de *E. coli* el cual no fue reconocido por el suero policlonal anti-LPPG.

Tabla 4. Concentración de carbohidratos y proteínas de la LPPG de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS y cantidad de endotoxina contaminante.

| Cepa | Determinación | | |
|----------|---------------|-----------|-------------|
| | Carbohidratos | Proteínas | Endotoxina |
| HM1-IMSS | 5.67 mg/ml | 51 mg/ml | 0.356 UE/µg |

Reconocimiento por suero policlonal anti-LPPG

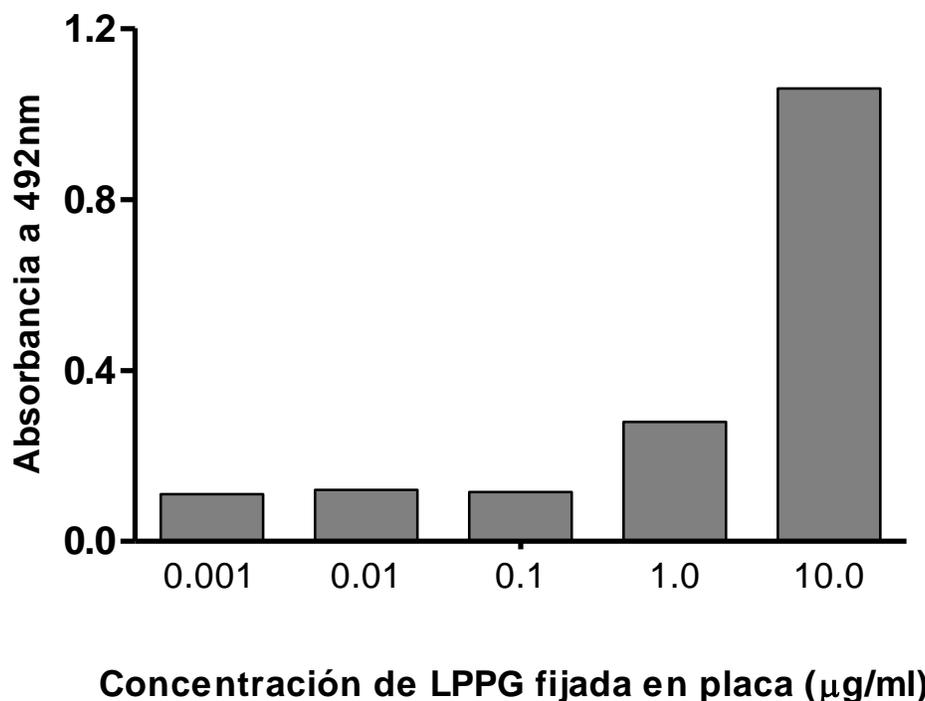


Fig.6 Detección de la LPPG de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS mediante ELISA. Se fijaron concentraciones de 10, 1.0, 0.1, 0.01 y 0.001 µg/ml por pozo y se utilizó un suero policlonal de conejo anti- LPPG.

B. Determinación del efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra un antígeno no inmunogénico

Se utilizó la OVA grado V, como un antígeno no inmunogénico para evaluar el efecto adyuvante, se inmunizaron grupos de ratones únicamente con OVA para comprar la respuesta inducida sólo por el antígeno y tener un nivel basal de respuesta de anticuerpos, también se utilizó la LPPG sola para demostrar que su efecto era realmente adyuvante y que la respuesta no fue gracias a la LPPG sirviendo como antígeno, otro grupo fue aquel inmunizado únicamente con solución vehículo (amortiguador salino de fosfatos (PBS)) demostrando que la punción no fue la causante de la respuesta, finalmente se utilizó un grupo donde

se administró la OVA junto con un adyuvante ya conocido (alúmina) para poder comparar la capacidad adyuvante de la LPPG.

Se observó que tras el uso de la LPPG como adyuvante hubo producción de anticuerpos anti-OVA de clase IgG, al analizar la subclase presente, encontramos que eran de subclase IgG1, esta respuesta se encontró en los días 20 y 30 después de la inmunización, observando una mayor respuesta en el día 30 desde la menor cantidad de LPPG utilizada (50 μ g). Los primeros días no muestran incremento del título de anticuerpos de ninguna clase, es hasta después de la re-inmunización donde los títulos de anticuerpos anti-OVA se elevan en los grupos inmunizados con OVA más la LPPG o la alúmina como adyuvantes, se muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo donde sólo se inmunizó con OVA en los días 20 y 30 posterior a la primera inmunización.

IgG total anti-OVA

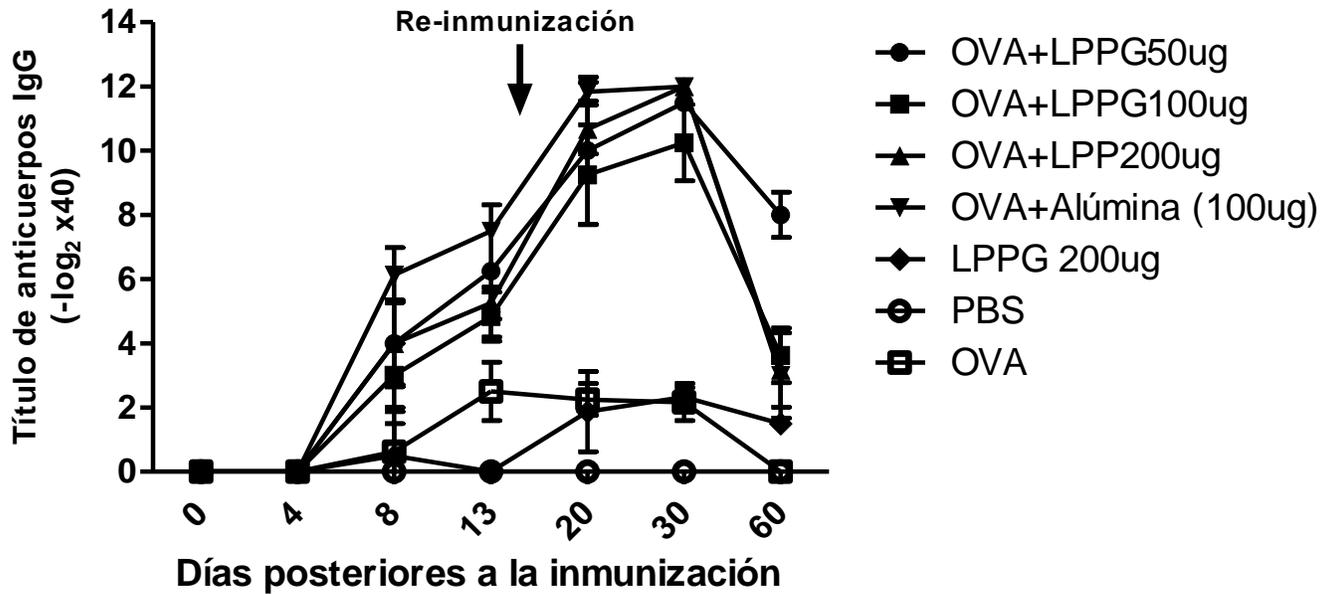


Fig.7 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA. Cinética de los títulos de Abs anti-OVA inducidos por los distintos grupos inmunizados, se midieron los títulos de Abs IgG totales anti-OVA en sueros obtenidos a día 0, 4, 8, 13, 20, 30 y 60 tras la primera inmunización mediante ELISA. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo.

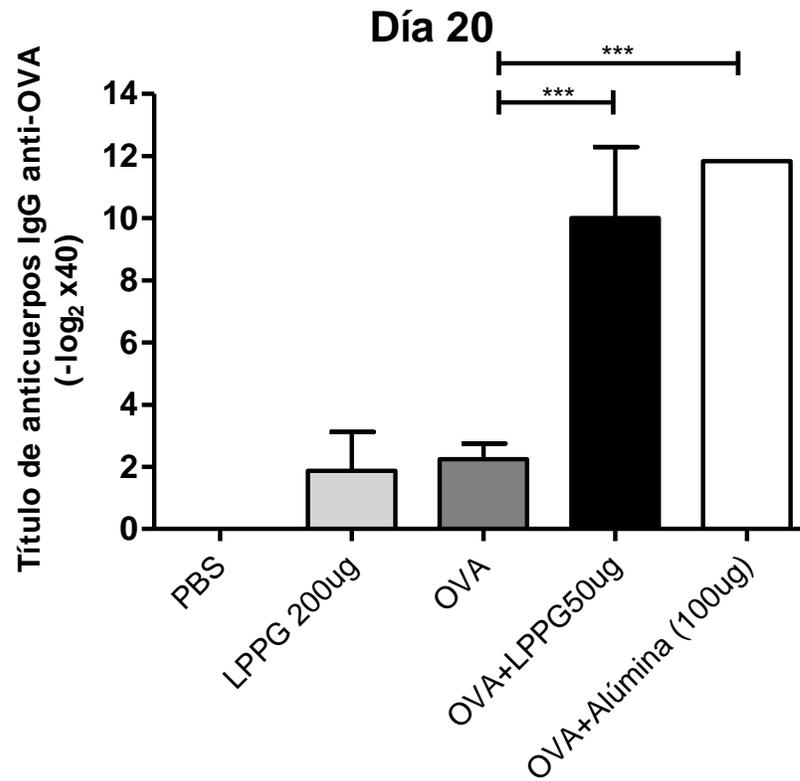


Fig.8 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 20 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizó la menor cantidad de LPPG (50 μ g) y los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni *** P < 0.001.

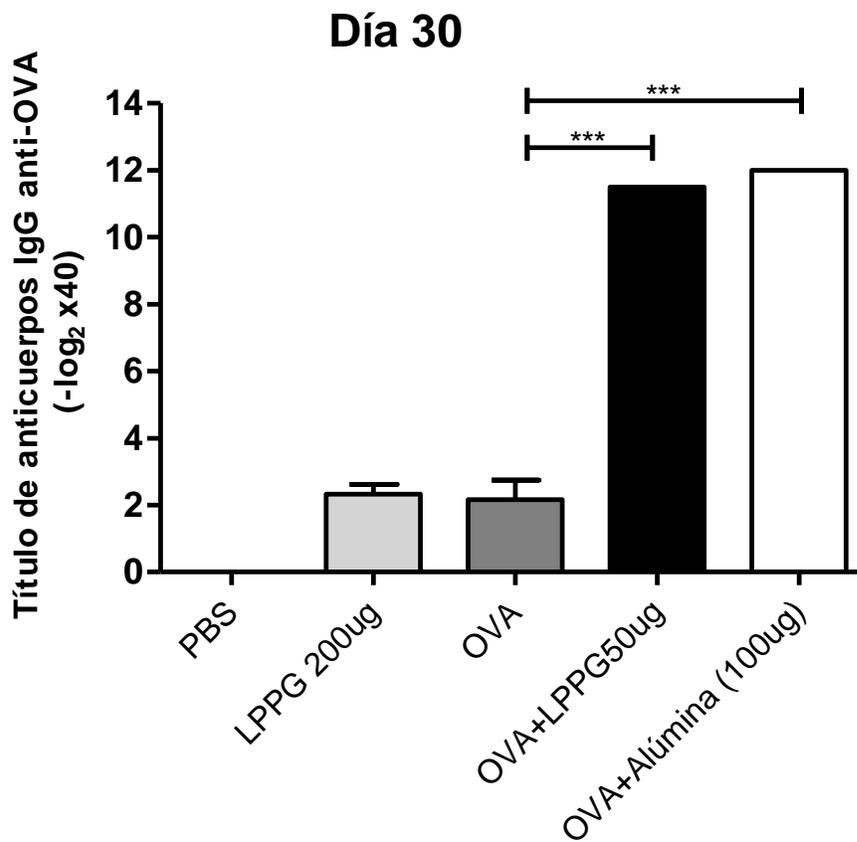


Fig.9 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 30 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizó la menor cantidad de LPPG (50 µg) y los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni *** $P < 0.001$.

Al día 60 después de la primera inmunización los títulos de Ab anti-OVA disminuyen, sin embargo, se encontró diferencia significativa del grupo inmunizado con 50 μg de LPPG comparado con el grupo de OVA.

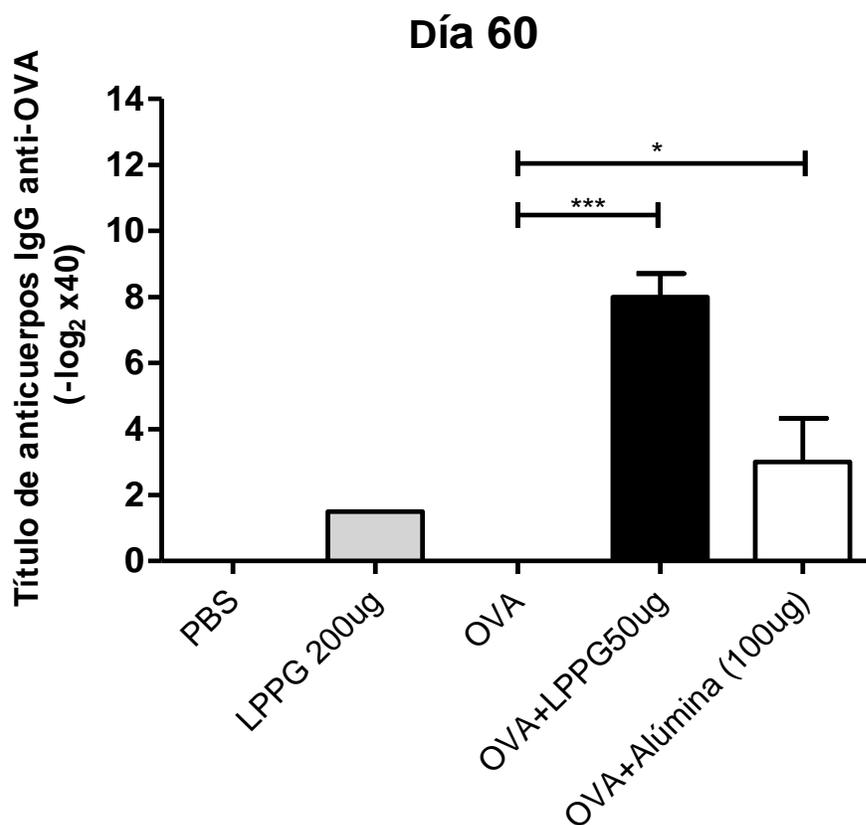


Fig.10 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 60 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizó la menor cantidad de LPPG (50 μg) y los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

En el grupo con 100 μg de LPPG también se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo con OVA a los días 20 y 30 después de la primera inmunización, mostrando un efecto adyuvante por parte de la molécula.

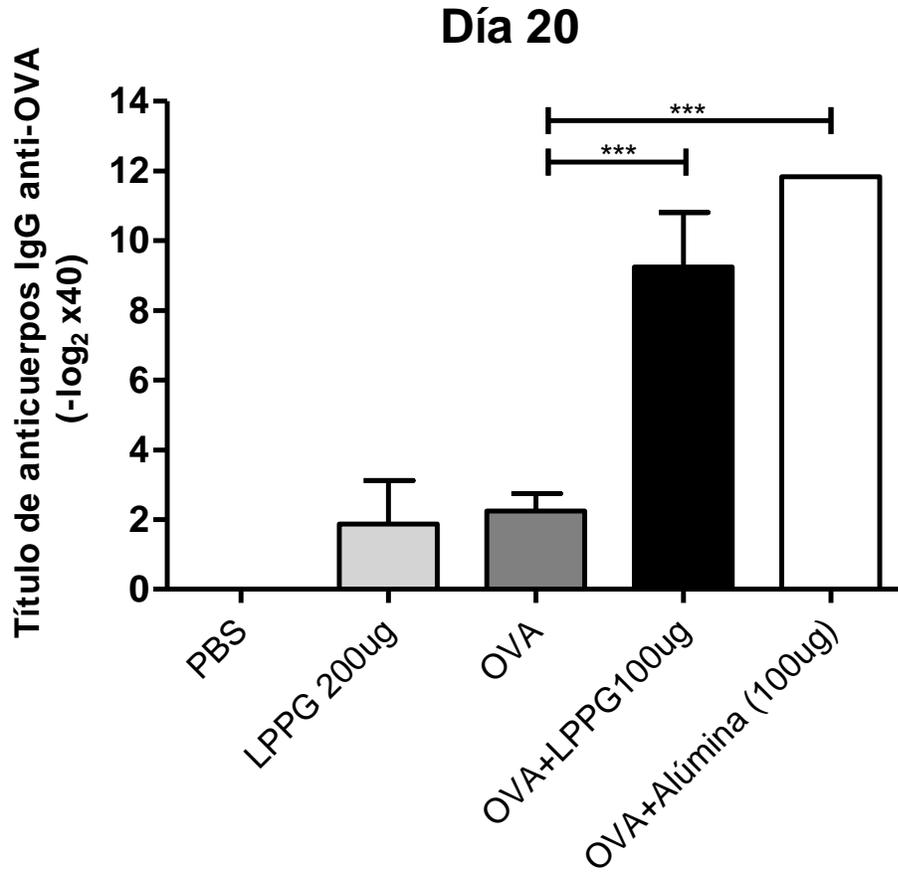


Fig.11 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 20 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizaron 100 μg de LPPG y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni *** $P < 0.001$.

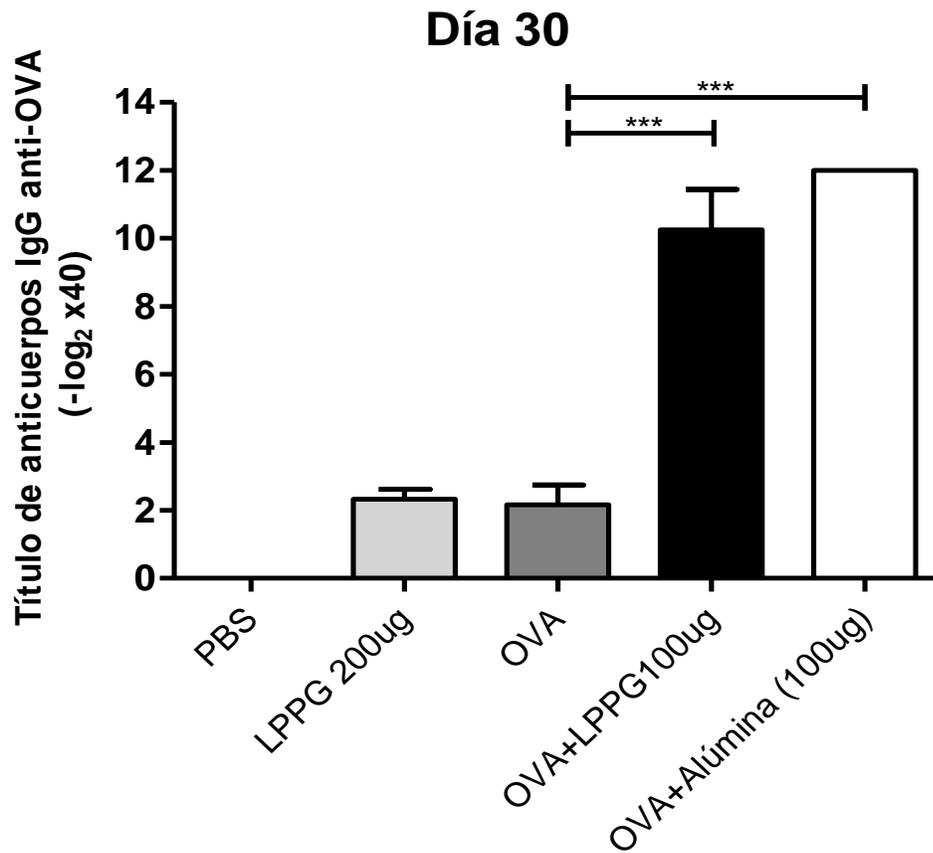


Fig.12 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 30 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizaron 100 μ g de LPPG y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni *** $P < 0.001$.

Al igual que en el grupo con menor cantidad de LPPG administrada, en el grupo donde se inmunizaron 100 μ g de LPPG más OVA también se observó disminución en el título de Ab anti-OVA, pero aún mostró diferencia estadísticamente significativa comparado con el grupo de OVA a día 60.

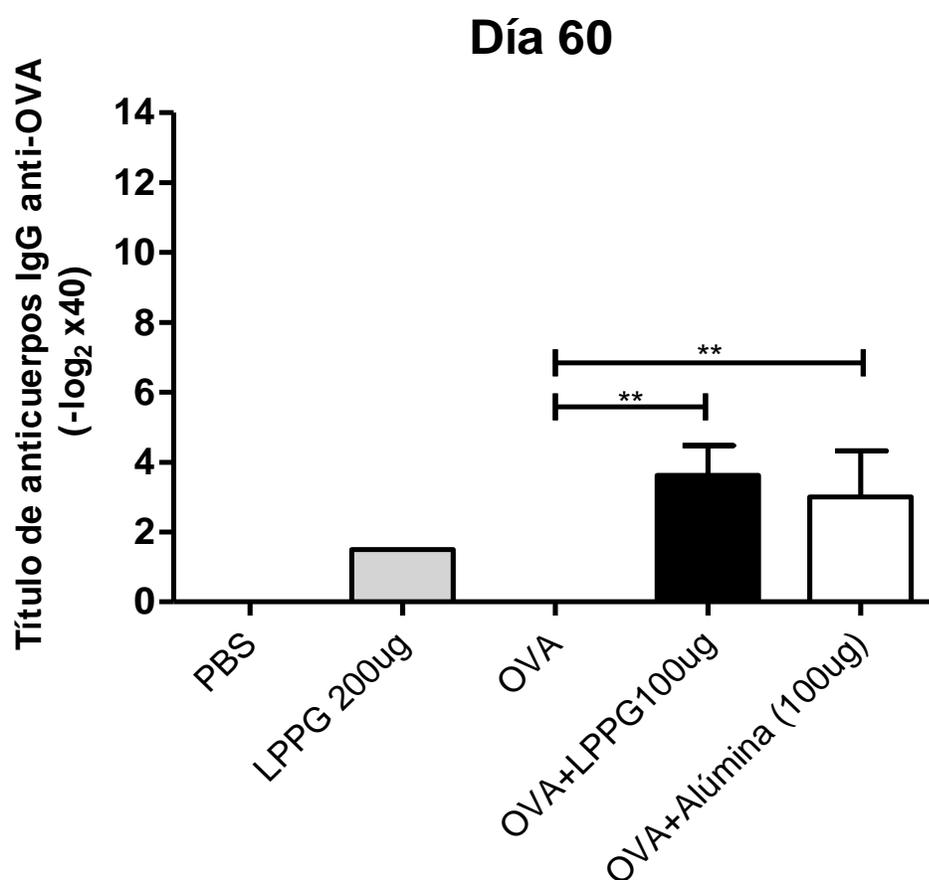


Fig.13 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 60 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizaron 100 μ g de LPPG y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni **** $P < 0.01$.**

En el grupo con la mayor cantidad de LPPG administrada, 200 μ g, también se observaron diferencias significativas a los días 20 y 30 tras la primera inmunización al ser comparados con el grupo basal de OVA.

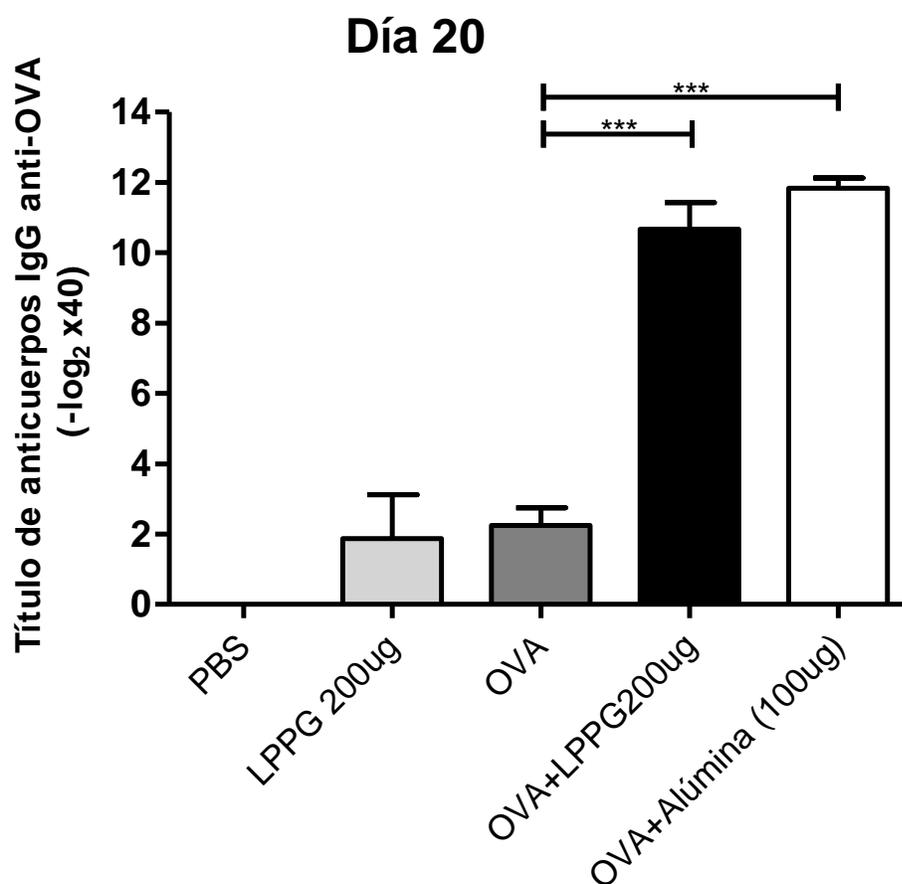


Fig.14 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 20 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizó la mayor cantidad de LPPG, 200 μ g, y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados

como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni $***P < 0.001$.

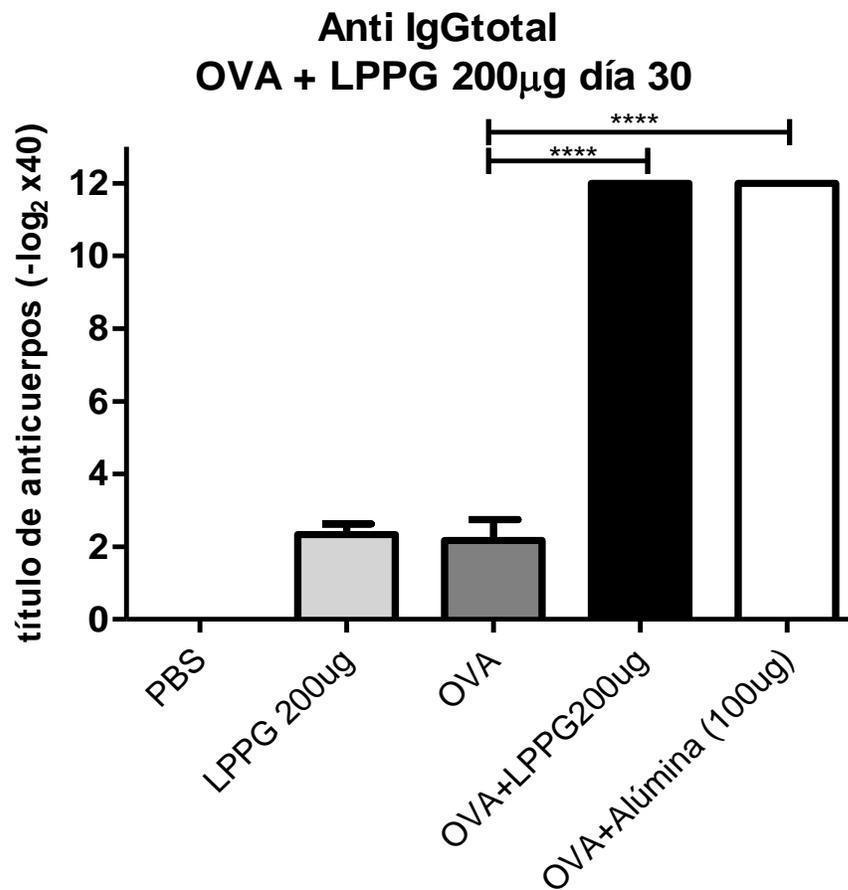


Fig.15 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 30 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizó la mayor cantidad de LPPG, 200 μ g, y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni $***P < 0.001$.

A día 60 se vuelve a observar la disminución de los títulos de Ab anti-OVA y a diferencia de las dos cantidades de LPPG anteriores, en el grupo donde se administraron 200 μ g de LPPG se observó una menor diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de OVA.

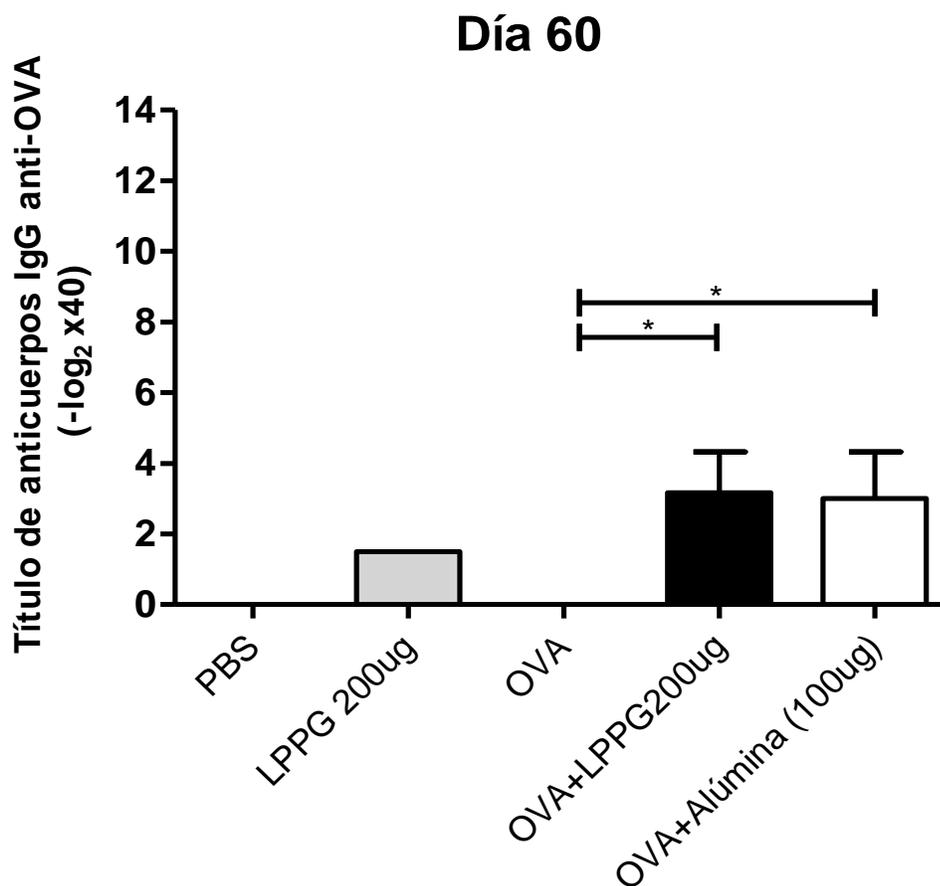


Fig.16 Efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 60 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab anti-OVA del grupo donde se utilizó la mayor cantidad de LPPG, 200 μ g, y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni * $P < 0.05$.

Se analizaron diversos isotipos de anticuerpos anti-OVA; IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM, en el día donde se observó mayor efecto adyuvante, día 30 después de la primera inmunización. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las subclases IgG1 e IgG2b en los tres grupos donde la LPPG fue utilizada com adyuvante.

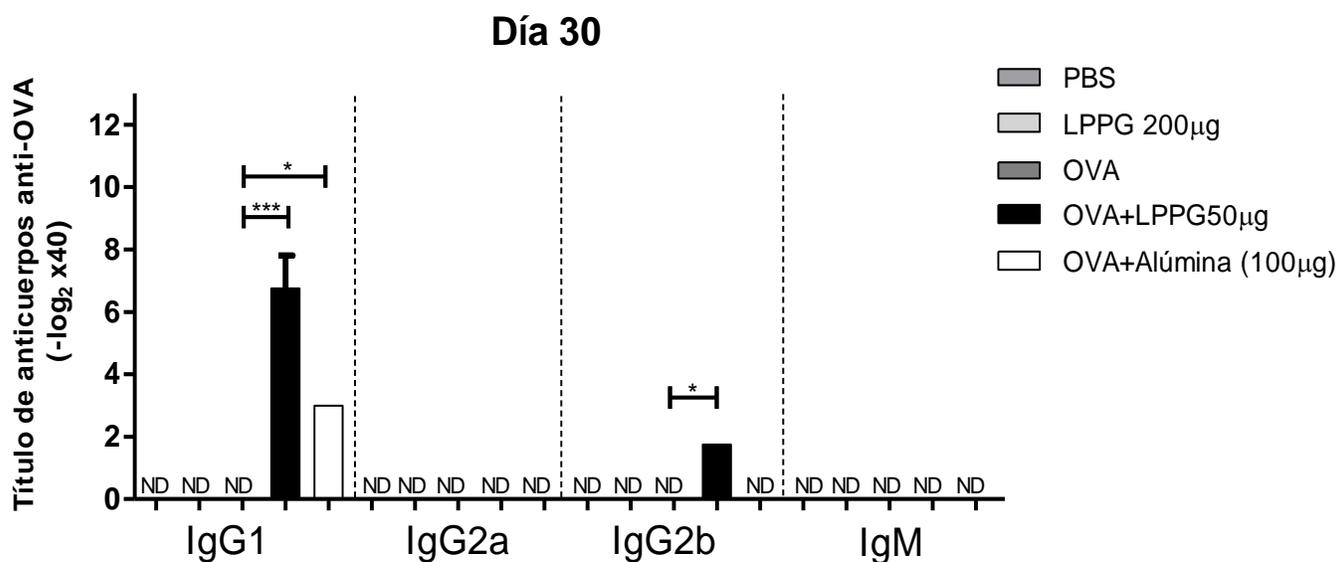


Fig.17 Isotipos de anticuerpos anti-OVA observados durante el efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 30 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM anti-OVA del grupo donde se utilizó la menor cantidad de LPPG, 50µg, y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$.

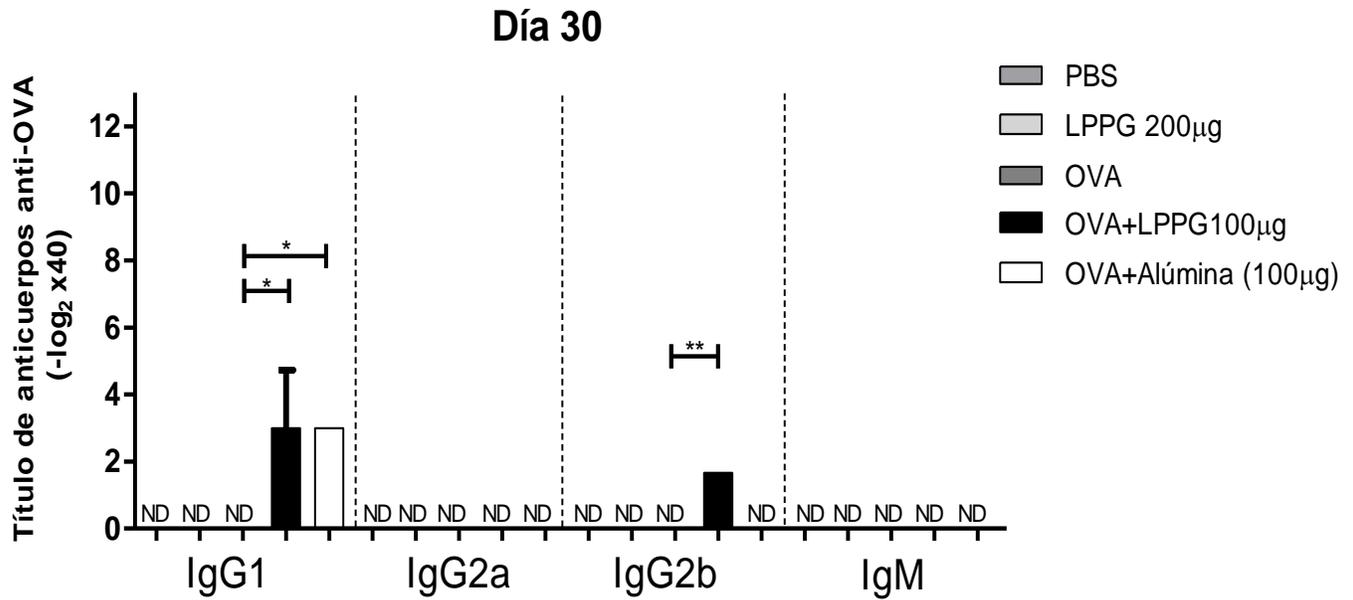


Fig.18 Isotipos de anticuerpos anti-OVA observados durante el efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 30 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM anti-OVA del grupo donde se inmunizaron 100µg de LPPG y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio ± la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferroni ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

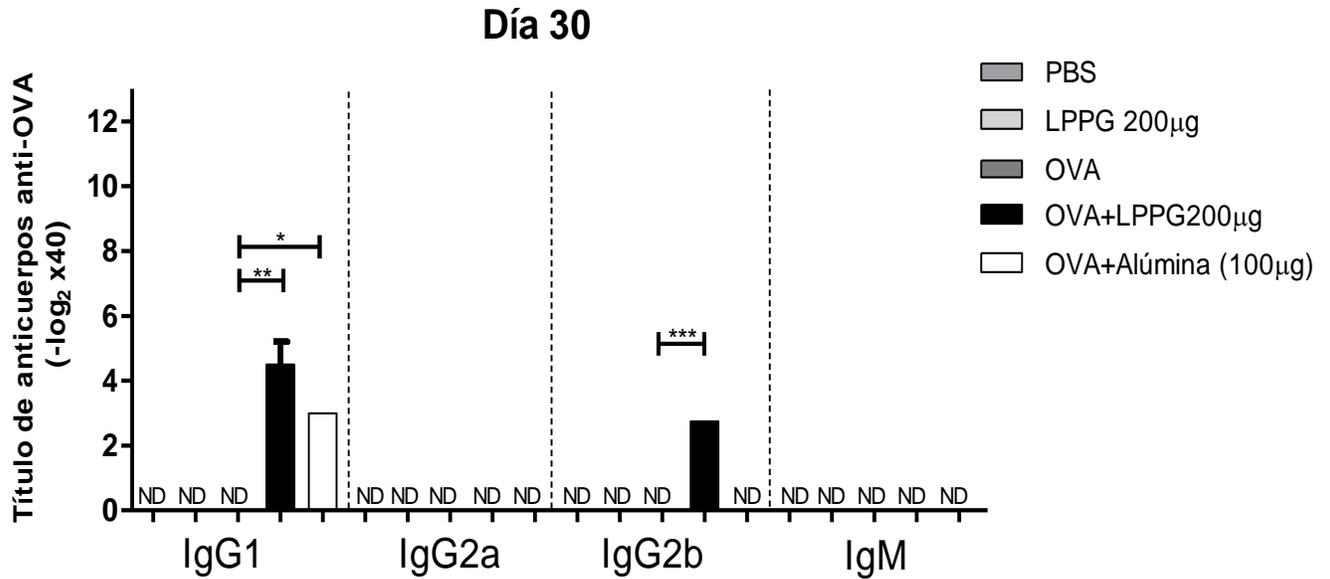


Fig.19 Isotipos de anticuerpos anti-OVA observados durante el efecto adyuvante de la LPPG sobre la respuesta de anticuerpos contra OVA en el día 30 post-inmunización. Se midieron los títulos de Ab IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM anti-OVA del grupo donde se inmunizó la mayor cantidad de LPPG, 200µg, y de los grupos controles. Los resultados se encuentran expresados como el promedio \pm la SD de 4 ratones por grupo. Prueba de ANOVA de un factor con comparación de Bonferoni *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

VIII. Discusión

Los adyuvantes actúan mejorando o direccionando la respuesta inmunitaria de formas muy diversas, la elección de un adyuvante adecuado en una formulación de cierta vacuna es de suma importancia pues puede ayudar a montar una respuesta de larga duración evitando así la necesidad de una posible re-inmunización, también puede ayudar a polarizar la respuesta generada hacia un perfil más adecuado que aquel que el antígeno genera, además podría ayudar a disminuir la cantidad de antígeno necesaria. Lo anterior tiene ventajas tanto para quienes producen las vacunas; hablando de ventajas económicas, reduciendo costos de manufactura o ganando mercado debido a una mejor eficiencia, como para las personas que son los consumidores de esas vacunas pues tendrán una mejor protección, una experiencia menos traumatizante, en el caso de vacunas que necesitan varias inmunizaciones y todo esto posiblemente a un menor costo. Actualmente son muy pocos los adyuvantes autorizados para usarse en vacunas para humanos. La investigación sobre éste campo ha crecido y ha tenido especial interés aquellas moléculas que ayudan a estimular el sistema inmunitario innato ya que además de conferir protección por sí mismo, también ayuda a dirigir la respuesta inmunitaria que se generará.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad adyuvante de la lipopéptidofosfoglicana de *E. histolytica* evaluando si al ser co-administrada con un antígeno modelo no inmunogénico (OVA) aumenta los títulos de anticuerpos contra el antígeno. La LPPG es una molécula anclada a la membrana de *E. histolytica*, la cual ha sido relacionada con su patogenicidad. Maldonado-Bernal *et al.* demostraron que la LPPG es una molécula reconocida por el sistema inmunitario innato y que su señalización se da a través de TLR2 y TLR4, por lo que es un buen candidato como adyuvante ya que señala por varios TLRs y entre ellos está TLR4, el cual tiene como una de sus principales características el utilizar tanto la vía de señalización que utiliza MyD88 como molécula adaptadora, como la vía que utiliza TRIF como adaptador.

La OVA es un antígeno no inmunogénico, se corroboró que la administración de OVA sola no generó títulos de anticuerpos de ninguna clase, sin embargo, al ser co-administrada con la LPPG se observaron títulos de anticuerpos contra OVA, éstos títulos generados son comparables con los que se observan en el grupo en el cual se inmunizó la OVA junto con un adyuvante conocido como lo es la alúmina. El efecto adyuvante de la alúmina se ha evaluado extensamente por otros grupos y esos datos correlacionan con lo obtenido en el presente trabajo .

Se administraron tres diferentes cantidades de LPPG como adyuvante y en los tres distintos grupos se observó el aumento en el título de anticuerpos, por lo que se demostró que no es necesaria una gran cantidad de molécula para presentar este efecto adyuvante encontrado. La respuesta en los tres grupos se puede observar desde el día 8 después de la primera inmunización y los títulos más altos se observan en el día 30 para los tres grupos. Al igual que la alúmina, los grupos inmunizados con LPPG como adyuvante muestran una disminución de los títulos de anticuerpos generados al día 60 tras la primera inmunización.

Un estado de protección no es definido por la capacidad del adyuvante de inducir la producción de anticuerpos, es por esto que se evaluaron diferentes subclases de anticuerpos para poder tener un indicio del perfil de respuesta que se está generando. En la co-administración de la LPPG con OVA se observaron títulos de anticuerpos anti-OVA de clase IgG1 e IgG2b, los cuales son característicos de un perfil de respuesta de tipo Th2, el cual actúa principalmente contra patógenos extracelulares.

Lo anterior es importante pues se observa una cinética muy parecida a la que se observó en la alúmina, también se observa que la inducción de títulos de anticuerpos es similar para ambas moléculas además de tener el mismo perfil de respuesta, sin embargo, el mecanismo mediante el cual la alúmina actúa no está del todo descrito aún, sólo se sabe que su interacción con el sistema inmunitario innato se debe a que activa inflamasoma en células dendríticas. Por otro lado la LPPG tiene un gran potencial como adyuvante debido a que ya se conocen los receptores de la inmunidad innata mediante los cuales es reconocida, abriendo

esto un campo de investigación muy importante, pues se tiene la etapa inicial de la manera en la que actúa, ya que se conocen las vías de señalización de ambos receptores, lo que nos pone más cerca de conocer su mecanismo y sabiendo éste, podemos encontrar usos más específicos para la molécula.

Serán muy importantes estudios posteriores sobre este tema, ya que es necesario conocer las moléculas co-estimuladoras que induce, si mejora la migración de las APCs, la manera en que mejora la presentación del antígeno por parte de éstas y cómo esta actúa sobre la respuesta de los linfocitos T y su subsecuente interacción con los linfocitos B, o cómo actúa sobre el reconocimiento del antígeno por parte de los mismo linfocitos B.

IX. Conclusiones

Se aisló, purificó y caracterizó la LPPG de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS.

La LPPG de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS tiene capacidad adyuvante al ser co-administrada con un antígeno no inmunogénico (OVA) y tiene un perfil de respuesta de tipo Th2

X. Bibliografía

1. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway*, Primera Edición Edn. México: McGraw-Hill, 2012.
2. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000;173:89-97.
3. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9.
4. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* 2010;28:131-55.
5. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357:1777-89.
6. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004;40:845-59.
7. Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011;366:2748-55.
8. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327:291-5.
9. Litman GW, Rast JP, Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:543-53.
10. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 2011;11:251-63.
11. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112:1557-69.
12. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:601-10.
13. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 2010;10:225-35.
14. MacLennan IC, Garcia d, V, Casamayor-Palleja M. B-cell memory and the persistence of antibody responses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000;355:345-50.
15. Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 2004;16:323-33.

16. Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, et al. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 2011;34:947-60.
17. Sporri R, Reis e Sousa. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 2005;6:163-70.
18. Mempel TR, Henrickson SE, von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004;427:154-9.
19. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 2011;470:543-7.
20. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 2009;183:6186-97.
21. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009;30:23-32.
22. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev* 2011;239:178-96.
23. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol* 2011;12:509-17.
24. Douek DC, Nabel GJ. Vaccines. *Immunol Rev* 2011;239:5-7.
25. McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* 2007;27:687-90.
26. Kool M, Soullie T, van NM, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008;205:869-82.
27. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:621-5.
28. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
29. Beutler B. TLRs and innate immunity. *Blood* 2008;113:1399-407.
30. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007;19:24-32.

31. Moresco EM, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Curr Biol* 2011;21:R488-R493.
32. Maldonado-Bernal C, Kirschning CJ, Rosenstein Y, et al. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol* 2005;27:127-37.
33. Wong-Baeza I, Alcantara-Hernandez M, Mancilla-Herrera I, et al. The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:254521.
34. Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio JC. Factores de Virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Revista Infectio* 2009;100-10.
35. Gómez JC, Cortés JA, Cuervo SI, López MC. Amebiasis intestinal. *Infectio* 2007;11:36-45.
36. Isibasi A, Santa CM, Ramirez A, Kumate J. [Immunochemistry of a lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HK-9 cultivated in axenic media, using the phenol-water method]. *Arch Invest Med (Mex)* 1982;13 Suppl 3:51-5.
37. Isibasi A, Santa CM, Soto M, X, Ramirez A, Kumate J. [Localization of a lipopeptidophosphoglycan extracted by phenol-water from trophozoites of the HK-9 strain of *Entamoeba histolytica*]. *Arch Invest Med (Mex)* 1982;13 Suppl 3:57-62.
38. Vivanco-Cid H, Alpuche-Aranda C, Wong-Baeza I, et al. Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunol* 2007;29:467-74.
39. Lotter H, Gonzalez-Roldan N, Lindner B, et al. Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000434.